

THIAGO DE JESUS OLIVEIRA

**PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DA HEMOLINFA DO
ESCORPIÃO: *Tityus serrulatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo – USP, Instituto Butantan – IBu e Instituto de Pesquisa e Tecnologia – IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2016

THIAGO DE JESUS OLIVEIRA

**PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DA HEMOLINFA DO
ESCORPIÃO: *Tityus serrulatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo – USP, Instituto Butantan – IBu e Instituto de Pesquisa e Tecnologia – IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Júnior

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

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

© reprodução total

Oliveira, Thiago de Jesus.

Peptídeos antimicrobianos da hemolinfa do escorpião: *Tityus serrulatus* / Thiago de Jesus Oliveira. – São Paulo, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Evolução do sistema imune em aracnídeos.

Versão do título para o inglês: Antimicrobial peptides from the hemolymph of the scorpion: *Tityus serrulatus*

1. Escorpião 2. Sistema imune inato 3. Peptídeos antimicrobiano 4. Defensinas 5. Plasma 6. Hemócitos I. Silva Junior, Prof. Dr. Pedro Ismael da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0112/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Thiago de Jesus Oliveira.

Título da Dissertação: Peptídeos antimicrobianos da hemolinfa do escorpião: *Tityus serrulatus*.

Orientador(a): Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior.

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:




COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ccuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 13 de setembro de 2013

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Estudo do sistema imunológico de escorpiões: *Tityus serrulatus*", protocolo nº. I-1118/13, sob a responsabilidade de Pedro Ismael da Silva Jr. e Thiago de Jesus Oliveira, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.


Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

“Eu dedico este trabalho à minha família e amigos, que são os verdadeiros pilares, que me sustentaram nos momentos de fraquezas e incertezas, que realmente me apoiaram e me incentivaram em todos os instantes, tristes e felizes, mesmo sem entender o que eu realmente faço.”

Thiago de J. Oliveira

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a minha família, minha mãe, Maria Do Carmo de Jesus Oliveira e meu pai, Elieser Sarmiento de Oliveira, pela paciência e incentivo por esse caminho que eu pude ter o privilégio de escolher. Meus irmãos, Layo e Diego de Jesus Oliveira, por não reclamarem das horas em que eu passei com o computador ligado, ou lendo até altas horas da noite, com muito amor esse trabalho é para todos vocês.

Entre os meus familiares eu não poderia deixar de agradecer minha tia Rita da Silva Almeida, que me ajudou nos momentos mais difíceis, e principalmente, minha prima Mônica Emar da Costa Bonifácio, ambas têm o poder de ajudar a quem precisa antes mesmo da necessidade bater à porta, e sem a ajuda de ambas no início desse projeto eu não teria como estar presente no laboratório. Eu não posso deixar de agradecer ao meu primo, o biólogo Pedro Henrique Herculano, que nos momentos de mais apuros também me ajudou muito, sem ele, principalmente na reta final do mestrado eu não teria conseguido gerar os resultados que consegui.

Gostaria de agradecer ao Doutor Pedro Ismael da Silva Junior, pela paciência e disponibilidade em me receber no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – Química de Proteínas, eu só tenho à agradecer, principalmente pela sabedoria que acumulei nesses 3 anos de aprendizado. Ele conquista á todos com o seu bom-humor, sempre solícito, e educado, poucos conhecem ou vão conhecer como ele realmente tem o coração grande, e esconde um espirito jovem e brincalhão, com piadinhas e anedotas gratuitas ao decorrer de um dia longo de trabalho, mais uma vez, obrigado Pedro.

As minhas amigas de laboratório, para cada uma delas eu desejo tudo o que há de melhor nesse mundo, nessa caminhada, que por um presente de Deus, foi permitido dividir esse pedacinho tão importante da minha vida com vocês. Para não dar briga, não vou colocar por ordem de preferência, porque seria impossível, então eu gostaria de dizer que esse trabalho não seria possível sem as conversas e discussões com as futuras mestres, Soraia Maria do Nascimento e Laura Cristina Lima Diniz, com certeza eu aprendi a estudar de uma forma clara e aprendi muito com vocês, quero levar comigo para sempre um pouquinho da inteligência da Laura

e a forma como a Soraia tem o poder de tornar as coisas mais perfeitas. Para a doutora do laboratório, Katie Cristina Takashi Riciluca, sem sombra de dúvidas você me ensinou muito no laboratório e essas as lições eu vou levar para o resto da minha vida, a palavra que mais define a Katie é a persistência, mesmo quando as ondas não são favoráveis. Elisa Chaparro Aguirre, sempre autêntica e criativa, seus dons para a arte são visíveis e o bom gosto para óculos de sol fazem parte da sua personalidade forte. Andrea Diaz Roa, chegou com esse jeitinho colombiano dona de uma simplicidade e conquistou à todos, espero que um dia se torne uma doutora, segura de si mesma e que descubra que parte da sua missão é sim ajudar aos outros. Débora Figueiredo, sempre uma ótima companhia, muito obrigado por toda a ajuda, inclusive por trazer a felicidade encarnada em bolos, tortas e tudo isso temperado com muito amor. E a mais nova integrante do grupo, Carolina Nisa, sempre irreverente e que se dispôs a ler esse trabalho para ajudar nas correções, de verdade mesmo Carol, muito obrigado.

Continuando no laboratório, eu gostaria de agradecer as meninas que fazem parte do Programa de Aprimoramento Profissional (PAP), Andrea Grespan, sempre mal-humorada, mas todo mundo já sabe que isso é só um escudo, que ela usa para se proteger de um mundo que, muitas vezes, infelizmente não é cordial. Sandra, toda meiga, e com aqueles abraços que transmitem uma energia boa, mesmo quando o experimento não dá certo. Sem vocês duas com toda acerteza que a caminhada seria mais difícil, muito obrigado por cuidar, alimentar, limpar e zelar pelos escorpiões e os demais bichos do nosso biotério.

Muitas pessoas passaram pelo laboratório, mas foram essenciais para o meu amadurecimento, tanto pessoal, quanto profissional, eu gostaria muito de agradecer a Thaís Costella, Nayrob Pereira, Ivan Ferreira, Bianca, Pedro Godoy, Paula Segura e Natalia, foram pessoas que passaram tão rápido, mas para cada um eu tenho uma lembrança em especial.

No decorrer desse projeto eu busquei informações sobre diferentes áreas em outros laboratórios, e muitas vezes de tanto ser cara-de-pau acabei conhecendo pessoas inteligentíssimas que me espelho muito e que fazem parte do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – LETA. Muitas pessoas emprestaram reagentes, tiraram dúvidas sobre protocolos, ensinaram a mexer em equipamentos, mas algumas pessoas como Milene Menezes, Polyana, Úrsula, Mariana, Eduardo, Ismael, Ivan, Ligia, Rosa nossa técnica, Débora, Milton, Regiane, Ana Karina, Ana

Helena, Eduardo, Mariana técnica, Marcelo entre outros eu não posso deixar de citar nesse trabalho, porque há um pouco de cada um deles nessa dissertação.

Como parte do programa de pós-graduação eu fiz disciplinas que abriram os meus horizontes e nessas disciplinas conheci pessoas com as quais criei laços além do Instituto Butantan e quero leva-los comigo para a vida toda, são eles: Andrews, Aline Teixeira, Luis, Bruno, Marcela, Thalita Araújo, Giovana, Ivana e Pamela. Muito obrigado mesmo, por sempre estarem presentes, podemos passar meses sem contato, mas quando nos encontramos, é incrível como a energia continua a mesma, daquela disciplina em que nos conhecemos.

Desde que entrei no Instituto Butantan em 2011, eu conheci muitas pessoas, algumas passaram, mas outras ficaram para sempre, boas lembranças eu vou guardar da época em que formamos o grupo “cobras-criadas” em homenagem ao bloco de carnaval do Butantã, sempre que possível ainda nos encontramos e quando isso acontece a gargalhada é garantida. Muito obrigado meus amores, por continuarem comigo nessa jornada em busca do título de mestre: Cintia Heluane, Jacqueline Mazzuchelli, Milene Luna, Adriana Mezine, Adriana Martins, Luciane Abud, Beatriz, Andria, Luciana Viana, Mariana Viana, Mariana Shimitid, Andrea, Carol e Mari, é com muito amor que eu agradeço mesmo.

Gostaria de agradecer aos amigos que não fazem parte do Instituto Butantan mas que estão mais inteirados das coisas que acontecem nesse universo, são amizades que eu adoro estar junto e persistem por anos na minha vida, e eu quero é que durem por muito mais tempo, Mariana Toledo de Abreu, sem você com certeza eu já teria desistido de uma vida social, você sempre me puxando para um mundo que é nosso, com muita felicidade e motivação, te amo muito amiga. Daniela Oliveira Lima, toda delicada e sempre disposta a ouvir minhas lamentações, te amo muito também e não canso de dizr. Ana Carolina Bastos de Souza, Lucinda Araújo e Antônia Alves Louro, Cláudia Montanari Crivellari e Petra de Assis Pereira muito obrigado por tudo, todos os momentos de risadas que me ajudam muito, principalmente nas fazes difíceis.

Gostaria de dedicar esse trabalho também aos meninos mais lindos de Visconde do Rio Branco, cidade de Minas Gerais, em especial ao Thállissom Dutra, sua esposa Adrine, seus amigos Jorge, Braulio, Luís Filipe e Daniel. Eu gostaria de colocar o nome dos demais mas são tantos que não caberiam aqui. De uma forma geral essa cidade foi muito importante, pois todos me acolheram e sempre que eu

voltava para São paulo me sentia renovado para dar continuidade no meu trabalho.

Gostaria de agradecer a todos os funcionários da secretaria da Pós-Graduação do Programa de Interunidades em Biotecnologia, Fabia, Eliane, Marcos e os estágios, sempre muito prestativos, eles possibilitaram a realização de um sonho, muito obrigado por toda a ajuda.

Gostaria de agradecer a Bruna Souza que chegou recentemente no Laboratório Especial de Toxinologia, ela não participou diretamente com esse projeto de mestrado, mas no pouco tempo que convivi com ela eu já aposto as minhas fichas de poker que ela será uma grande vencedora nesse mundo acadêmico.

Esse parágrafo, eu dedico à aquelas que foram as primeiras, as primeiras amigas, que são responsáveis por quase 70% da pessoa que eu sou hoje, dividir com vocês os melhores momentos da minha vida foi incrível e eu espero que possamos continuar dividindo cada vez mais e mais as nossas eternas infâncias ao decorrer dessa vida, muito obrigado Camila de Oliveira Gomes, Fernanda de Oliveira Kosugui, Sthefany Rodrigues Barbosa e Débora Compri. Espero que um dia outras pessoas possam ler e entender de onde veio tanto amor.

Agradeço a Deus, por tudo o que eu conquistei até hoje e com certeza o objetivo maior desse trabalho foi criar e amadurecer laços com pessoas que almejam o crescimento e desenvolvimento do conhecimento.

“A sabedoria é a meta da alma humana; mas a pessoa, à medida que em seus conhecimentos avançam, vê o horizonte do desconhecido cada vez mais longe”.

(Heráclito)

RESUMO

Oliveira TJ. Peptídeos antimicrobianos da hemolinfa do escorpião: *Tityus serrulatus*. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisa e Tecnologia; 2016.

Os escorpiões são artrópodes, e sua existência data desde o período Siluriano (aproximadamente 450 milhões de anos). Entre os fatores que contribuem para sua adaptação é possível destacar a oferta de alimento, defesa contra predadores e um sistema imune capaz de agir contra injúrias, evitando assim a perda de hemolinfa e a ação de microrganismos. Estudos desenvolvidos com sistema imune de artrópodes contribuem para a compreensão da sua adaptação à diferentes ambientes. Os principais mecanismos estudados em sistema imune de artrópodes são: (1) a cascata de coagulação, (2) a cascata de fenoloxidase e a (3) produção de peptídeos antimicrobianos (PAMs). Os PAMs são moléculas pequenas, com aproximadamente 10 kDa e apresentam potencialidade de seu uso como possíveis antibióticos ou como ferramentas farmacológicas. Os trabalhos descrevendo PAMs na hemolinfa de escorpiões foram desenvolvidos com as espécies *Leiurus quinquestriatus*, *Androctonus australis* e *Centruroides limpidus limpidus*. No Brasil, o escorpião alvo de estudos é o *Tityus serrulatus*, devido ao número e gravidade dos acidentes escorpiônicos. Embora haja uma grande quantidade de dados sobre as toxinas do *T. serrulatus*, nenhum estudo foi publicado descrevendo o seu sistema imunológico. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi identificar PAMs presentes na hemolinfa deste escorpião. Para isso, foi extraída a hemolinfa de escorpiões *T. serrulatus*, separado os hemócitos e o plasma e ambos fracionados em três concentrações de acetonitrila em TFA 0,05% (5%, 40% e 80%). Essas frações foram submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência, usando-se uma coluna de fase reversa (CLAE-FR). As amostras obtidas por CLAE, foram analisadas quanto a sua atividade em inibir o crescimento microbiano e atividade hemolítica. Com os dados obtidos por espectrometria de massas dessas frações foi possível compará-las com outras moléculas depositadas em bancos de dados para PAMs, e transcriptomas da espécie *T. serrulatus*. Foram identificadas 16 frações, 7 encontradas no plasma e 9 nos hemócitos, que apresentam atividade contra microrganismos. Uma das frações presente nos hemócitos apresentou atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados e em análises por espectrometria de massas apresenta similaridade com a defensina caracterizada no carrapato *Ixodes scapularis* a sua sequência foi encontrada também no transcriptoma da glândula do veneno e intestino do *T. serrulatus*. A defensina descrita nesse trabalho possui aproximadamente 3486 Da., não apresenta atividade hemolítica e foi denominada como Serrulina por ser a primeira defensina caracterizada na hemolinfa da espécie *T. serrulatus*.

Palavras-chave: Escorpiões. Sistema Imune Inato. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs). Defensinas.

ABSTRACT

Oliveira TJ. Antimicrobial Peptides from the hemolymph of the scorpion: *Tityus serrulatus*. Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisa e Tecnologia; 2016.

Scorpions are arthropods, and they are on the planet since the Silurian period (about 450 million years). Many factors contributed to its existence, often in inhospitable environments, with presence of pathogenic microorganisms. Arthropods immune system studies has been collaborating to the understanding of this phylum adaptation. In general, the main mechanisms under investigation are: (1) clotting cascade, (2) phenoloxidase cascade and (3) the synthesis of antimicrobial peptides (AMPs). The AMPs are small molecules, about 10 kDa, that can have potential use as antibiotic or pharmacological tools. Despite the great diversity of scorpion species, antimicrobial peptides were characterized only from *Leiurus quinquestriatus*, *Androctonus australis* and *Centruroides limpidus limpidus*. In Brazil, studies with *Tityus serrulatus* are very important because of the incidence and the severity of poisoning accidents. Although the extensive scientific literature on *T. serrulatus*, this is the first study about its immune system. Thus, the aim of this study was to identify antimicrobial peptides in the hemolymph of this scorpion. The hemolymph was extracted from the scorpion *T. serrulatus*, separate plasma and hemocytes and both fractionated into three concentrations of acetonitrile in TFA 0.05% (5%, 40% and 80%). These fractions were subjected to high-performance liquid chromatography, using a reverse phase column (RP-HPLC). The samples obtained by HPLC, were analyzed for their activity in inhibiting microbial growth and hemolytic activity. With the data obtained by mass spectrometry of these fractions, was possible to compare them with other molecules deposited in databases to AMPs, and transcriptomes of the species *T. serrulatus*. Sixteen active fractions against different microorganisms were identified, 7 in the plasma and 9 in the hemocytes. The most active fraction was analyzed by mass spectrometry. Tryptic peptides from this fraction matched to a defensin-like described in the tick *Ixodes scapularis*. The identified peptides were aligned by tblastn against *T. serrulatus* venom gland and midgut transcriptomes, matching. This transcript was further identified as a defensin-like and its ORF encodes for a 3486 Da peptide. The fraction has no hemolytic activity against humans erythrocytes. This is the first defensin characterized in *T. serrulatus* hemolymph and it was named Serrulin.

Keywords: Scorpions. Innate Immune System. Antimicrobial Peptides (AMPs). Defensins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema do sistema imunológico de aranhas.....	23
Figura 2 – Modos de permeabilização de peptídeos antimicrobianos (PAMs) em membrana celular.....	26
Figura 3 – Mecanismos de ação descritos em PAMs.....	27
Figura 4 – Exemplar do escorpião da espécie <i>Tityus serrulatus</i>	33
Figura 5 – Ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido.....	39
Figura 6 – Cromatografia líquida de alta eficiência das amostras do plasma eluídas em 5% de acetonitrila-ACN.....	45
Figura 7 – Cromatografia líquida de alta eficiência das amostras do plasma eluídas em 40% de acetonitrila-ACN.....	47
Figura 8 – Cromatografia líquida de alta eficiência das amostras do plasma eluídas em 80% de acetonitrila-ACN.....	48
Figura 9 – Cromatografia líquida de alta eficiência das amostras dos hemócitos eluídas em 5% de acetonitrila-ACN.....	50
Figura 10 – Cromatografia líquida de alta eficiência das amostras dos hemócitos eluídas em 40% de acetonitrila-ACN.....	51
Figura 11 – Análise por eletroforese das frações que apresentaram atividade antimicrobiana presentes nos hemócitos.....	52
Figura 12 – Atividade hemolítica da fração TSH40%-39.....	53
Figura 13 – Cromatografia líquida de alta eficiência da fração TSH40%-33.....	54
Figura 14 – Análise por eletroforese da amostra TSH40% - 33.....	56
Figura 15 – Fragmentos da TSH40%-33 (Banda A) obtidos pelo software Peaks®.	57
Figura 16 – Busca em banco de dados de transcriptoma do intestino do escorpião <i>T. serrulatus</i>	58
Figura 17 – Alinhamento das defensinas de aracnídeos.....	59
Figura 18 – Fragmentos da TSH40%-33 (Banda B) obtidos pelo software Peaks®.	60
Figura 19 – Sitio de ação das defensinas de <i>I. scapularis</i>	61
Figura 20 – Cromatografia líquida de alta eficiência das amostras dos hemócitos eluídas em 80% de acetonitrila - ACN.....	62
Figura 21 – Fragmentos da TSH80%-03 obtidos pelo software Peaks®.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frações com atividade antimicrobiana do plasma do escorpião da espécie <i>Tityus serrulatus</i>	49
Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bacteriostática mínima (CBM) da fração TSH40%-33.....	55
Tabela 3 - Frações com atividade antimicrobiana do hemócitos do escorpião da espécie <i>Tityus serrulatus</i>	63
Tabela 4 – Frações com atividade antimicrobiana da hemolinfa (plasma e hemócitos) do escorpião da espécie <i>Tityus serrulatus</i>	65

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C : Grau Celsius.

µg: Microgramas.

µL : Microlitro.

Å: Angström.

Abs: Absorbância.

Blast: Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta básica de busca por alinhamento local).

Ca²⁺: Íon de Cálcio.

CGen: Conselho de Gestão do Patrimônio Genético.

CID: Collision induced dissociation (Dissociação induzida por colisão).

CLAE-FR: Cromatografia líquida de alta eficiência – Fase reversa.

CII-dlp: *Centruroides limpidus limpidus* - defensin like-peptide .

Da: Dalton.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DTT: 1,4-Dithiothreitol

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético.

ERO: Espécies reativas de oxigênio

ESI: Electrospray Ionization (ionização por eletrospray).

h: Horas.

IAA: iodoacetamida

kDa: Quilo Dalton.

L: Litros.

LC: Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida).

LETA: Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada.

LPS: Lipopolissacarídeos.

M: Molar (mol/litro).

min: Minutos.

ml: Mililitros.

mM: Milimolar.

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro.

Na⁺: Íon de sódio.

NaCl: Cloreto de sódio.

nm: Nanômetros.

nM : Nano molar.

NO: Nitric oxide (óxido nítrico).

OMS: Organização mundial da saúde.

ON: Óxido nítrico

PAM: Peptídeo Antimicrobiano.

PB: Poor Broth (Meio Pobre).

PDB: Potato Dextrose Broth (Meio de Dextrose de Batata).

pH: potencial hidrogeniônico.

PMAPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos.

RNA: Ácido ribonucleico.

ROI: reactive oxygen intermediate (oxigênio reativo intermediário).

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl-Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

(Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio).

SISBIO: Sistema de autorização e informação em biodiversidade.

TFA: Ácido tricloroacético.

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Alanina	A
Cisteína	C
Ácido Aspártico	D
Ácido Glutâmico	E
Fenilalanina	F
Glicina	G
Histidina	H
Lisina	K
Isoleucina	I
Leucina.....	L
Metionina.....	M
Asparagina	N
Prolina	P
Glutamina	Q
Arginina	R
Serina	S
Treonina	T
Valina	V
Triptofano	W
Tirosina	Y

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Sistema imunológico de artrópodes	21
1.1.1 <i>Cascata de coagulação</i>	24
1.1.2 <i>Cascata de fenoloxidase</i>	25
1.1.3 <i>Peptídeos antimicrobianos (PAMs)</i>	25
<u>1.1.3.1 <i>Peptídeos antimicrobianos ricos em determinados aminoácidos</i></u>	28
<u>1.1.3.2 <i>Peptídeos antimicrobianos cíclicos</i></u>	29
<u>1.1.3.3 <i>Defensinas</i></u>	30
<u>1.1.3.4 <i>Peptídeos antimicrobianos isolados de escorpiões</i></u>	31
1.2 O escorpião amarelo <i>Tityus serrulatus</i>	32
1.3 Justificativa	34
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 METODOLOGIA	36
3.1 Animais e coleta de hemolinfa	36
3.2 Primeira etapa de fracionamento da hemolinfa	36
3.2.1 <i>Fracionamento dos hemócitos</i>	36
3.2.2 <i>Fracionamento do plasma</i>	37
3.3 Bioensaios	38
3.3.1 <i>Microrganismos</i>	38
3.3.2 <i>Ensaio de inibição de crescimento de microrganismo em meio líquido PB e PDB</i>	38
3.3.3 <i>Concentração inibitória mínima (CIM)</i>	39
3.3.4 <i>Ensaio hemolítico</i>	39
3.4 Caracterização estrutural	40
3.4.1 <i>Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page</i>	40
3.4.2 <i>Quantificação da proteína por espectrofotometria</i>	41
3.4.3 <i>Digestão em gel</i>	41
3.4.4 <i>Digestão “in solução”</i>	42
3.5 Espectrometria de massas	42
3.6 Análises de bioinformática	43
3.7 Análise em banco de dados do transcriptoma do escorpião <i>Tityus</i>	

<i>serrulatus</i>	44
3.8 Alinhamento de estrutura primária de proteínas	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Plasma	45
4.1.1 <i>Frações com atividade antimicrobiana do plasma, eluídas em 5% de ACN</i>	45
4.1.2 <i>Frações com atividade antimicrobiana do plasma, eluídas em 40% de ACN</i>	46
4.1.3 <i>Frações com atividade antimicrobiana do plasma, eluídas em 80% de ACN</i>	47
4.2 Hemócitos	49
4.2.1 <i>Frações com atividade antimicrobiana dos hemócitos, eluídas em 5% de ACN.</i>	49
4.2.2 <i>Frações com atividade antimicrobiana dos hemócitos, eluídas em 40% de ACN.</i>	50
4.2.3 <i>Frações com atividade antimicrobiana dos hemócitos, eluídas em 80% de ACN.</i>	62
5 CONCLUSÕES	66

1 INTRODUÇÃO

O filo Arthropoda é bastante diverso, incluindo diferentes clados com características peculiares como, por exemplo, os insetos (classe Insecta), quilópodes (subfilo Myriapoda; classe: Chilopoda), crustáceos (subfilo: Crustacea), e aracnídeos (subfilo: Chelicerata; classe Aracnida). Fósseis indicam o surgimento deste filo no planeta no período Pré-Cambriano, há aproximadamente 600 milhões de anos. Alguns fatores contribuem para a permanência e adaptação dessas espécies, em ambientes muitas vezes inóspitos, por exemplo, oferta de alimento, reprodução (sendo algumas espécies partenogenéticas), defesa contra predadores e um sistema imunológico capaz de agir contra microrganismos patogênicos (Brusca, Brusca, 2003).

Todos os seres vivos apresentam um sistema imunológico formado por conjuntos de tecidos, células e moléculas que agem reparando injúrias e atuam contra a invasão de microrganismos patogênicos como vírus, bactérias, fungos e protozoários. Para que estes mecanismos sejam efetivos, respostas que em conjunto são chamadas de respostas imunológicas, ordenadas por células e moléculas ativam diferentes tipos de reações, com a finalidade de combater os patógenos e também para evitar a perda do sangue (hemolinfa) (Abbas et al., 2012).

O sistema imunológico pode ser dividido em sistema imune inato e sistema imune adaptativo (Du Pasquier, 2011). Como todos os invertebrados, os artrópodes possuem um sistema imunológico inato, que é caracterizado por respostas humorais e celulares (Granz, 2003). Diferente dos invertebrados, os vertebrados, além de possuírem o sistema imune inato, possuem o sistema imunológico adaptativo ou adquirido, onde as principais características são: (a) produção de imunoglobulinas (anticorpos), que desenvolvem uma ação específica contra o microrganismo invasor e (b) a permanência de células de memória, e desta maneira uma resposta mais eficaz e rápida em um segundo contato com o patógeno (Abbas et al., 2012).

A imunidade inata é composta inicialmente por uma barreira epitelial físico-química que protege o organismo contra a entrada de microrganismos. Quando ocorre a entrada de agentes patogênicos, há o reconhecimento de moléculas presentes nesses microrganismos, por receptores de reconhecimento de padrões associados a patógenos. Esses receptores identificam estruturas de diversas classes de microrganismos, que não existem nas células do hospedeiro e que são

chamadas de padrões moleculares associados a patógenos-PMAPs, como por exemplo, ácido ribonucleico (RNA) dupla hélice, manoses em glicoproteínas e endotoxinas (lipopolissacarídeos-LPS) (Kurata et al., 2006). Quando os receptores de PMAPs são ativados, as células passam por processos de sinalizações internas, que têm como finalidade a liberação de componentes necessários para o recrutamento celular (citocinas), há a destruição de microrganismos pela produção de espécies reativas de oxigênio - ERO (reactive oxygen intermediate-ROI) e óxido nítrico - ON (nitric oxide-NO), que são tóxicos para alguns microrganismos além de ocorrer também a ativação de componentes da cascata de coagulação, aglutinação celular, a melanização pela cascata de fenoloxidase, fagocitose dos microrganismos invasores e a liberação de peptídeos antimicrobianos-PAMs (Iwanaga, Lee, 2005).

1.1 Sistema imunológico de artrópodes

Os mecanismos de defesa do sistema imunológico dos artrópodes contribuem como um dos fatores que levaram espécies do filo a sobreviverem por tanto tempo em ambientes, muitas vezes inóspitos, com a presença de microrganismos patogênicos. Assim como nos demais seres vivos, quando um microrganismo ultrapassa a barreira físico-química, no caso dos artrópodes, a cutícula, ocorre a ativação de respostas humorais e respostas celulares do sistema imune inato (Seitz, 1972).

Parte do seu sistema imunológico está localizado em células do seu sangue, denominado hemolinfa. A hemolinfa é encontrada em todos os artrópodes, constitui aproximadamente 20% do seu peso corpóreo, circula livremente entre vasos linfáticos e cavidades corpóreas e tem, entre diversas funções, papel importante na locomoção do animal, respiração e nutrição (Kropf, 2013). No sistema imune, as células (hemócitos), além de sintetizar proteínas, também estão relacionadas com fagocitose, nodulação, encapsulação do microrganismo e armazenamento de moléculas envolvidas em respostas humorais (Seitz, 1972; Wikner, Huckstorf, 2013).

Outros alvos de estudos do sistema imune de artrópodes são as espécies de caranguejo-ferradura (*Limulus polyphemus*), um limúlideo encontrado na costa oeste da América do Norte, e o *Tachypleus tridentatus* encontrado no sudeste da Ásia, estas espécies são consideradas fósseis vivos o que as tornam interessantes para a comparação entre outras espécies. O principal trabalho desenvolvido com estas

espécies descrevem a caracterização e localização de fatores envolvidos na cascata de coagulação e na produção de moléculas antimicrobianas presentes nos granulócitos (Iwanaga et al., 1998).

Iwanaga e Lee (1998) identificaram ainda a presença de grânulos de diferentes tamanhos armazenados em granulócitos na hemolinfa de limulídeos. Presentes nos grânulos menores foram identificados peptídeos antimicrobianos como: Taquiplesina, Taquicitina, Taquistatina e uma Grande defensina, todos os peptídeos antimicrobianos com massas entre 2,3 e 8,6 kDa e atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e contra fungos. Enquanto que nos grânulos maiores foram descritas proteínas envolvidas na cascata de coagulação como: fator C, fator B, fator G, Enzima pró-coagulante e o Coagulogênio. Todas essas proteínas são serino proteases com exceção do coagulogênio. Nos grânulos maiores foram encontradas também as Big Defensinas descritas anteriormente em grânulos menores.

Em aranhas, por exemplo da espécie *Acanthoscurria gomesiana*, o sistema imunológico inato é composto por diferentes tipos de hemócitos (granulócitos, plasmatócitos e cianócitos), que são células menores, de núcleo compacto formadas na parede do coração em forma de pró-hemócitos (Fukuzawa et al., 2008). Após a diferenciação celular os diferentes tipos de hemócitos, circulam livremente pela hemolinfa desempenhando suas funções (Kuhn-Nentwig, Netwig, 2013) (Figura 1).

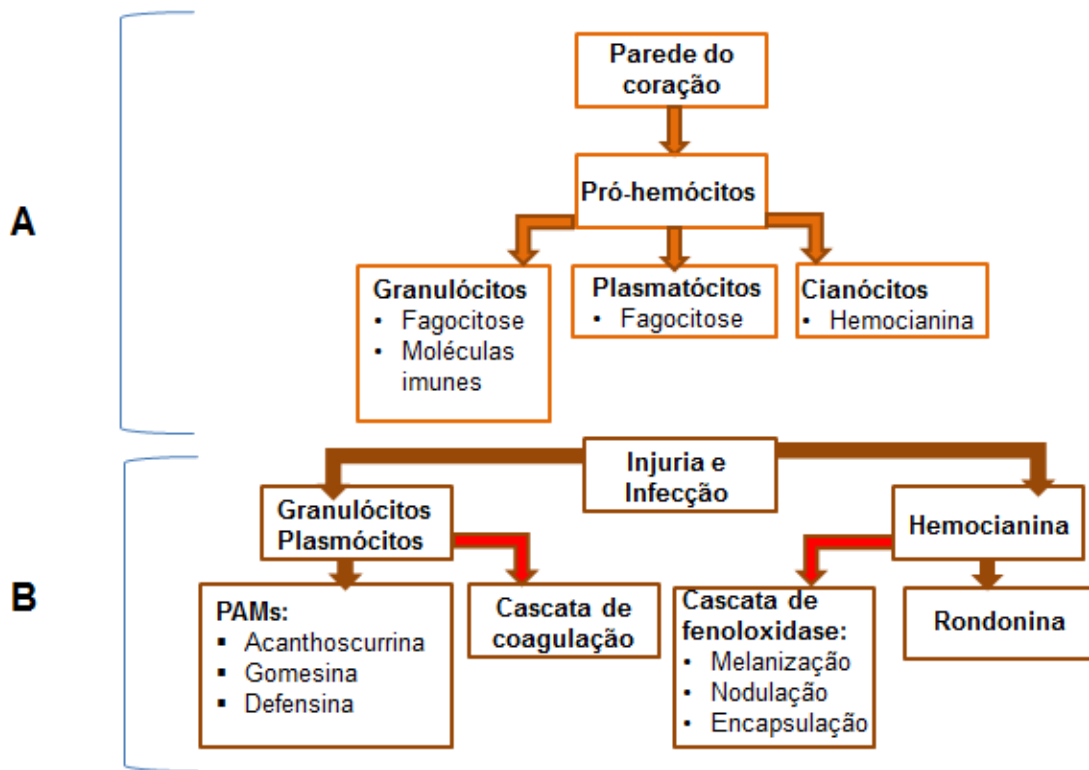


Figura 1 - Esquema do sistema imunológico de aranhas. Local de origem dos hemócitos, diferenciação celular e as suas funções (A). Reações que ocorrem com a invasão de um microrganismo ou com uma injúria tecidual (B). Os mecanismos para ativar a conversão da fenoloxidase, resultando na formação de melanina e fatores responsáveis pela ativação da cascata de coagulação (setas vermelhas), que não são bem esclarecidos em diversos aracnídeos (Kuhn-Nentwig, Netwig, 2013).

Os granulócitos são os hemócitos encontrados em maior quantidade na hemolinfa de aranhas, são células com o núcleo menor do que os plasmatócitos e podem apresentar diversidade em sua forma (Sherman, 1981). Possuem grânulos de variados tamanhos que armazenam os peptídeos antimicrobianos, proteínas responsáveis pela cascata de coagulação e pela cascata de fenoloxidase, além de apresentarem a capacidade assim como os plasmatócitos de fagocitar microrganismos invasores (Fukuzawa, 2008). Os cianócitos, um dos mais raros tipos de hemócitos a serem encontrados na hemolinfa de aranhas, foram inicialmente descritos em limúlídeos e possuem o citoplasma denso, contendo cristais de proteínas que são sintetizadas e armazenadas por estas células (Fahrenbach, 1970; Kemper, 1983). Essas proteínas são denominadas hemocianinas e são responsáveis pelo transporte de oxigênio na hemolinfa (Burmester, 2013). A hemocianina também está envolvida na cascata de fenoloxidase e apresenta

também fragmento com atividade antifúngica, como a rondonina, descrita na aranha *Acanthoscurria rondoniae* (Riciluca, 2012).

Inicialmente os estudos realizados com sistema imunológico de artrópodes tinham como foco os insetos, como por exemplo, as pesquisas desenvolvidas com moscas da espécie *Drosophila melanogaster*, onde é possível se obter as primeiras descrições de ação de cascatas proteolíticas e o papel de receptores do tipo “toll like” na resistência contra infecções causadas por bactérias Gram-positivas e fungos (Belvin, Anderson, 1996; Ferrandon, 2007).

1.1.1 Cascata de coagulação

Um dos eventos mais importantes da resposta humoral é a ativação da cascata de coagulação. Esse processo em aranhas e escorpiões é pouco investigado, porém, em limulídeos da espécie *Tachypleus tridentatus* (Ordem Xiphosura), foi descrito que se inicia pelo contato de moléculas como, por exemplo, LPS presentes em bactérias Gram-negativas, com receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, presentes nos hemócitos circulantes da hemolinfa (Kawabata, 2009).

A ativação desses receptores resulta na liberação dos grânulos presentes nos granulócitos, que armazenam componentes da cascata proteolítica, o que leva à coagulação da hemolinfa evitando assim a sua perda, a entrada de outros microrganismos e a sua morte (Fukuzawa, 2008). A ativação da cascata de coagulação se inicia pelo fator C, esse fator sofre uma auto clivagem na presença de bactérias Gram-negativas ou LPS, tornando-se o fator C' ativado, que cliva o fator B ativando-o para o fator B', o fator de coagulação B' ativado, é responsável pela clivagem de enzimas pró-coagulantes, que convertem o coagulogênio em homopolímeros de coagulina (Iwanaga, Lee, 2005). Outra via para a formação do coágulo, é a ativação do fator G para o fator G' ativado, essa clivagem é realizada na presença de β -1,3-D-glucano presentes em fungos e em algumas bactérias (Kawabata, 2010). O fator G' ativado converte enzimas pró-coagulantes, provocando a formação de coagulina provinda do coagulogênio (Osaki, Kawabata, 2004). Esse modelo visto em limulídeos provavelmente poderia ser aceito em aranhas e escorpiões, considerando que todos são quelicerados.

1.1.2 Cascata de fenoloxidase

O processo de ativação da cascata de fenoloxidase é similar à ativação da cascata de coagulação, onde uma pró-enzima (profenoloxidase) é convertida em fenoloxidase e catalisa a oxidação de compostos fenólicos presentes na hemolinfa e na cutícula (Iwanaga, Lee, 2005). Essa conversão da pró-fenoloxidase para fenoloxidase se dá pela clivagem de uma ou duas serino proteases, que são ativadas por LPS, peptídeoglicanas e β -1,3-D-glucano, além de injúrias causadas aos tecidos (Kwon et al., 1997). A oxidação desses compostos leva à produção da melanina, que é uma substância responsável por processos de esclerotização da cutícula, cicatrização da ferida e defesa imunológica. A melanina, que é tóxica para os microrganismos e forma um gel resistente, leva o microrganismo invasor a morte por hipóxia (Söderhäll, Cerenius, 1998).

Em limúlídeos, a cascata de coagulação e a cascata de fenoloxidase possuem uma característica em comum: a mesma enzima que age na cascata de coagulação é capaz de clivar a hemocianina, resultando em uma enzima com atividade de fenoloxidase, sem que ocorra a clivagem de toda a cascata proteolítica (Nagai, Kawabata, 2000). Essa conversão é mediada pela ligação de 2 PAMs na subunidade α da hemocianina, esses PAMs foram descritos na espécie *Tachypleus tridentatus* e são denominados taquistatina e taquiplesina (Nagai et al., 2001).

1.1.3 Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Uma das vias de defesa do sistema imunológico que também está presente nos artrópodes é a produção de peptídeos com atividade antimicrobiana (PAMs) que são sequências de aminoácidos, menores do que 10 kDa. Grande parte dos PAMs descritos são catiônicos e anfipáticos, podem apresentar diferentes conformações, mecanismos de ação e alvos como bactérias, fungos, vírus e outras formas de parasitas. Os insetos estão entre os primeiros modelos utilizados para os estudos sobre os PAMs. Em insetos, a síntese de PAMs acontece nos corpos gordurosos, que liberam rapidamente esses peptídeos na hemolinfa com a finalidade de eliminar microrganismos que possam causar infecção (Bulet, Stocklin, 2005).

Diferentes PAMs foram caracterizados em outros seres vivos, como, por exemplo, peptídeos aniônicos provenientes de secreções da pele de anfíbios,

peptídeos catiônicos lineares de α -hélice de insetos, peptídeos catiônicos ricos em aminoácidos específicos encontrados em abelhas, peptídeos aniônicos e catiônicos que formam pontes dissulfeto, peptídeos aniônicos e catiônicos que são fragmentos de proteínas maiores, entre outros (Shai, 2002). Alguns peptídeos antimicrobianos podem ser classificados quanto a sua citotoxicidade, como hemolíticos que podem causar danos às células do sangue (eritrócitos), e peptídeos antimicrobianos não hemolíticos, que agem sobre o patógeno sem atacar células sanguíneas de mamíferos (Tellez, Castano, 2010).

Os PAMs podem apresentar distintos modos de ação como, por exemplo, a permeabilização na membrana celular, que acontece principalmente pelo fato da maioria dos PAMs apresentarem características catiônicas e anfipáticas, podendo se ligar a membrana celular, que é carregada negativamente em organismos procariotos. Ocorrendo essa interação eletrostática, é possível classificá-la como, por exemplo, o modelo barril-estável, modelo carpete ou a formação de poro toroidal (Figura 2) (Pasupuleti et al., 2012).

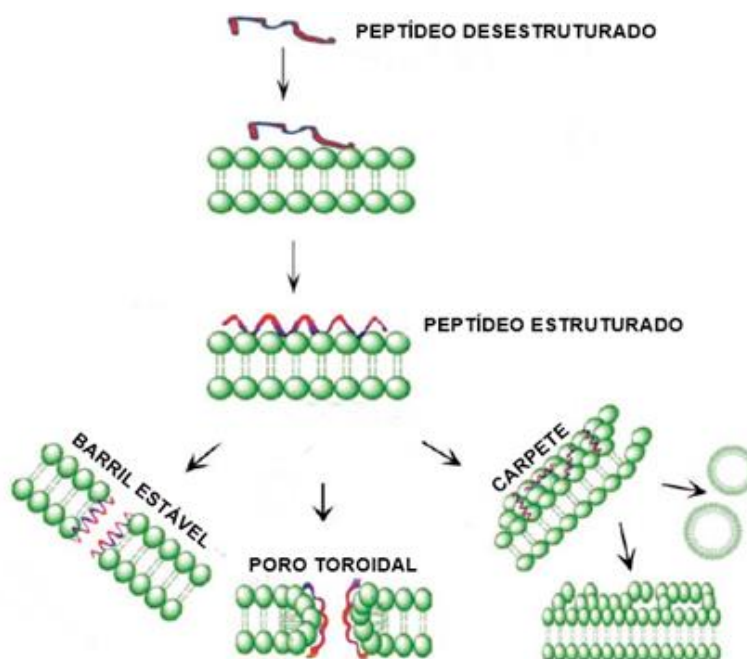


Figura 2- Modos de permeabilização de peptídeos antimicrobianos (PAMs) em membrana celular, esquema representativo de interação entre peptídeo antimicrobiano e membrana celular, mostrando os diferentes modelos de interação que levam o microrganismo a morte (modelo barril estável, poro toroidal e o modelo carpete) (Pasupuleti et al., 2012).

Um dos primeiros peptídeos antimicrobianos isolado em insetos foi a cecropina de *Hyalophora cecropia* (Ordem Lepidoptera), que apresenta atividade

antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, comprovando a eficácia dos PAMs como efetores no sistema imunológico inato dos artrópodes (Hultmark et al., 1983).

Em estudos realizados com aracnídeos por Fogaça e colaboradores (1999, 2004), foi detectada ação antimicrobiana proveniente de um peptídeo encontrado no intestino do carrapato de boi (*Boophilus microplus* / *Rhipicephalus microplus*). Este peptídeo antimicrobiano, que apresenta uma fração de aminoácidos (de 33 a 61 resíduos) correspondente à cadeia α da hemoglobina do boi, é de extrema importância para o carrapato, uma vez que este pode ingerir bactérias presentes no couro do boi.

Alguns peptídeos ricos em histidina possuem um espectro de ação dependente do pH, outros ainda podem apresentar ação interagindo com o DNA ou RNA, impedindo dessa forma a duplicação, transcrição ou síntese de proteínas (Figura 3). Alguns peptídeos agem na produção de peróxido de hidrogênio ou podem induzir algumas células à morte por vias apoptóticas (Brogden, 2003).

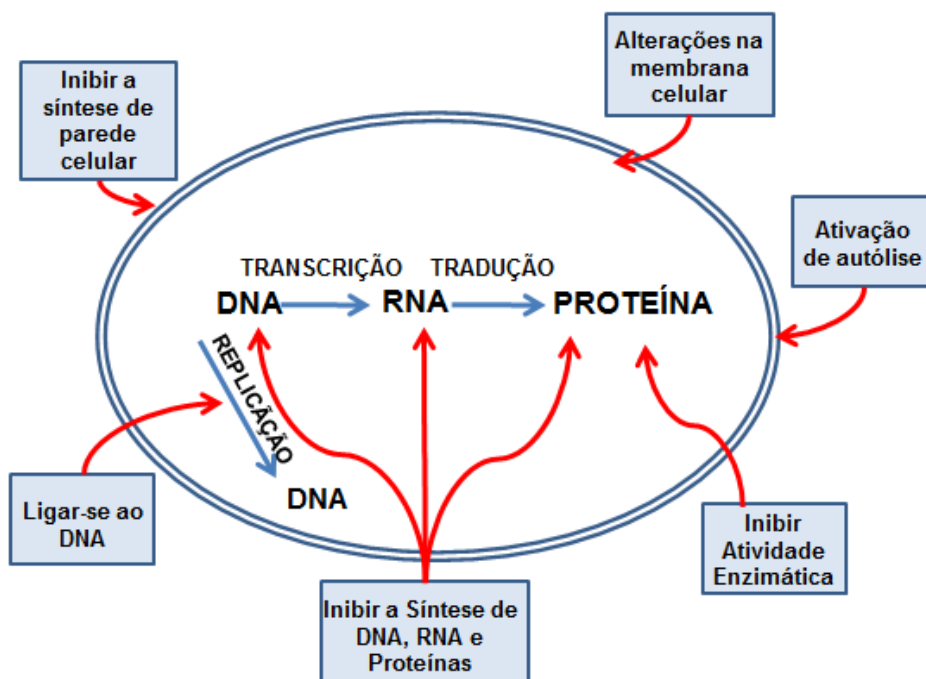


Figura 3- Mecanismos de ação descritos em PAMs. Esquema representativo, esquematizando outras formas de ação dos PAMs. Além da interação com a membrana celular, os PAMs também podem ativar vias que levam a autólise celular, ou ligar-se á moléculas como DNA, ou RNA impedindo os processos de replicação, transcrição e tradução. Em alguns casos os PAMs podem agir indiretamente em proteínas que apresentam atividade enzimática importante para o microrganismo (Brogden, 2005).

Em estudos realizados com aranhas foram encontradas moléculas antimicrobianas na hemolinfa da espécie caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*

(Silva Jr. et al., 2000). A Theraphosinina é um dos peptídeos encontrados no plasma que apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas. A partir dos hemócitos dessa aranha foram isoladas outras moléculas com atividade antimicrobiana: gomesina, acanthoscurrina e migalina (Silva Jr., 2000). A Migalina é uma acilpoliamina que apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas e também apresenta propriedades anticonvulsivantes (Godoy et al., 2013; Pereira et al., 2007)

A molécula gomesina é um peptídeo com um amplo espectro de atividade (antifúngica, antibacteriana e anti-leishmaniose) descrita também na espécie *Acanthoscurria gomesiana*. Entretanto a acanthoscurrina é um peptídeo rico em glicina com atividade contra bactérias do tipo Gram-negativas e leveduras. Ela apresenta similaridade com proteínas antifúngicas descritas em insetos e proteínas de defesas encontradas em plantas (Silva Jr., 2000)

Ainda no gênero *Acanthoscurria*, a espécie *A. rondoniae* teve o plasma de sua hemolinfa analisado quanto à atividade antimicrobiana e entre as frações caracterizadas, um peptídeo antifúngico foi isolado e denominado como rondonina sua massa molecular é de 1236,7 kDa. A rondonina é um fragmento da região C-terminal da subunidade D da hemocianina, proteína envolvida no transporte de oxigênio na hemolinfa dos artrópodes (Riciluca, 2011).

Estudos de ressonância magnética nuclear têm sido uma das técnicas utilizadas para elucidar estruturas de peptídeos antimicrobianos descritos em diferentes espécies (Holak et al., 1988). Essa técnica permite a análise da estrutural dos peptídeos, possibilitando assim uma melhor compreensão em como os PAMs podem interagir com moléculas. Muitos peptídeos são classificados de acordo com a sua estrutura em grupos, podendo ser classificados como: (a) ricos em determinados aminoácidos; (b) peptídeos antimicrobianos cíclicos; (c) defensinas (Nentwing, 2013).

1.1.3.1 Peptídeos antimicrobianos ricos em determinados aminoácidos

Esses peptídeos têm como principal característica que grande parte da sua sequência de aminoácidos é constituída por um único aminoácido, podendo ser ricos em glicinas, prolinas, histidinas ou outros aminoácidos. Peptídeos ricos em determinados aminoácidos, como glicinas, possuem de 71-73% aminoácidos constituindo a sua estrutura primária. São exemplos de peptídeos antimicrobianos

ricos em glicina são as acanthoscurrinas descritas na aranha mygalomorfa *Acanthoscurria gomesiana*. Essas duas acanthoscurrinas possuem 130 e 132 resíduos de aminoácidos com massa molecular em 10.1 e 10.2 kDa respectivamente. Esses peptídeos apresentam atividade antimicrobiana contra bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli* SBS 363) e contra levedura (*Candida albicans*), elas são moléculas constitutivas que ficam armazenadas em grânulos e são liberadas na hemolinfa durante uma infecção (Fukuzawa et al., 2008; Lorenzini et al., 2003).

Em araneomorfa da espécie *Cupiennius salei* três peptídeos ricos em glicina presentes na sua hemolinfa foram isolados e caracterizados. Esses peptídeos apresentam uma concentração elevada em resíduos de glicina (>70%) e atividade contra bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli*). Os peptídeos apresentam massas entre 8,8 e 9,6 kDa, também são constitutivos e estão presentes na hemolinfa desta aranha, onde ficam armazenados em grânulos presentes nos granulócitos (Baumann et al., 2010).

Como exemplos de peptídeos antimicrobianos ricos em resíduos de prolina, temos a drosocina e pyrrocoricina, ambos os peptídeos isolados de insetos. A drosocina foi isolada de mosca da fruta, espécie *Drosophila melanogaster*, e apresenta atividade antifúngica, sua sequência composta por 64 resíduos aminoácidos, sendo que 11 são resíduos de prolinas (Hoffmann et al., 1999). A pyrrocoricina é um peptídeo antimicrobiano isolado do *Pyrrhocoris apterus*, um inseto da ordem Hemiptera, apresenta sequência com 20 resíduos aminoácidos contendo 5 prolinas. Sua atividade é contra bactérias do tipo Gram-negativas (*Escherichia coli* 1106, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* D22 e *Enterobacter cloacae*) e bactérias Gram-positivas (*Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis*) (Bulet et al., 1999).

Em humanos foi caracterizado um peptídeo antimicrobiano rico em resíduos de histidinas, esse peptídeo antimicrobiano denominado histatina foi isolado de saliva humana e contém uma sequência com 57 resíduos de aminoácidos, sendo 7 histidinas. Esse peptídeo antimicrobiano apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos (Zasloff, 2002).

1.1.3.2 Peptídeos antimicrobianos cíclicos

A cecropina foi o primeiro peptídeo antimicrobiano descrito na literatura e após a caracterização da sua atividade, muitos trabalhos bioquímicos foram realizados para determinar a sua estrutura e entender o seu mecanismo de ação (Holak et al., 1988). Todas as cecropinas tendem a apresentarem uma forma cíclica na presença de co-solventes como trifluoroethanol, isso foi confirmado com estudos de ressonância magnética nuclear (RMN), com esses ensaios foi possível confirmar o padrão α -hélice na presença de álcool hexafluoroisopropanol. Essa estrutura garante para a cecropina características como anfipática e catiônica, comum a muitos outros PAMs descritos posteriormente a sua descoberta (Cammers-Godwin et al., 1996).

1.1.3.3 Defensinas

As defensinas são um grupo de PAMs, que tem como característica principal uma sequência de aminoácidos contendo seis cisteínas, geralmente apresentam sequências conservadas e esse conjunto de cisteínas formam pontes dissulfeto. As defensinas já foram descritas em mamíferos como os humanos (Ganz et al., 1985; Selsted et al., 1985), insetos (Ganz, Lehrer, 1995), vespa parasita da espécie *Nasonia vitripennis* (Tian et al., 2010), plantas (Thomma et al., 2002), e são encontradas também em fungos (Galgóczy et al., 2010).

Essas moléculas apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana podendo ser ativas contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e vírus envelopados. Algumas defensinas podem perder a sua atividade antimicrobiana em concentrações fisiológicas de Na^{1+} , Mg^{2+} ou Ca^{2+} (Bals et al., 1998; Singh et al., 1998).

Defensinas geralmente são classificadas de acordo com o padrão de ligação entre as cisteínas de sua sequência, por exemplo, as α -defensinas possuem de 29-35 resíduos de aminoácidos e as formações de pontes dissulfeto ocorrem entre as cisteínas: 1-6, 2-4 e 3-5. Já foram descritas mais de 30 α -defensinas somente em humanos. Enquanto que as β -defensinas são formadas por 36-42 resíduos de aminoácidos e suas cisteínas estão alinhadas no padrão: 1-5, 2-4 e 3-6, diferentes das α -defensinas, as β -defensinas apresentam uma quantidade maior de resíduos

de aminoácidos presentes na região do N-terminal (Schneider et al., 2005; Schutte et al., 2002).

Big defensas são peptídeos antimicrobianos que apresentam geralmente uma sequência de 79 aminoácidos, foi identificado em grânulos de limulídeos. A região do N-terminal deste peptídeo apresenta uma sequência de 37 aminoácidos que se assemelham as defensas descritas em humanos. O padrão de ligação entre as cisteínas que formam as pontes de sulfeto nas Big defensas é idêntico ao padrão de ligação encontrada nas β -defensas, o que diferencia as duas defensas é a massa das Big-defensas, algo em torno de 8 kDa em relação com as β -defensas que seriam em torno de 3-4 kDa (Iwanaga et al., 1998).

1.1.3.4 Peptídeos antimicrobianos isolados de escorpiões

Um dos trabalhos pioneiros no estudo de peptídeos antimicrobianos de escorpiões foi desenvolvido por Cociancich (1993), onde uma defesa foi isolada e caracterizada na hemolinfa do escorpião *Leiurus quinquestriatus*. Esse peptídeo apresenta 38 resíduos de aminoácidos e massa de 4321 Da, além de ter atividade antimicrobiana contra bactéria Gram-positiva da espécie *Micrococcus luteus*. Nesse trabalho foi possível identificar similaridade da defesa de escorpião com as defensas descritas em insetos e também com uma toxina isolada que compõe o veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus*.

Os estudos realizados com sistema imunológico de escorpiões são focados na produção de peptídeos antimicrobianos, como no trabalho desenvolvido por Ehret-Sabatier e colaboradores (1996), que isolaram e caracterizaram três peptídeos encontrados na hemolinfa do escorpião *Androctonus australis*: (1) androctonina, apresenta ação contra bactérias dos tipos Gram-positiva, Gram-negativa e fungo, é composta por 25 aminoácidos, possui duas pontes dissulfeto e massa molecular de 3076,7 Da. (2) buthinina, esse peptídeo de massa molecular 4605 Da apresentou atividade contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, possui três pontes dissulfeto e 34 resíduos de aminoácidos e (3) uma defesa contendo 37 resíduos de aminoácidos e massa de 4205,8 Da, apresentou similaridade com uma defesa isolada do inseto (*Aeshna cyanea*), assim como defensas descritas em insetos esse peptídeo, apresenta atividade contra bactéria Gram-positiva.

O trabalho mais recente descrevendo peptídeos antimicrobianos em hemolinfa de escorpiões foi realizado em 2004 por Rodríguez de la Vega e colaboradores, onde a defensina denominada CII-dlp foi isolada da hemolinfa do escorpião *Centruroides limpidus limpidus* e caracterizada quanto a sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativa. Esse peptídeo de 3821,3 Da possui 32 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto, característica presente em outras defensinas.

1.2 O Escorpião amarelo *Tityus serrulatus*

A ordem Scorpiones (escorpiões) pertence ao filo Arthropoda, apresenta aproximadamente 1500 espécies, distribuídas em 163 gêneros e 18 famílias (Brownell, Polis, 2001). Os escorpiões são animais quelicerados e estima-se que surgiram há 450 milhões de anos, no período siluriano, inicialmente no ambiente marinho (Fet et al., 2000). São animais vivíparos e em algumas espécies a reprodução se dá por partenogênese (Prendini, Wheeler, 2005;).

Entre as famílias de escorpiões identificadas no território brasileiro podemos citar: Bothriuridae, Chactidae, Liochelidae e Buthidae. Pertencente à família Buthidae, o gênero *Tityus* possui entre os seus representantes as espécies *Tityus bahiensis*, *Tityus stigmurus* e *Tityus serrulatus* que apresentam um interesse médico no Brasil, devido ao número e gravidade de acidentes escorpiônicos (Brazil, Porto, 2010). A espécie *Tityus serrulatus* (Figura 4), é endêmica do Brasil e pode ser localizada nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Distrito Federal e Goiás (Fundação Nacional da Saúde, 1998). Em alguns estados brasileiros como, Minas Gerais e São Paulo, o acidente escorpiônico é tido como caso de saúde pública e a maioria dos casos de óbito acomete crianças. Entre os casos de óbito por acidentes escorpiônico no Brasil o principal agente etiológico é o escorpião da espécie *Tityus serrulatus* (Candido, 1999; Fundacentro, 2001).

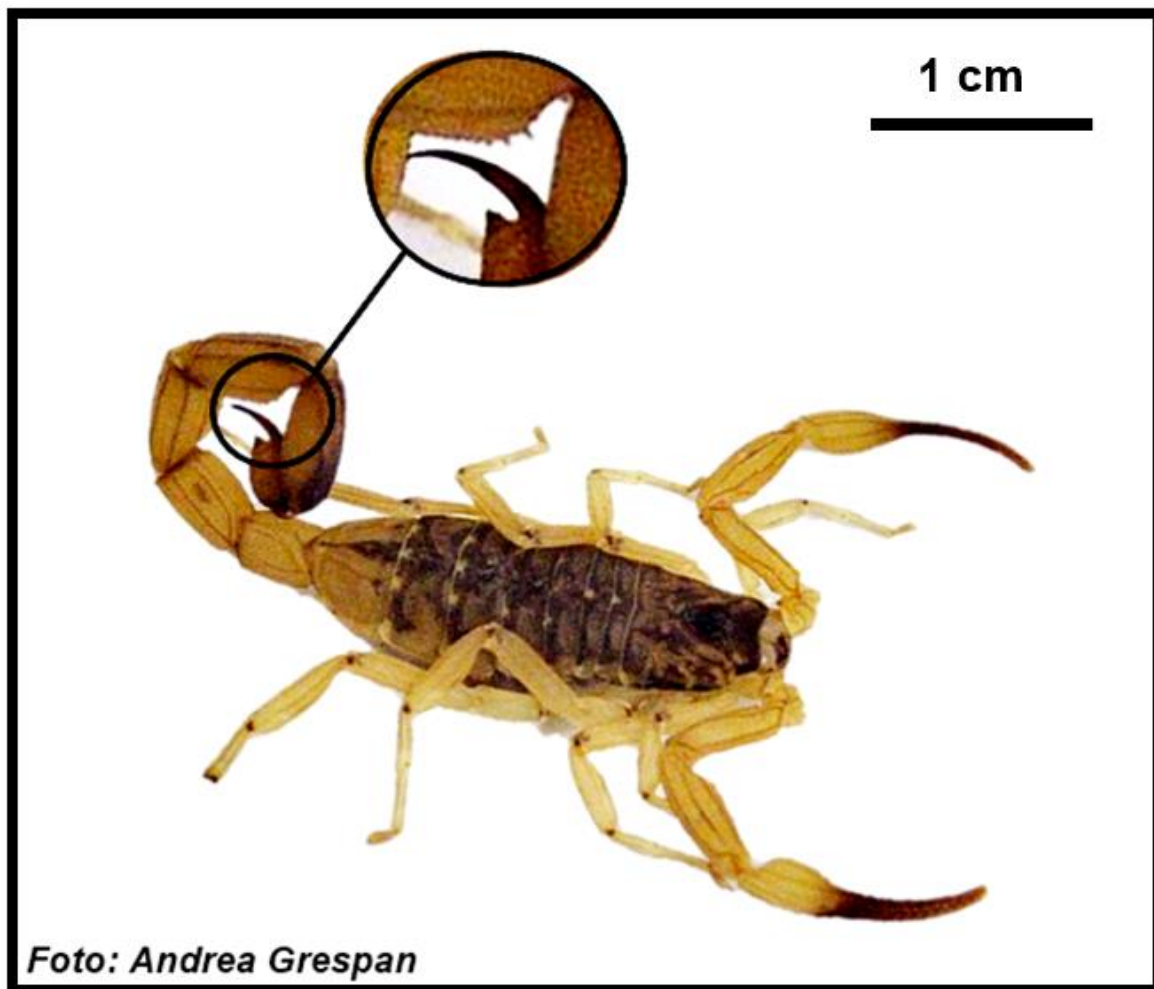


Figura 4: Exemplar do escorpião da espécie *Tityus serrulatus*. Escorpião da espécie *Tityus serrulatus* (Família: Buthidae; Gênero: *Tityus*), encontrado principalmente na região Sul e Sudeste do Brasil. Alimentam-se de pequenos insetos e outros aracnídeos. O escorpião *T. serrulatus* apresenta estruturas semelhantes a serras nos 3º e 4º segmentos do metassoma, o que caracteriza o nome da espécie.

Estudos com sistema imunológico de escorpiões são importantes para melhor compreender o funcionamento de alguns mecanismos que ainda não são bem compreendidos no sistema imune inato destes animais, como, por exemplo, quais são as moléculas que estão envolvidas nas vias de ativação dos mecanismos de defesas que resultam na eliminação de microrganismos patogênicos, ou quais são os peptídeos com atividade antimicrobiana presentes na hemolinfa deste animal, que favoreceram sua permanência por tanto tempo no planeta.

1.3 Justificativa

Em aracnídeos os peptídeos antimicrobianos conhecidos são produzidos constitutivamente (aranha, Silva Jr. et al., 2000), (carrapatos, Fogaça et al., 2004) e (escorpiões, Ehret-Sabatier et al., 1996), diferente de insetos onde são induzidos após uma infecção (Hultmark et al., 1983; Evans et al., 2006). Todos os trabalhos descrevendo a ação de peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa dos escorpiões das espécies *Leiurus quinquestriatus* (Cociancich et al., 1993), *Androctonus australis* (Ehret-Sabatier et al., 1996) e *Centruroides limpidus limpidus* (Rodríguez de la Vega et al., 2004), foram realizados com a análise da hemolinfa total. Neste trabalho utilizamos plasma e hemócitos separadamente e sem imunização prévia dos escorpiões.

Na década de 70, agentes antimicrobianos foram isolados de espécies de fungos e bactérias, esses agentes antibióticos apresentavam ação contra um amplo espectro de microrganismos patogênicos e foram comercializados com o intuito de combater infecções. Porém foi observado que décadas após a utilização desses antibióticos houve o surgimento de patógenos emergentes, que apresentavam resistência aos fármacos rotineiramente aplicados para tratamento de infecções (Reddy et al., 2004).

O estudo de peptídeos com atividade antimicrobiana torna-se atrativo visto que suas características como, ampla atividade contra microrganismos e tamanho, os tornam um produto de fácil síntese e estudo de suas propriedades, para a comercialização na indústria farmacêutica. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 2004, o uso indiscriminado de antibióticos é um dos principais contribuintes para uma seleção de microrganismos cada vez mais resistentes aos antibióticos comercializados atualmente, isso reforça ainda mais a busca por moléculas que apresentem atividade eficaz contra diferentes microrganismos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral a caracterização e identificação de peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa de escorpião, utilizando como modelo biológico a espécie *Tityus serrulatus*

2.2 Objetivos específicos

- Isolar moléculas que apresentem atividade antimicrobiana, presentes no plasma e nos hemócitos, respectivamente.
- Caracterizar essas moléculas quanto a sua massa, , atividade antimicrobiana e similaridade com outras moléculas já descritas na literatura.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais e coleta de hemolinfa

Os escorpiões da espécie *Tityus serrulatus* foram coletados no estado de São Paulo sob as licenças, SISBIO 11024-3 e CGen nº 001/2008 e 010345/2014-0, e mantidos no biotério do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada-LETA do Instituto Butantan (São Paulo-SP). Os animais foram mantidos em condições adequadas com o controle de temperatura e a alimentação constituída por insetos periodicamente.

Foram extraídos, em média, 20 µL de hemolinfa por escorpião (total de 50 escorpiões) totalizando aproximadamente 1 mL por extração, através da punção cardíaca do vaso dorsal, com o auxílio de uma seringa hipodérmica e apirogênica, na presença de tampão anticoagulante de citrato de sódio (NaCl 0,45 M; glicose 0,1 M; citrato trissódico 30 mM; ácido cítrico 26 mM; EDTA 10 mM) e pH 4,6 (2 volumes de hemolinfa: 1 volume de tampão) (Söderhäll, Smith, 1983).

Após a extração da hemolinfa, a amostra foi centrifugada a 800 x g durante 15 minutos a 4 °C para a separação dos hemócitos e do plasma. O plasma e os hemócitos foram congelados e armazenados a -20 °C separadamente, para os processos de fracionamento.

3.2 Primeira etapa de fracionamento da hemolinfa

3.2.1 Fracionamento dos hemócitos

Os hemócitos, referentes a 1 mL de hemolinfa, foram homogeneizados em 5 mL de ácido acético 2 M, com o auxílio de um homogeneizador Dounce. A amostra foi mantida em agitação no gelo por 30 minutos. Após centrifugação a 16000 x g por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de Sep-Pak® C18, equilibrada em água ultrapura e acidificada com ácido trifluoracético-TFA 0,05%, com o objetivo de iniciar o fracionamento da amostra.

Três estágios de eluições foram realizados, utilizando, sucessivamente, diferentes concentrações de acetonitrila-ACN 5%, 40% e 80%, acidificada com TFA 0,05%. Com a utilização de uma centrífuga a vácuo (Savant Instrument Inc®), foram

concentradas as frações obtidas na etapa anterior. Para ressuspender a amostra foi utilizada água ultrapura acidificada com TFA 0,05%, e em seguida, as frações foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência utilizando uma coluna de fase reversa-CLAE-FR. A purificação por CLAE-FR foi realizada a uma temperatura constante, utilizando o sistema UFLC-Shimadzu. A absorbância monitorada a 225 nm e 280 nm.

As frações obtidas nas diferentes concentrações de ACN (5, 40 e 80%), foram aplicadas a uma coluna de fase reversa semi-preparativa Júpiter[®] C18 (10 µm; 300 Å; 10 mm x 250 mm) e as eluições realizadas por gradientes de ACN em água acidificada com TFA 0,05% de 0 a 20%, 2 a 60% e 20 a 80%, respectivamente, por 60 minutos, sob um fluxo de 1,5 mL/min. As frações correspondentes aos picos foram coletadas manualmente, concentradas em centrífuga a vácuo, e reconstituídas em 500 µL de água ultrapura.

A presença de atividade antimicrobiana nessas frações foi determinada por ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido, em cada etapa de fracionamento das moléculas.

3.2.2 *Fracionamento do plasma*

O plasma foi ressuspensionado em água ultrapura acidificada com TFA 0,05% em 20 vezes o volume da hemolinfa coletada. A solução foi mantida em agitação constante no banho de gelo por 30 minutos, depois a amostra foi centrifugada a 16000 x g, a 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi aplicado em uma coluna descartável Sep-Pak[®] C18, equilibrada com água ultrapura acidificada com TFA 0,05%. Três eluições foram realizadas, utilizando sucessivamente diferentes concentrações de ACN (5, 40 e 80%) em água acidificada com TFA 0,05%.

As frações obtidas na etapa anterior foram concentradas em uma centrífuga a vácuo, ressuspensionadas em água ultrapura acidificada e submetidas à CLAE-FR. A purificação por CLAE-FR foi realizada em temperatura constante, utilizando o sistema UFLC- Shimadzu. A absorbância foi monitorada a 225 nm e 280 nm utilizando os mesmos gradientes descritos no item 3.2.1.

As frações correspondentes aos picos da CLAE-FR foram coletadas manualmente, concentradas em uma centrífuga a vácuo e reconstituídas em 500 µL de água ultrapura. A presença da atividade antimicrobiana nessas frações foi

determinada por ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido, em cada etapa de purificação das moléculas.

3.3 Bioensaios

3.3.1 *Microorganismos*

As frações que foram submetidas ao ensaio de inibição de crescimento em meio líquido foram testadas contra os seguintes microrganismos:

- *Escherichia coli* SBS 363 (Bactéria Gram-negativa).
- *Micrococcus luteus* A270 (Bactéria Gram-positiva).
- *Candida albicans* MDM8 (Levedura).
- *Aspergillus niger* (Fungo filamentoso).

3.3.2 *Ensaio de inibição de crescimento de microrganismo em meio líquido PB e PDB*

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizado o ensaio de inibição de crescimento microbacteriano em meio líquido. Foram testadas 20 µL correspondentes a cada fração, ou de água (controle positivo para o crescimento), ou de antibiótico (controle negativo para o crescimento), aplicados em microplaca de 96 poços (Figura 5), em seguida foram adicionados 80 µL de meio de cultura, meio pobre PDB (Poor Dextrose Potato Broth - 1/2 PDB: 1,2 g Dextrose de Batata em 100 ml de H₂O, pH 5,0; 79 mOsM) para leveduras e fungos, e PB (Poor Broth - PB: 1.0 g Peptona em 100 ml de H₂O, 86 mM NaCl; pH 7,2; 217 mOsM) para bactérias, contendo em suspensão, uma cultura de microrganismo em fase de crescimento logarítmica (10⁵). A medida de absorbância das culturas foi realizada em um leitor de microplaca Victor³ (1420 Multilabel Counter/Victor³ – Perkin Elmer) a 595 nm, após 24 horas de incubação no caso de bactérias e 36 horas para fungos a 30 °C (Bulet et al., 1993).

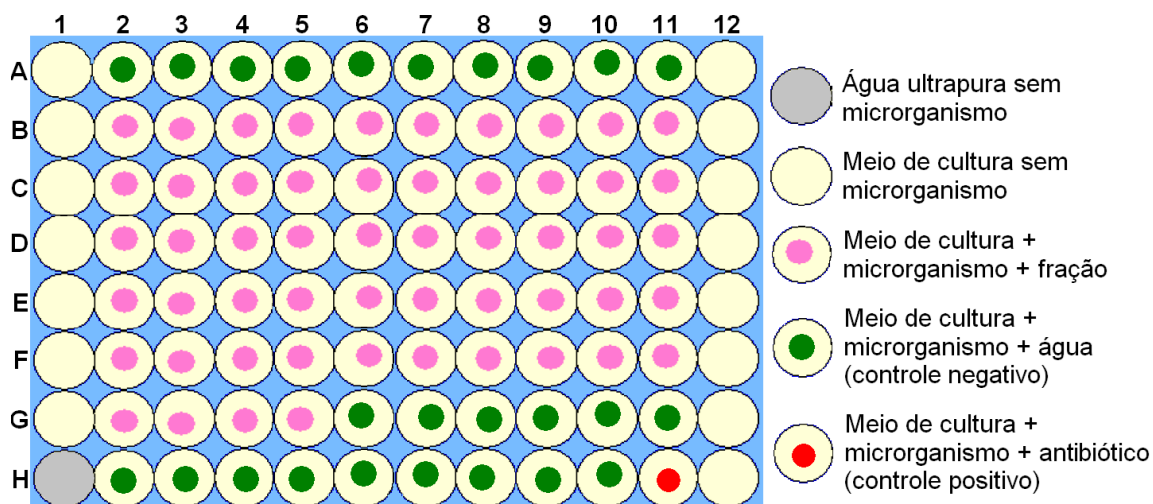


Figura 5- Ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido. Para a realização do teste de inibição de crescimento em meio líquido, foram utilizados 20 μ L de cada fração (poços cor de rosa \bullet) para cada poço + 80 μ L de meio de cultura contendo microrganismo em fase de crescimento exponencial. Como controle positivo foi utilizado o meio de cultura com microrganismo + água ultrapura (poços verdes \bullet); como controle negativo foi utilizado meio de cultura com microrganismo + antibiótico (poço vermelho \bullet).

3.3.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

As amostras que apresentaram atividade antimicrobiana foram submetidas à inibição de crescimento microbiano em meio líquido, como descrito anteriormente (item 3.3.2), ao qual utilizando uma placa de 96 poços a amostra passou por uma diluição seriada em água ultrapura, partindo do volume de 20 μ l, em que a amostra apresentou atividade. Após 24 horas para o crescimento do microrganismo testado, a placa de 96 poços foi submetida à leitura por absorbância a 595 nm utilizando um leitor de microplaca Victor³ (1420 Multilabel Counter/Victor³ – Perkin Elmer). Foi considerada a concentração mínima inibitória-CMI, o intervalo de concentrações entre [a] e [b], onde [a] é a concentração máxima do peptídeo testada na qual o microrganismo ainda está crescendo e [b] é a menor concentração do peptídeo que causa 100% de morte do microrganismo (Bulet, 1993).

3.3.4 Ensaio hemolítico

O sangue de um doador humano saudável foi coletado na presença de um tampão de citrato de sódio (150 mM; pH 7,4), centrifugado por 15 minutos a 700 x g,

lavado três vezes e ressuspendido em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM; pH 7,4). A mesma concentração do peptídeo que apresentou atividade antimicrobiana foi testada em triplicata em um volume de 50 µL, em diferentes concentrações (diluição seriada), adicionando mais 50 µL de uma solução 3% (v/v) de eritrócitos humanos em PBS.

A microplaca com fundo “U” foi incubada por 3 horas a 37 °C. O sobrenadante foi transferido para uma nova microplaca de fundo chato e usado para medir a absorbância-Abs (λ = 405 nm) em um leitor de placa Victor³ (1420 Multilabel Counter/ Victor³- Perkin Elmer). As medidas de absorbância do sobrenadante para 0 e 100% de hemólise foram obtidas com 50 µL da solução 3% de hemácias em 50 µL de PBS (controle negativo) e Triton X-100 0,05% (controle positivo), respectivamente. O valor da absorbância foi determinado pela média da triplicata (método modificado de Hao et al, 2009). A porcentagem de hemólise do peptídeo foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{Abs}_{405 \text{ nm da solução peptídeo}} - \text{Abs}_{405 \text{ em PBS}}}{\text{Abs}_{405 \text{ em Triton 0,1\%}} - \text{Abs}_{405 \text{ em PBS}}}$$

3.4 Caracterização estrutural

3.4.1 Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page

A eletroforese, SDS-PAGE, foi preparada seguindo o protocolo desenvolvido por Laemmli, 1970; Walker, 1994, em concentrações de 10 e 20% de poliacrilamida. O gel de empilhamento (stacking gel) foi preparado na concentração de 4,5% de poliacrilamida, e as amostras foram aquecidas em tampão de amostra (250 mM Tris-HCl pH 6,8; 300 mM SDS; 1 mM azul de bromofenol; 40% glicerol; 8% β-mercaptoetanol) antes de serem aplicadas ao gel. Como marcadores de massa molecular padrão, foi utilizado o SeeBlue Pre-Stained (Life Technologies®).

Utilizando a quantificação por NanoDrop, aproximadamente 20 µg de cada fração foram aplicados no gel. O tampão de corrida (250 mM de glicina, 25 mM de Tris e 3 mM de SDS), foi preparado utilizando reagentes de alta pureza (Sigma). Os mini-géis foram preparados nas dimensões de 85 x 80 x 1 mm no sistema de eletroforese vertical DIGEL, modelo DGV10. Para a separação das amostras foi

utilizada uma fonte KASVI, com voltagem fixa em 120 V durante todo o processo. Para a visualização de bandas no gel, foi utilizada a coloração por Comassie Blue (45% metanol, 10% ácido acético, 3 mM coomassie brilliant blue R-250) .

Em casos onde não foi possível a identificação de bandas, os géis foram corados com nitrato de prata seguindo o protocolo de Bassam et al. (1991) com algumas modificações.

3.4.2 Quantificação da proteína por espectrofotometria

Para quantificar as amostras foi realizada a quantificação de proteínas por meio da leitura de absorbância em 405 nm, utilizando-se 1 µL de amostra no espectrofotômetro modelo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, EUA) de espectro completo (190 a 940 nm). Para determinar a concentração de proteínas e peptídeos foram empregados os comprimentos de onda de 280 nm e 205 nm, respectivamente.

3.4.3 Digestão em gel

As bandas reveladas no gel de eletroforese foram coradas como descritas anteriormente, extraídas do gel com o auxílio de uma lamina e submetidas ao processo de digestão "*In gel*" utilizando como enzima a tripsina (Sigma-aldrich®). As bandas reveladas no gel de eletroforese foram coradas como descritas anteriormente, extraídas do gel com o auxílio de uma lamina e submetidas ao processo de digestão "*In gel*" utilizando como enzima a tripsina (Sigma-aldrich®). Para retirar o Comassie, foram utilizados 0.5 ml da solução "Destain" (metanol 50%/ ácido acético 5% em água deionizada), as bandas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida a solução "destain" foi descartada e para desidratar o gel foram aplicados 200 µl de acetonitrila (100%), amostras forma incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente e em seguida a acetonitrila foi descartada.

Para a redução das amostras foram utilizados 30 µL da solução de DTT 10 mM (1,5 mg de DTT em 1 ml de bicarbonato de amônio 100mM), incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a remoção do DTT, foi aplicada a solução de IAA 50mM (9 mg de IAA em 1 ml de bicarbonato de amônio 100 ml), as amostras

foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a remoção da solução de IAA, foram realizados os processos de desidratação utilizad-se a solução de ACN 100% por 30 minutos, e para reidratação a solução de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos. Como enzima para a fragmentação das amostras foi utilizada uma solução de tripsina (100 µg/ 2 ml de bicarbonato de amônio 50mM), foram utilizados 16 µL dessa solução por banda extraída, as amostras permaneceram a 37 °C por aproximadamente 12 horas. O protocolo foi utilizado como descrito por Hanna et al, 2000, com alguma modificações.

3.4.4 Digestão “in solução”

Para as amostras coletadas manualmente por CLAE-FR, concentradas e ressuspendidas em água ultrapura, a presença de pontes dissulfeto nos peptídeos purificados da hemolinfa pode ser avaliada pela redução e alquilação dos resíduos de Cys presentes nas moléculas usando os procedimentos descritos por Stone, Willians (1996).

Uma alíquota de 10 µL do peptídeo seco foi dissolvida em 20 µL de NH_4HCO_2 0,4 M. A essa solução adicionou-se 5 µL ditioneitol (DTT) 45 mM. A amostra foi mantida a 50 °C por 15 minutos. Após resfriada em temperatura ambiente, foram adicionados 5 µL de iodocetamida (Iaa) 100 mM e mantida em temperatura ambiente por 15 minutos, protegida da luz. Adicionou-se 130 µL de água ultrapura para a diluição da ureia e 2 µL de tripsina, a amostra foi incubada a 37 °C por 12 horas. Para interromper a reação acrescentou-se 130 µL de água acidificada com TFA 0,1%. A solução obtida foi concentrada em centrifuga a vácuo e dessalinizada em coluna Zip Tip[®] C18.

3.5 Espectrometria de massas

Amostras tratadas (reduzidas com DTT, alquiladas com Iaa e digerida por tripsina) ou não) foram reconstituídas em 10 µL de solução de ácido fórmico 0,1% e analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem - LC-MS/MS, utilizando-se o espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific Inc.) acoplado ao sistema de nano-cromatografia líquida

Easy-nLCII (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Foram injetados automaticamente 5 μL de cada amostra em uma pré-coluna Júpiter C-18 (10 μm ; 100 μm x 50 mm) (Phenomenex) acoplada a uma coluna da fase reversa analítica ACQUA C-18 (5 μm ; 75 μm x 100 mm) (Phenomenex).

As amostras foram eluídas em gradiente linear 5 a 95% de solvente B (0,1% ácido fórmico em ACN) por 15 minutos, sob fluxo de 200 nL/min. A fonte de ionização por electrospray - ESI foi operada em modo positivo, com a voltagem e temperatura ajustadas para 2,0 kV e 200 °C, respectivamente. O intervalo de varredura de massas considerado para o “full scan” (MS1) foi de 200 - 2000 m/z (resolução de 60.000 em 400 m/z), operando no modo “data dependent acquisition” - DDA, onde os cinco íons mais intensos por scan foram selecionados para o evento de fragmentação por dissociação induzida por colisão, “collision induced dissociation” - CID. O sinal mínimo requerido para disparar eventos de fragmentação (MS2) de determinado íon foi ajustado para 5.000 cps, e o tempo de exclusão dinâmica utilizado foi de 30 segundos.

3.6 Análises bioinformáticas

Os dados obtidos por espectrometria de massas, pelo equipamento LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific Inc.), foram convertidos pelo programa MSConvert para serem analisados pela ferramenta Mascot®, proveniente da Matrix Science® (disponível em <http://www.matrixscience.com/mascot>). Para a análise, utilizando a ferramenta Mascot®, foram ativados os seguintes parâmetros: carbamidometilação das cisteínas como variáveis e como enzima utilizada para a fragmentação das amostras foi selecionada a tripsina (Sigma-aldrich®), as demais opções foram selecionadas de acordo com o perfil “default” da ferramenta Mascot®.

Os arquivos analisados no Mascot® foram submetidos à buscas em bancos de dados, como o SwissProt, NCBI ou ScorpionTser (escorpião *Tityus serrulatus*), usando em alguns casos filtros como “arachnida”. Os resultados que apresentaram os melhores “scores” foram selecionados.

Para a análise dos resultados obtidos pela espectrometria de massas foi utilizado também o software PEAKS 7.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Ontario, Canadá). Através da função PEAKS DB, os espectros das amostras que apresentaram atividade, foram comparados com peptídeos antimicrobianos

depositados nos bancos de dados National Center for Biotechnology Information-NCBI e no Universal Protein Resource-UNIPROT. As análises foram feitas com tolerância de erro de 10 ppm e de 0.6 Da para o íon precursor e para os fragmentos, respectivamente. A carbamidometilação das cisteínas foi utilizada como uma modificação pós-traducional fixa, enquanto a oxidação das metioninas e a acetilação dos N-terminais foram utilizadas como modificações variáveis. Os fragmentos que apresentaram similaridades com moléculas dos bancos de dados foram submetidos a buscas no Basic Local Alignment Search Tool- BLASTp (Altschul et al., 1997).

3.7 Análise em banco de dados do transcriptoma do escorpião *Tityus serrulatus*

Os resultados obtidos no software Peaks, referentes às amostras que apresentaram atividade, foram submetidos a buscas em banco de dados do transcriptoma da glândula de veneno do escorpião *T. serrulatus* desenvolvido por Oliveira et al. (em fase de elaboração)¹ e no banco de dados do transcriptoma do intestino da espécie *T. serrulatus*. Dessa forma foi possível obter a sequência da molécula (Fuzita, 2015).

3.8 Alinhamento de estrutura primária de proteínas

Para alinhar e comparar estruturas primárias de moléculas que apresentam similaridades foram utilizadas as ferramentas “Muscle” (disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), em seguida os arquivos em formato “.fasta” foram editados na ferramenta “BoxShade” (disponível em : http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

¹Oliveira, U.C.; Nishiyama-Jr, M.Y.; Santos, M.B.V.; Silva, A.P.S.; Chalkidis, H.M.; Imberg, A.S.; Candido, D.M.; Yamanouye, N.; Dorce, V.A.C.; Junqueira -de-Azevedo, I.L.M. Proteomics endorsed transcriptomics profile of the venom gland from *Tityus* scorpions. São Paulo; 2017.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Plasma

4.1.1 Frações com atividade antimicrobiana do plasma, eluídas em 5% de ACN.

O extrato ácido eluído com 5% de ACN (referente a 1 mL de hemolinfa) foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (FR-CLAE) (Figura 6). Os picos foram coletados manualmente, concentrados, ressuspensos em 500 µL de água ultrapura e avaliados quanto à atividade antimicrobiana por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido, contra diferentes microrganismos. Entre as frações eluídas do plasma em 5%, as frações 2, 8 e 12 apresentam atividade antimicrobiana contra a bactéria *Micrococcus luteus*. A fração 2 apresenta também atividade antimicrobiana contra a levedura *Candida albicans* MDM8 e contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* SBS 363 e essas frações estão destacadas na figura 6 e (Tabela 1).

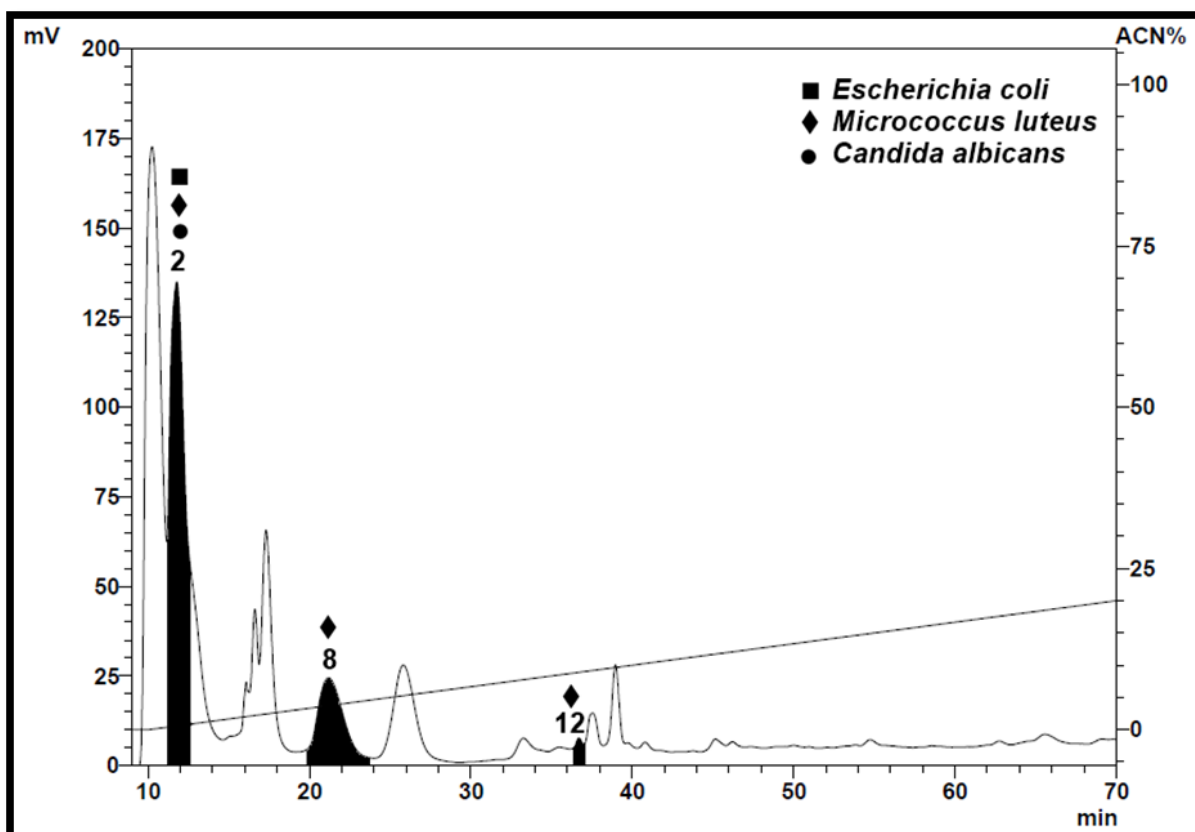


Figura 6 – Cromatografia líquida de alta eficiência das amostras do plasma eluídas em 5% de acetonitrila-ACN. Após a primeira etapa de fracionamento por coluna Sep-pak® C18, as amostras do plasma eluídas em 5% de ACN foram submetidas a uma cromatografia líquida de alta eficiência de

fase reversa (CLAE- FR), usando uma coluna semi-preparativa Jupiter® C18 com gradiente linear de 0 a 20% de ACN em TFA 0,05% por 60 minutos em um fluxo de 1,5 mL/minuto. As frações foram coletadas manualmente e submetidas ao teste de inibição de crescimento microbiano em meio líquido. Frações TSP05%-02, TSP05%-08 e TSP05%-12 apresentaram atividade contra o microrganismo *Micrococcus luteus* A270 (bactéria Gram-positiva ♦). A fração TSP05%-02 apresentou também atividade contra os microrganismos *Escherichia coli* SBS 363 (bactéria Gram-negativa ■) e *Candida albicans* MDM 8 (levedura ●).

A fração TSP5%-2 apresenta atividade antimicrobiana na concentração de 36 µg/mL. Em seguida a sua atividade citotóxica contra eritrócitos humanos foi avaliada, e a fração apresentou citotoxicidade contra hemácias humanas do tipo sanguíneo A+, na mesma concentração que apresenta atividade antimicrobiana (dados não mostrados). Alguns peptídeos antimicrobianos apresentam atividade hemolítica, é o caso, por exemplo, da Pantinina, um peptídeo antimicrobiano isolado do veneno do escorpião *Pandinus imperator*, que possui massa de 1545 Da e, apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas como *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus* e contra bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Pseudomonas putida*. Apesar da sua ação contra microrganismos esse peptídeo possui ação hemolítica, contra eritrócitos humanos nas concentrações acima de 32 µM (49 µg) (Zeng, 2013).

Com o objetivo de verificar a homogeneidade das amostras foi realizada a análise de eletroforese, aproximadamente 10 µg das frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram aplicados em um gel de poliácridamida (SDS-PAGE 20%). Na eletroforese das frações TSP05%-2, TSP05%-8, TSP40%-2 e TSP80%-2 não foram visualizadas bandas no gel quando corado por Azul de Coomassie. O mesmo gel foi submetido à coloração com nitrato de prata, para identificar outros fragmentos, porém não houve o aparecimento de outras bandas (dados não mostrados).

4.1.2 Frações com atividade antimicrobiana do plasma, eluídas em 40% de ACN

O extrato ácido eluído em 40% de ACN foi submetido à CLAE-FR utilizando-se uma coluna semi-preparativa Júpiter® C18 (Figura 7). Os picos foram coletados manualmente, concentrados, ressuspensos em 500 µL de água ultrapura e avaliados quanto à atividade antimicrobiana por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido, contra diferentes microrganismos. As frações TSP40%-2, TSP40%-

29 e TSP40%-32, apresentaram atividade antimicrobiana contra bactéria Gram-positiva *M. luteus* A270. Sendo que, a amostra TSP40%-2 apresentou também atividade contra levedura *Candida albicans* MDM8 (Figura 7) (Tabela 1).

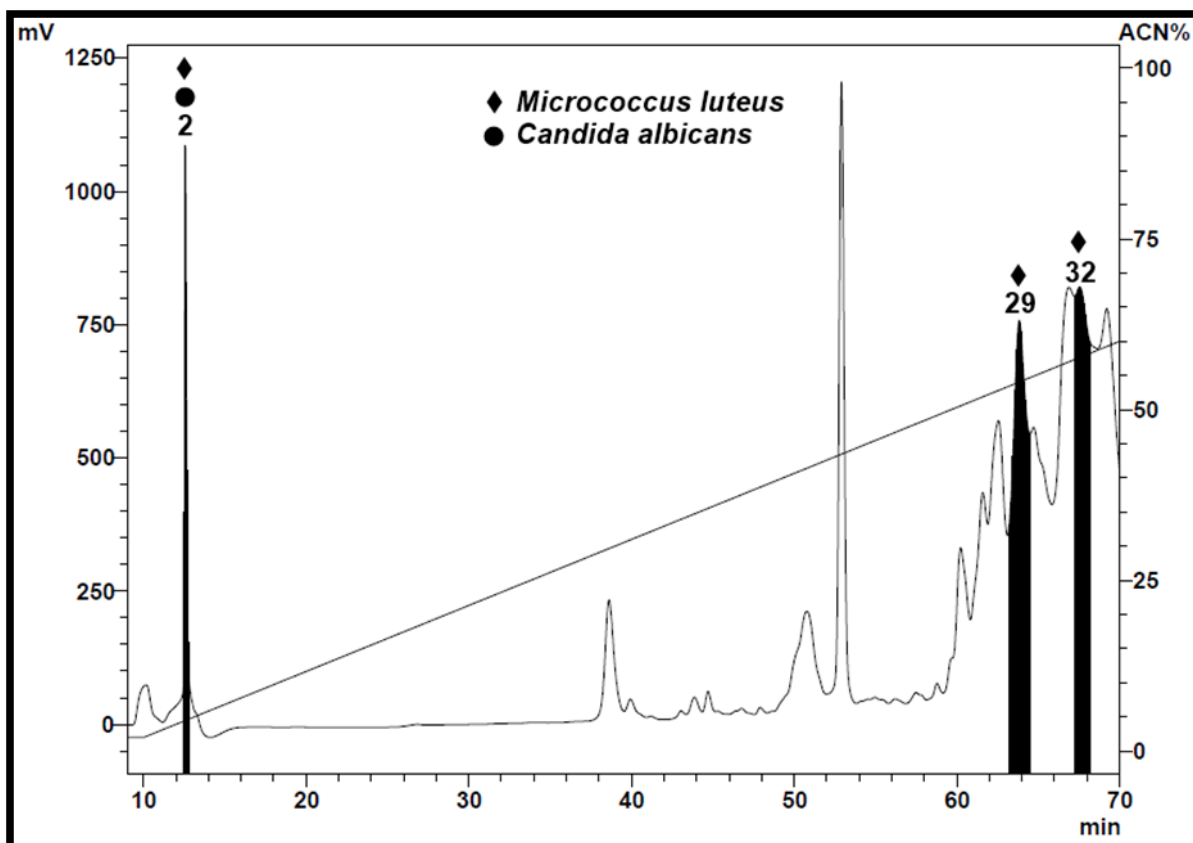


Figura 7 – Cromatografia líquida de alta eficiência das amostras do plasma eluídas em 40% de acetonitrila-ACN. Após a primeira etapa de fracionamento por coluna Sep-pak® C18, as amostras do plasma eluídas em 40% de ACN foram submetidas a uma cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE- FR), usando uma coluna semi-preparativa Jupiter® C18 com gradiente linear de 2 a 60% de ACN em TFA 0,05% por 60 minutos em um fluxo de 1,5 mL/minuto. As frações foram coletadas manualmente e submetidas ao teste de inibição de crescimento microbiano em meio líquido. Frações TSP40%-02, TSP40%-29 e TSP40%-32 apresentaram atividade contra o microrganismo *Micrococcus luteus* A270 (bactéria Gram-positiva ◆). A fração 2 apresentou também atividade contra *Candida albicans* MDM8 (levedura ●).

4.1.3 Frações com atividade antimicrobiana do plasma, eluídas em 80% de ACN

O extrato ácido eluído em 80% de ACN foi submetido à CLAE-FR usando-se uma coluna semi-preparativa Júpiter® C18. Os picos foram coletados manualmente. Em seguida todas as frações foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana em inibição de crescimento em meio líquido. De todas as frações testadas, a amostra TSP80%-2 apresentou atividade contra a bactéria Gram-positiva, *M. luteus* A270 (Figura 8) (Tabela 1).

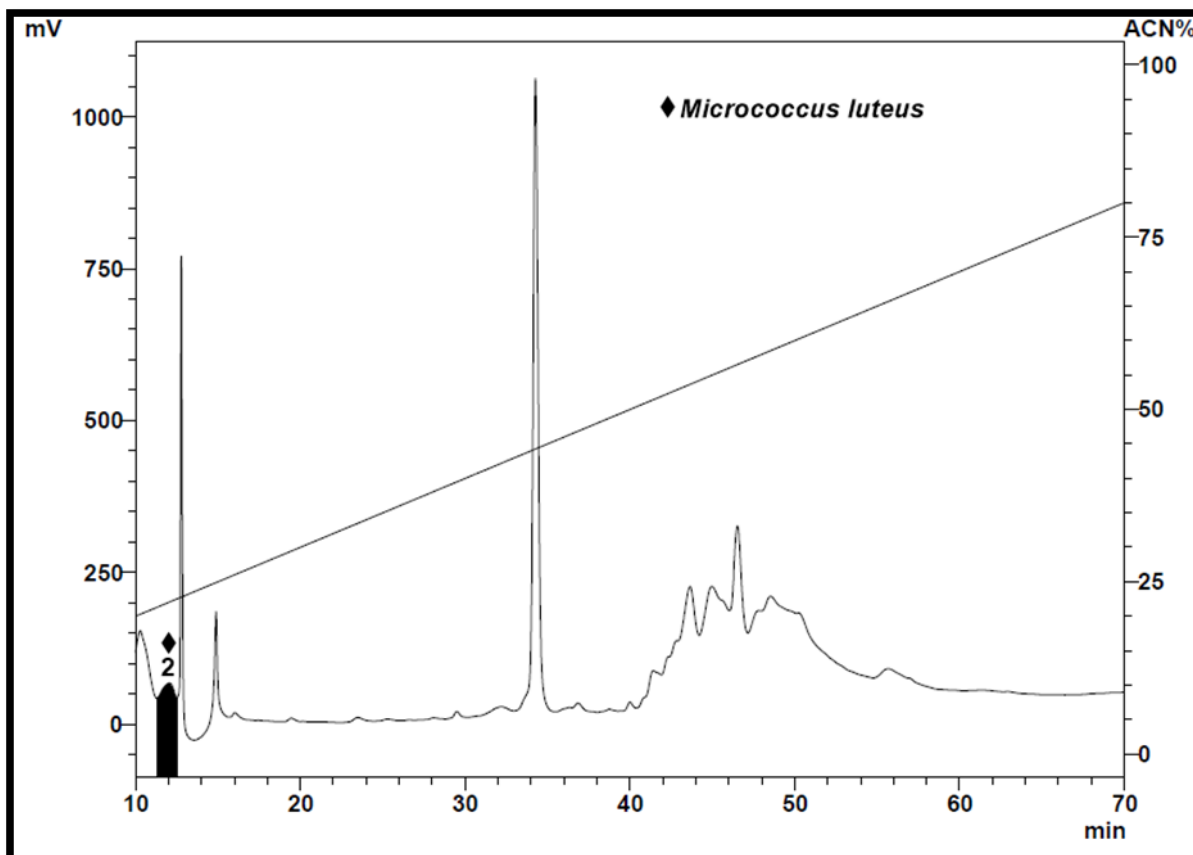


Figura 8 – Cromatografia líquida de alta eficiência das amostras do plasma eluídas em 80% de acetonitrila-ACN. Após a primeira etapa de fracionamento por coluna Sep-pak® C18, as amostras do plasma eluídas em 80% de ACN foram submetidas a uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando uma coluna semi-preparativa Jupter® C18 com gradiente linear de 20 a 80% de ACN em TFA 0,05% por 60 minutos em um fluxo de 1,5 mL/minuto. As frações foram coletadas manualmente e submetidas ao teste de inibição de crescimento microbiano em meio líquido. A fração TSP80%-02 apresentou atividade contra o microrganismo *Micrococcus luteus* A270 (bactéria Gram-positiva ♦).

4.1.4 Análise dos fragmentos por espectrometria de massas

As frações do plasma que apresentaram atividade antimicrobiana foram digeridas em solução utilizando-se como enzima a tripsina. O material gerado foi aplicado a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific Inc.) e os dados foram analisados por ferramentas de bioinformática como Mascot® e Peaks® contra diferentes bancos de dados, para identificar similaridades com proteínas já depositadas, ou identificar a sequência primária de alguma das moléculas presentes nas frações. As frações no plasma do *T. serrulatus*, que apresentaram atividade antimicrobiana, não apresentaram similaridade com proteínas e peptídeos antimicrobianos conhecidos, podendo indicar que essas

frações sejam novas moléculas que não apresentam similaridade com moléculas já descritas anteriormente.

Tabela 1 - Frações com atividade antimicrobiana do plasma do escorpião da espécie *Tityus serrulatus*. Frações coletadas manualmente por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR), e que após o teste de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido apresentaram atividade antimicrobiana contra os diferentes microrganismos testados. Frações que apresentaram atividade antimicrobiana (+) e que não apresentaram atividade antimicrobiana (-) nas diferentes frações do plasma.

Frações		MICROORGANISMOS			
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Candida Albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
		SBS 363	A270	MDM 8	
PLASMA	TSP05%-02	+	+	+	-
	5% TSP05%-08	-	-	-	+
	TSP05%-12	-	-	-	+
	TSP40%-02	-	+	+	-
	40% TSP40%-29	-	+	-	-
	TSP40%-32	-	+	-	-
	80% TSP80%-02	-	+	-	-

4.2 Hemócitos

4.2.1 Frações com atividade antimicrobiana dos hemócitos, eluídas em 5% de ACN.

O extrato ácido de hemócitos eluído em 5% de ACN em SepPak[®] C18 foi submetido à cromatografia líquida (CLAE-FR). As frações correspondentes ao picos foram coletados manualmente, concentradas à vácuo, ressuspendidas em água ultrapura e tiveram sua atividade antimicrobiana analisadas por ensaio de inibição de crescimento microbiano (Figura 9). Das frações coletadas apenas TSH05%-12 apresentou atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados: bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* A270, bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* SBS 363, fungo filamentoso *Aspergillus niger* e também atividade antimicrobiana contra a levedura *Candida albicans* MDM8 como podemos ver assinalado na figura 9 (Tabela 3).

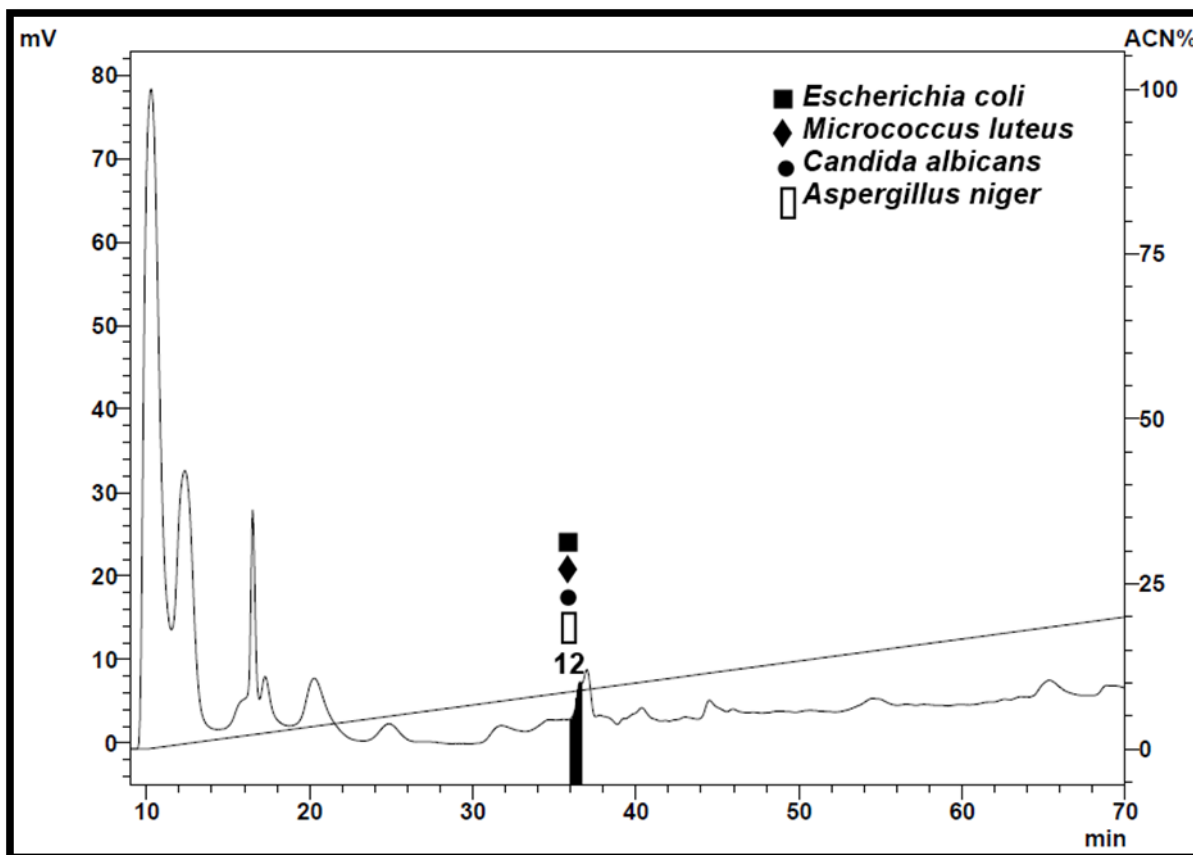


Figura 9 – Cromatografia líquida de alta eficiência das amostras dos hemócitos eluídas em 5% de acetonitrila-ACN. Após a primeira etapa de fracionamento por coluna Sep-pak® C18, as amostras dos hemócitos eluídas em 5% de ACN foram submetidas a uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando uma coluna semi-preparativa Júpter® C18 com gradiente linear de 0 a 20% de ACN em TFA 0,05% por 60 minutos em um fluxo de 1,5 mL/minuto. As frações foram coletadas manualmente e submetidas ao teste de inibição de crescimento microbiano em meio líquido. A fração TSH05%12 apresentou atividade contra todos os microrganismos testados: *Escherichia coli* SBS 363 (Bactéria Gram-negativa ■), *Micrococcus luteus* A270 (Bactéria Gram-positiva ◆), *Candida albicans* MDM 8 (Levedura ●) e *Aspergillus niger* (Fungo filamentososo □).

4.2.2 Frações com atividade antimicrobiana dos hemócitos, eluídas em 40% de ACN.

O extrato ácido de hemócitos eluído em 40% de ACN em SepPak® C18 foi submetido à cromatografia líquida (CLAE-FR). As frações correspondentes aos picos foram coletadas manualmente, concentradas à vácuo, ressuspensas em água ultrapura e tiveram sua atividade antimicrobiana analisadas por ensaio de inibição de crescimento microbiano. Nesta etapa de fracionamento, 7 frações apresentaram atividade antimicrobiana: TSH40%-29, TSH40%-30, TSH40%-31, TSH40%-32, TSH40%-33, TSH40%-34 e TSH40%-39 (Tabela 3). Todas as frações apresentaram

atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus* A270, a fração denominada 39 apresentou também atividade antimicrobiana parcial contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* SBS 363, e a fração 33 apresentou atividade contra todos os microrganismos testados como podemos ver assinalado na figura 10 (Tabela 3).

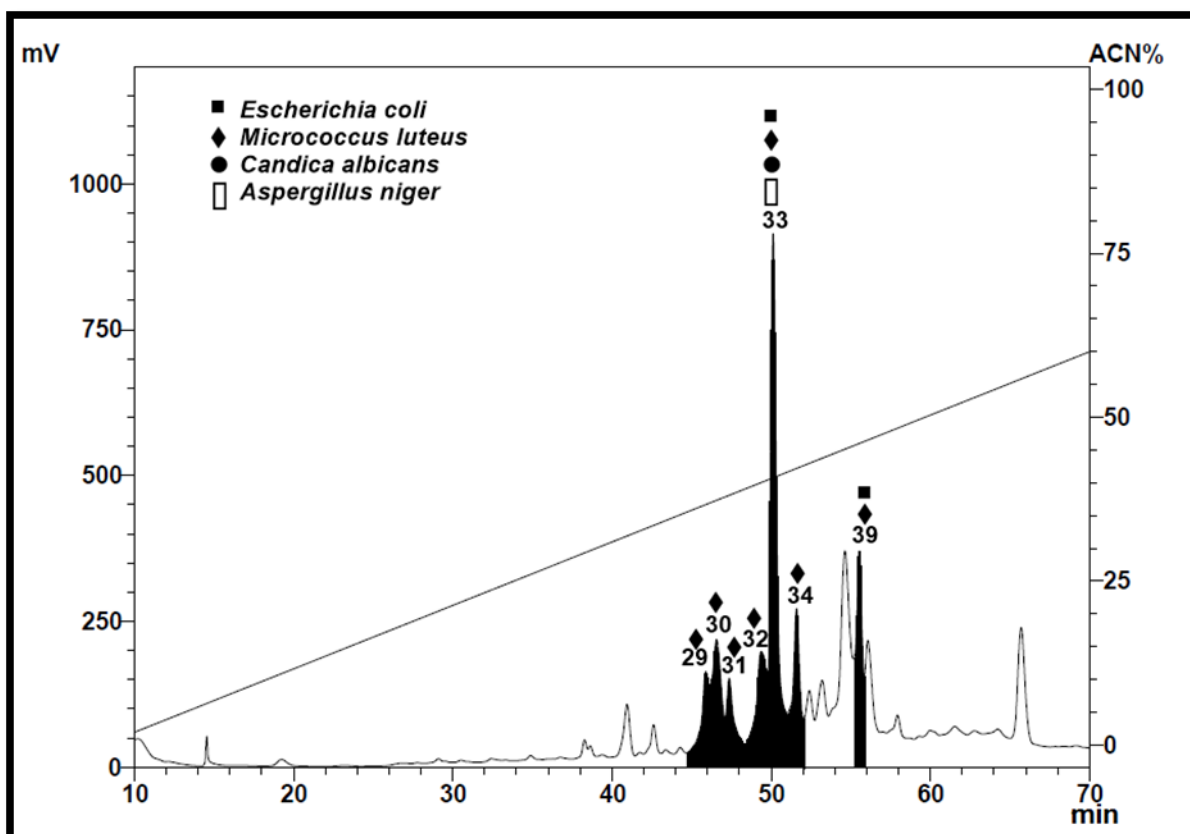


Figura 10 – Cromatografia líquida de alta eficiência das amostras dos hemócitos eluídas em 40% de acetonitrila-ACN. Após a primeira etapa de fracionamento por coluna Sep-pak® C18, as amostras dos hemócitos eluídas em 40% de ACN foram submetidas a uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando uma coluna semi-preparativa Júpter® C18 com gradiente linear de 2 a 60% de ACN em TFA 0,05% por 60 minutos em um fluxo de 1,5 ml/minuto. As frações foram coletadas manualmente e submetidas ao teste de inibição de crescimento microbiano em meio líquido. As frações 29, 30, 31, 32, 34 e 39 apresentaram atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus* A270 (Bactéria Gram-positiva ♦). A amostra 39 ainda apresentou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* SBS 363 (Bactéria Gram-negativa ■). A fração 33 apresentou atividade contra todos os microrganismos testados: *Escherichia coli* SBS 363 (Bactéria Gram-negativa ■), *Micrococcus luteus* A270 (Bactéria Gram-positiva ♦), *Candida albicans* MDM 8 (Levedura ●) e *Aspergillus niger* (Fungo filamentososo □).

Para verificar a homogeneidade das frações com atividade antimicrobiana, aproximadamente 10 µg de cada fração (NanoDrop 2000) foi aplicado em um gel na concentração de 20% de poliacrilamida (SDS-PAGE). Como podemos observar na figura 11 todas as amostras se mostraram heterogêneas. As bandas obtidas por eletroforese foram cortadas do gel com o auxílio de uma lâmina, tratadas com

tripsina e os fragmentos da digestão analisados por espectrometria de massas (LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific Inc.). Os dados obtidos foram analisados por ferramentas de bioinformática.

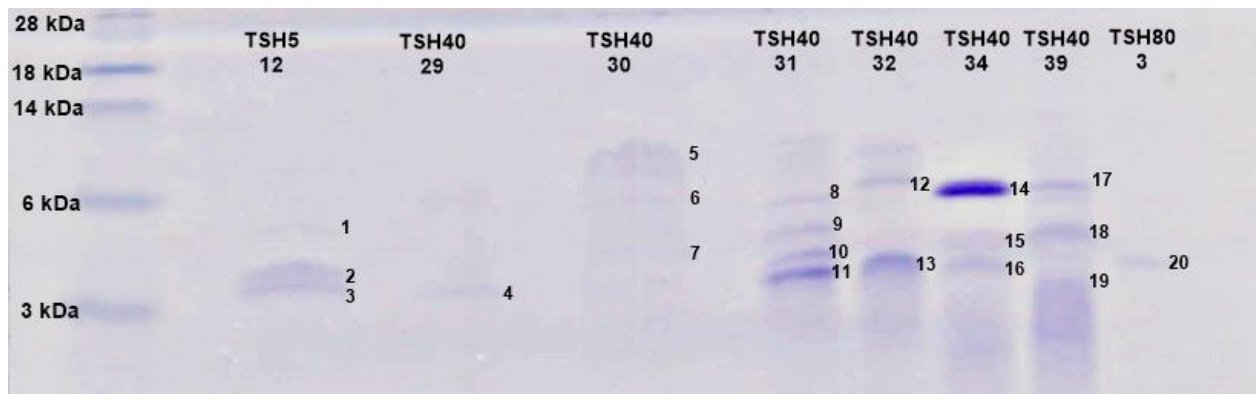


Figura 11- Análise por eletroforese das frações que apresentaram atividade antimicrobiana presentes nos hemócitos. As frações dos hemócitos que apresentaram atividade antimicrobiana foram quantificadas e aproximadamente 10 µg de cada fração foram aplicados à um gel com concentração de 20% de poliacrilamida (SDS-PAGE). Todas as frações apresentaram bandas entre 3 e 14kDa, indicando que as frações estavam heterogêneas. As bandas foram cortadas, submetidas ao processo de digestão “*in gel*”, usando como enzima a tripsina e os fragmentos foram aplicados em um espectrômetro de massas para analisar os resultados da digestão.

As frações que apresentaram atividade antimicrobiana também foram analisadas quanto a sua citotoxicidade frente a eritrócitos humanos. Essas frações foram incubadas com eritrócitos nas mesmas concentrações que apresentaram atividade antimicrobiana. Dessas frações somente TSH40%-39 (ativa em 48 µg/mL) apresentou atividade hemolítica a partir da concentração de 12 µg/mL (Figura 12), essa atividade corresponde a 3% de hemólise comparado com o controle positivo, Triton 0,1%. TSH40%-39 não se mostrou homogênea ao ser analisada por eletroforese (SDS-PAGE) onde foram observadas bandas entre 6 e 3 kDa (Figura 12). As demais frações de hemócitos não apresentaram atividade hemolítica nas concentrações testadas (dados não mostrados).

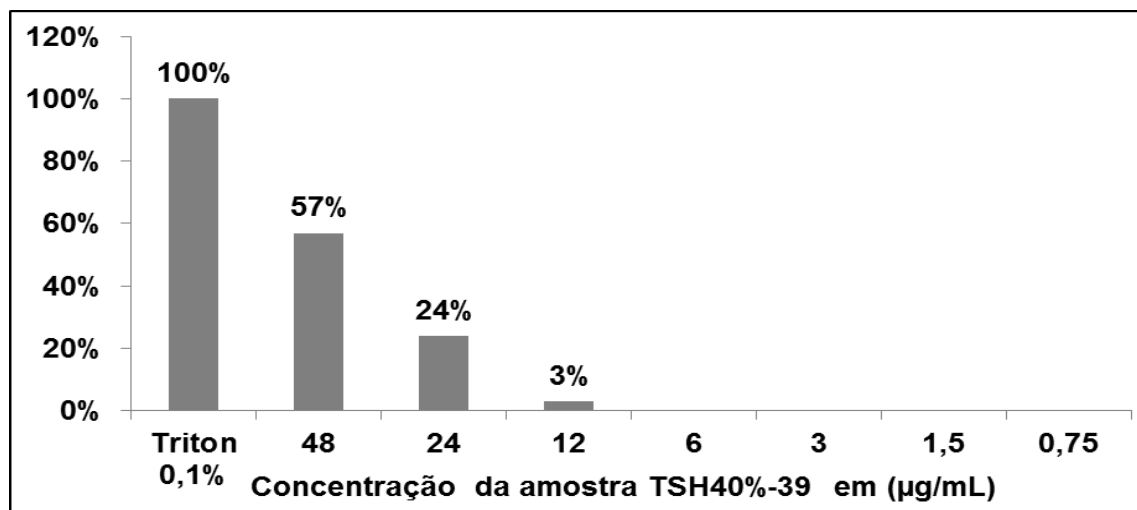


Figura 12 – Atividade hemolítica da fração TSH40%-39. A fração TSH40%-39 obtida na cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa – CLAE-FR apresentou inibição no crescimento microbiano em meio líquido. Em seguida a fração teve a sua atividade hemolítica avaliada contra eritrócitos humanos do tipo A+. A atividade hemolítica foi constatada a partir da concentração de 12 µg/mL. Nessa concentração a fração apresentou 3% de hemólise comparada com a solução controle Triton 0,1%(controle positivo).

Os peptídeos antimicrobianos descritos nos escorpiões das espécies *Leiurius quinquestriatus* e *Androctonus australis* foram isolados de frações eluídas em 40% de ACN provenientes da hemolinfa total destes escorpiões, em limulídeos foram descritos que os peptídeos antimicrobianos são armazenados em grânulos que são vesículas de tamanhos variados presentes nos granulócitos e liberados na presença de microrganismos patogênicos ou quando ocorre uma injúria (Iwanaga et al., 1998). Entre as frações eluídas em 40% de ACN provenientes dos hemócitos, a fração TSH40%-33 foi selecionada para uma melhor caracterização, visto que além das características mencionadas ela apresentou atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados (bactérias: Gram-positiva e Gram-negativa) e não apresentou atividade hemolítica (dados não mostrados).

A fração TSH40%-33 foi repurificada utilizando-se uma coluna de fase reversa analítica Shim-pack VP-ODS C18 (5 µm, 4,6 mm x 250 mm - Shimadzu), com um gradiente de 27-37% de ACN em 60 minutos, sob um fluxo de 1 mL/min (Figura 13). Após essa etapa de fracionamento, o único pico obtido foi coletado e submetido novamente ao teste de inibição crescimento de microrganismos em meio líquido. A molécula contida nessa fração manteve a atividade antimicrobiana para os microrganismos *E. coli* SBS 363 e *M. luteus* A 270 como podemos ver na figura 13 e Tabela 2.

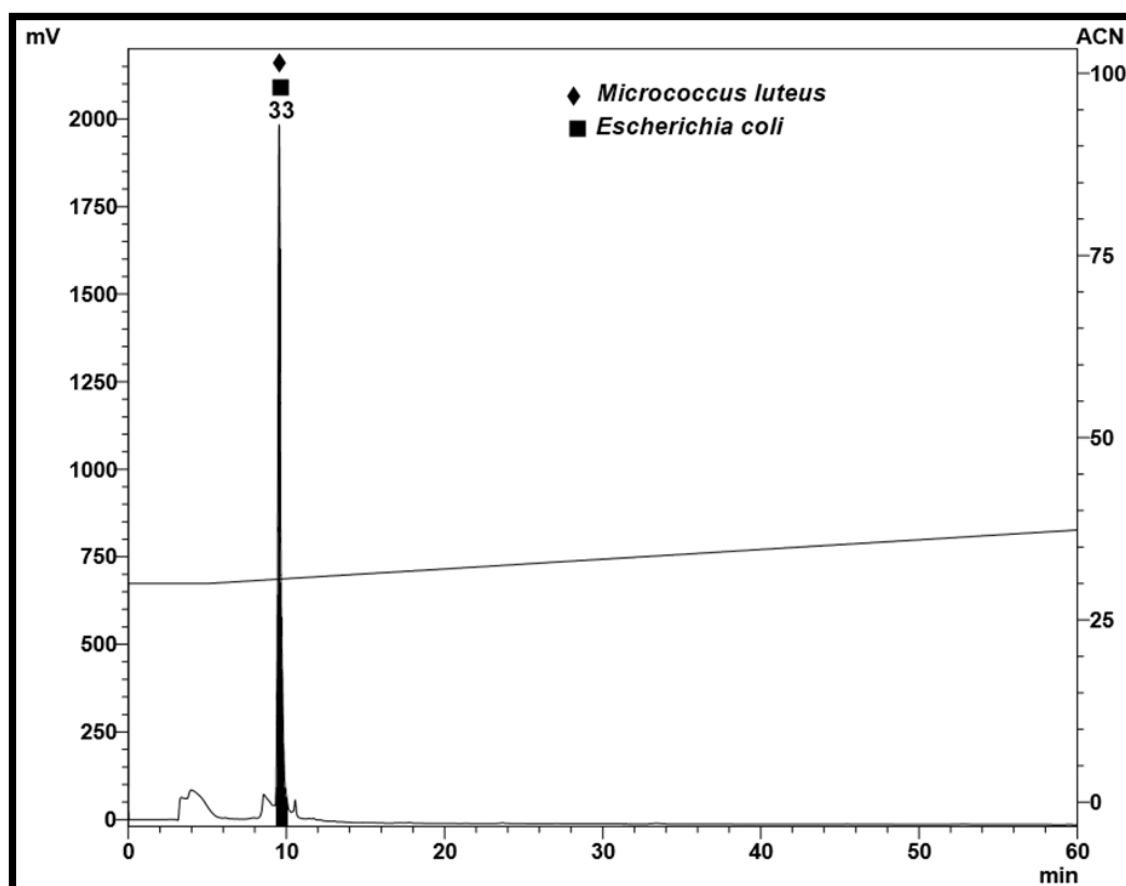


Figura 13 – Cromatografia líquida de alta eficiência da fração TSH40%-33. A amostra TSH40%-33 foi submetida a uma etapa adicional de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando desta vez uma coluna analítica Shimpak ODS® C18, com gradiente linear de 27 a 37% de ACN em TFA 0,05% por 60 minutos em um fluxo de 1 mL/minuto. As frações foram coletadas manualmente e submetidas ao teste de inibição de crescimento microbiano em meio líquido. O pico majoritário manteve a atividade antimicrobiana contra os microrganismos *Micrococcus luteus* A270 (Bactéria Gram-positiva ♦) e *Escherichia coli* SBS 363 (Bactéria Gram-negativa ■).

Após o processo de fracionamento e a confirmação do pico que manteve a atividade antimicrobiana, a fração TSH40%-33 teve a sua concentração inibitória mínima (CIM), definida para os microrganismos *Escherichia coli* SBS 363 e *Micrococcus luteus* A 270 em intervalos de 2 µg/mL - 4 µg/mL e 250 ng/mL - 500 ng/mL, respectivamente. A mesma placa que foi utilizada para definir a concentração mínima inibitória foi analisada novamente após 96 horas, e desta forma foi possível observar em quais concentrações os microrganismos retomaram o crescimento. A fração TSH40%-33 teve a sua concentração bacteriostática mínima (CBM), após 96 horas para a bactéria Gram-positiva *Escherichia coli* SBS 363, definida entre as concentrações de 16 µg/mL - 32 µg/mL e para a bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* A70 entre 2 µg/mL - 4 µg/mL (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bacteriostática mínima (CBM) da fração TSH40%-33. Após a segunda etapa de fracionamento a fração TSH40%-33 foi submetida ao teste de inibição de crescimento de microrganismos em meio líquido em diferentes concentrações (diluição seriada) para os microrganismos *Escherichia coli* SBS 363 e *Micrococcus luteus* A270. A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como o intervalo de concentrações entre [a] e [b], onde [a] é a concentração máxima do peptídeo testada na qual o microrganismo ainda está crescendo e [b] é a menor concentração do peptídeo que causa 100% de morte do microrganismo após 18 horas de incubação a 37°C e a concentração Bacteriostática Mínima (CBM) foi realizada com a observação da mesma placa após 96 horas de incubação. Contra a bactéria *Escherichia coli* SBS 363 a fração TSH40%-33 apresentou a concentração inibitória mínima (CIM) entre 2 µg/mL - 4 µg/mL e concentração bacteriostática mínima (após 96 horas) entre 16 µg/mL - 32 µg/mL. Para a bactéria *Micrococcus luteus* A270 a fração TSH40%-33 apresentou a concentração inibitória mínima (CIM) entre 0,25 µg/mL - 0,5 µg/mL e concentração bacteriostática mínima (após 96 horas) entre 2 µg/mL - 4 µg/mL.

Microrganismo	Concentração Inibitória Mínima (CIM)- Após 18 horas	Concentração Bacteriostática Mínima (CBM) – Após 96 horas
<i>Escherichia coli</i> SBS 363	2 µg/mL - 4 µg/mL	16 µg/mL - 32 µg/mL
<i>Micrococcus luteus</i> A 270	0,25 µg/mL - 0,5 µg/mL	2 µg/mL - 4 µg/mL

Em seguida a fração TSH40%-33 foi quantificada e aproximadamente 15 µg da amostra foi aplicada a um gel com concentração de 20% de poliacrilamida (SDS-PAGE). Através da análise da eletroforese da fração TSH40%-33 é possível identificar a presença de 2 bandas no gel, indicando que a amostra está heterogênea (Figura 14). Essas bandas (banda A e banda B), de aproximadamente 3 kDa, foram extraídas do gel com o auxílio de uma lâmina e submetidas ao processo de digestão “*in gel*”, utilizando-se como enzima a tripsina. Em seguida o material dessa digestão foi aplicado em um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific Inc.). Os arquivos obtidos pela espectrometria de massas foram analisados em softwares como Peaks®, utilizando como banco de dados os peptídeos antimicrobianos depositados no NCBI e UNIPROT.

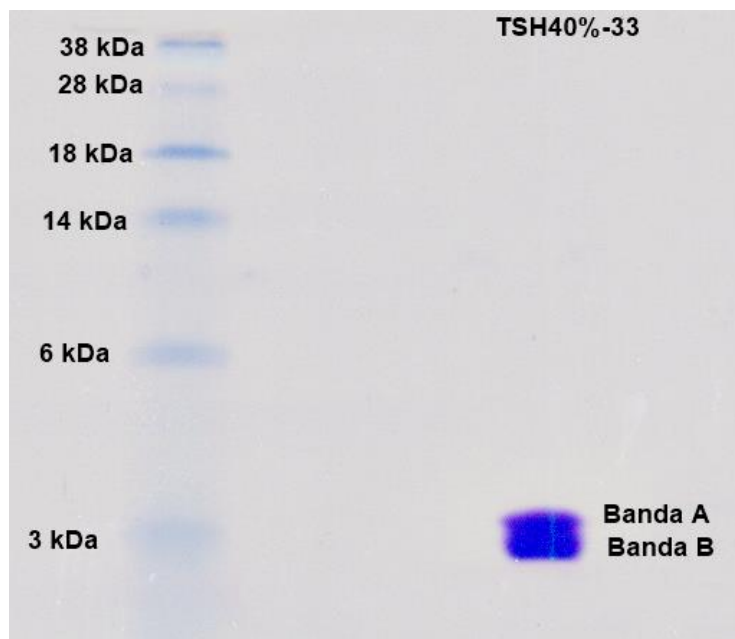


Figura 14 – Análise por eletroforese da amostra TSH40% - 33. Para identificar a massa e verificar a possível homogeneidade da amostra TSH40%-33, foi preparado um gel na concentração de 20% de poliacrilamida (SDS-PAGE). Foram aplicados 15 µg de amostra com tampão sem redução. Através da análise da eletroforese é possível identificar 2 bandas (banda A e banda B), próximo ao marcador de massa molecular correspondente a 3 kDa. Essas bandas foram recortadas e submetidas ao processo de digestão “*in gel*”. Os fragmentos obtidos pela digestão foram aplicados em um espectrômetro de massas e os resultados interpretados em ferramentas de bioinformática, como Mascot e Peaks.

Quando analisados os dados obtidos pela espectrometria de dados referentes a digestão da fração TSH40%-33 (Banda A) pelo software Peaks®, conseguimos identificar dois fragmentos o fragmento 1 formado pela sequência de aminoácidos: **ELVRVR** e o fragmento 2 formado pela sequência: **AGYCGGFLKKTICVM**. Esses fragmentos correspondentes a uma defensina isolada e caracterizada do carrapato da espécie *Ixodes scapularis* (Figura 15).

Essa molécula é pertencente à família de defensinas composta por peptídeos antimicrobianos como Scapularisinas e Scasinas, descritas em carrapatos das espécies *Ixodes scapularis* e *Ixodes ricinus*. Essa defensina tem variam de tamanho, como as defensinas descritas em outros organismos a maioria possui massa molecular em torno de 4 kDa, e assim como a TSH40%-33 apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativa (*Pseudomonas aeruginosa*) e Gram-positiva (*Micrococcus luteus*) nas concentra de 14 µM e 17 µM respectivamente (wang, Zhu, 2011).

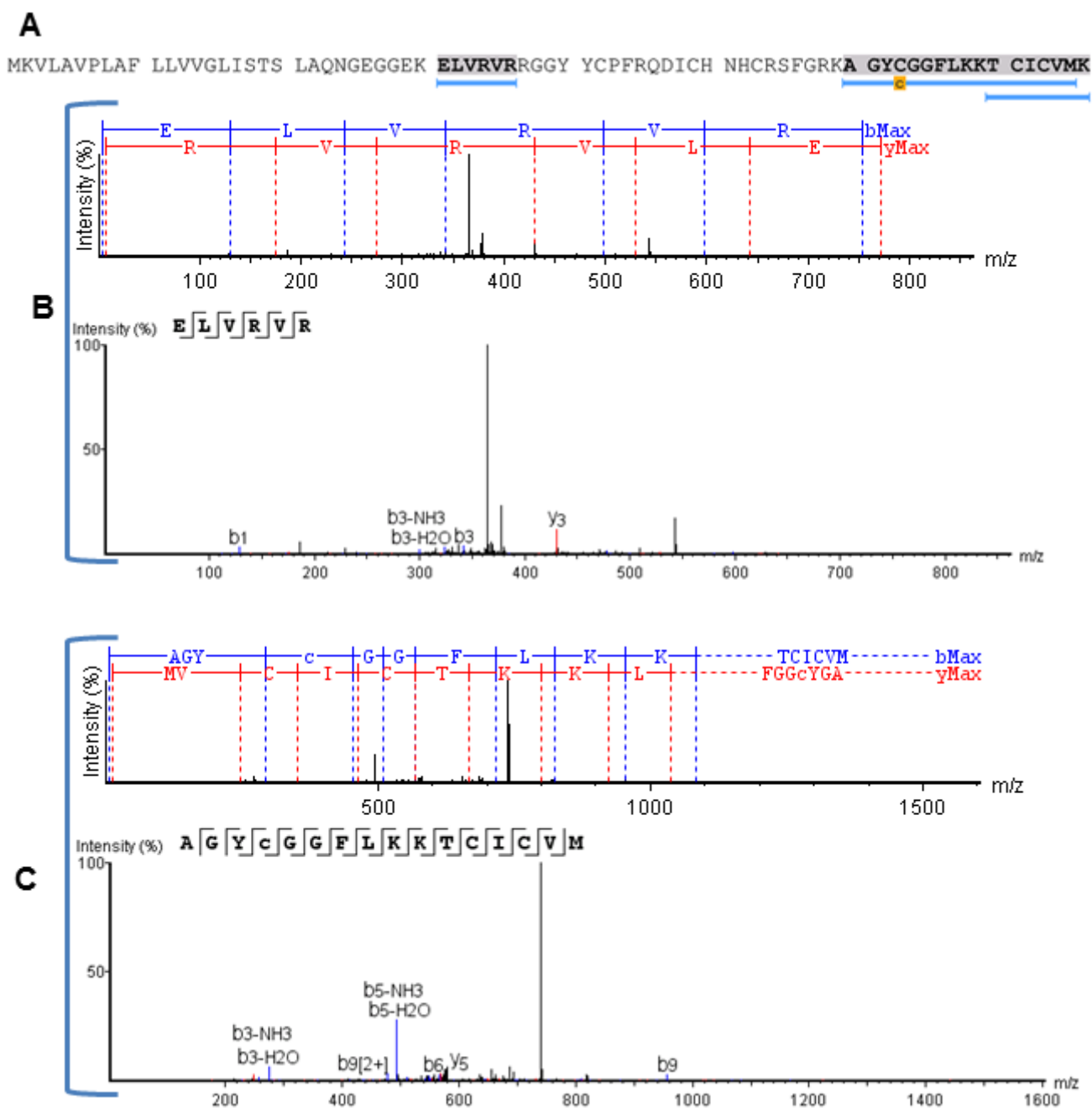


Figura 15 – Fragmentos da TSH40%-33 (Banda A) obtidos pelo software Peaks®. Na região superior a sequência completa da defensina do carrapato da espécie *Ixodes scapularis* (A), em cinza e grifado em azul na sequência da defensina, estão as regiões que mostraram similaridade com fragmentos analisados pela espectrometria de massas da amostra TSH40%-33 (Banda A). Abaixo a deconvolução dos resíduos de aminoácidos formada pela identificação dos os íons referentes à série b-y e a tabela de íons que compõem: (B) o fragmento **ELVRVR**, e (C) o fragmento **AGYCGGFLKKTICVM**.

Após a identificação dos fragmentos correspondentes a Banda A da fração TSH40%-33 pelo software Peaks, esses fragmentos foram selecionados para a

busca em banco de dados de proteínas transcritas na glândula de veneno do escorpião *T. serrulatus*, a busca também foi realizada em outro banco de dados com as proteínas transcritas do intestino da mesma espécie. Em ambos os bancos foi identificada uma proteína com similaridade com a defensina do carrapato *I. scapularis*.

Inicialmente a busca foi realizada no banco de dados do intestino do *T. serrulatus* pela ferramenta Blast (Basic Local Alignment Search Tool), usando a função Blastn (proteínas para nucleotídeos) com sequências de proteínas lidas e arquivadas em: SRX701006. Foi identificada a sequência: referente à Banda A da Fração TSH40%-33 (Figura 16).

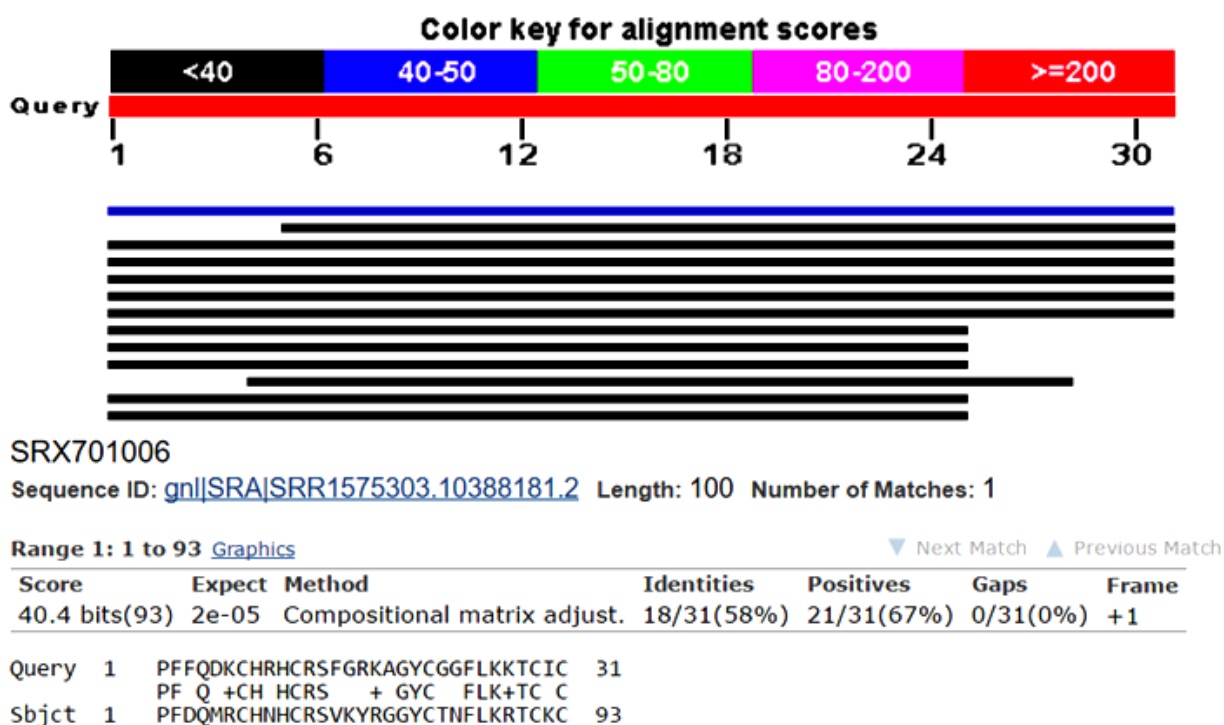


Figura 16 – Busca em banco de dados de transcriptoma do intestino do escorpião *T. serrulatus*. Com os fragmentos obtidos pela espectrometria de massas e análise no programa Peaks®, foi realizada a busca em banco de dados do transcriptoma do intestino do escorpião da espécie *T. serrulatus*. Os fragmentos da defensina do carrapato *I. scapularis* foram usados para encontrar a sequência correta da Banda A (TSH40%-33). A sequência encontrada no transcriptoma do *T. serrulatus* apresentou 58% de identidade com a defensina do *I. scapularis*, e o Max score em 40.4, a mesma sequência foi identificada também no transcriptoma da glândula do veneno da mesma espécie (dados não publicados).

Essa sequência de aminoácidos correspondente à proteína sintetizada no *T. serrulatus* foi submetida a uma busca através da ferramenta BLAST (proteína-proteína) e foi identificado que essa defensina presente no *T. serrulatus* apresenta

similaridade com outras defensinas de aracnídeos como, por exemplo, a defensina descrita na aranha da espécie *Stegodyphus mimosarum* e na aranha *Parasteatoda tepidariorum* (Mattila et al., 2012). Além dessas defensinas descritas nessas espécies de aranhas, a sequência da defensina descrita no *T. serrulatus* apresenta também similaridade com outras 2 defensinas descritas na hemolinfa dos escorpiões das espécies *Leiurus quinquestriatus* (Cociancich et al., 1993) e a androctonina encontrada no *Androctonus australis* (Ehret-Sabatier et al., 1996).

Essas defensinas compartilham os resíduos de cisteínas localizadas nas mesmas posições, indicando que são resíduos conservados. Essas cisteínas fazem pontes dissulfeto que caracterizam as defensinas, permitindo uma estabilidade e a sua atividade contra diferentes microrganismos (Figura 17).

<i>Stegodyphus mimosarum</i>	1	-----GFGCPFDQM [*] QCHNHCRSVK [*] YRGGYCTN [*] FLKRTCKCYG--
<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	1	-----GFGCPFDQM [*] QCHNHCRSVK [*] YRGGYCTN [*] FLKRTCKCYG--
<i>Ixodes scapularis</i>	1	QEDDSQVAHVRVRRGFGCPLNQGACHNHCRS [*] IKRRGGYCSGI [*] LKQTCTCYRK
<i>Leiurus quinquestriatus</i>	1	-----GFGCPLNQGACHRHCRS [*] IRRRGGYCAG [*] FKQTCTCYRN
<i>Androctonus australis</i>	1	-----GFGCPFNQGACHRHCRS [*] IRRRGGYCAG [*] LKQTCTCYR--
<i>Tityus serrulatus</i>	1	-----PFDQMRCHNHCRSVK [*] YRGGYCTN [*] FLKRTCKCYG--

Figura 17 – Alinhamento das defensinas de aracnídeos. Através dos resultados obtidos da sequência da molécula denominada Serrulina (*Tityus serrulatus*), por busca nos bancos de dados de transcriptoma da glândula do veneno e também do intestino da espécie *T. serrulatus* a sequência foi utilizada como critério de busca na ferramenta Blast, e as moléculas presentes em aracnídeos que apresentaram similaridade foram alinhadas para a comparação da estrutura primária. Em preto os aminoácidos conservados entre as espécies e em azul (asteriscos) os resíduos de cisteínas presentes na mesma posição nas aranhas *Stegodyphus mimosarum*, *Parasteatoda tepidariorum*, no carrapato da espécie *Ixodes scapularis* e nos escorpiões *Leiurus quinquestriatus*, *Androctonus australis* e *Tityus serrulatus* (Serrulina).

Quando analisada pela ferramenta expasyProtParam, a massa desse peptídeo é indicada como 3486 Da, massa semelhante observada no gel de eletroforese (Figura 14- Banda A), próximo ao marcador de 3 kDa.

A análise referente à banda B da Fração TSH40%-33 apresentou similaridade com outra defensina que pertence à mesma espécie de carrapato, *Ixodes scapularis*. Uma característica importante, presentes nas defensinas descritas no gênero *Ixodes* é a posição das cisteínas, que se mantém conservada nas mesmas posições. Essas defensinas foram descritas em tubos de malphige, glândulas salivares e ovários dos carrapatos pertencentes a esse gênero (Tonk et al., 2014).

A outra banda referente à amostra TSH40%-33 (Banda B) (Figura 14), também foi extraída do gel e submetida ao processo de digestão “*in gel*”. Os fragmentos obtidos foram aplicados em um espectrômetro de massas e os arquivos

gerados foram analisados por ferramentas de bioinformática. No software Peaks®, foram identificados dois fragmentos que correspondem à outra defensina descrita na mesma espécie, o carrapato *Ixodes scapularis* (Figura 18).

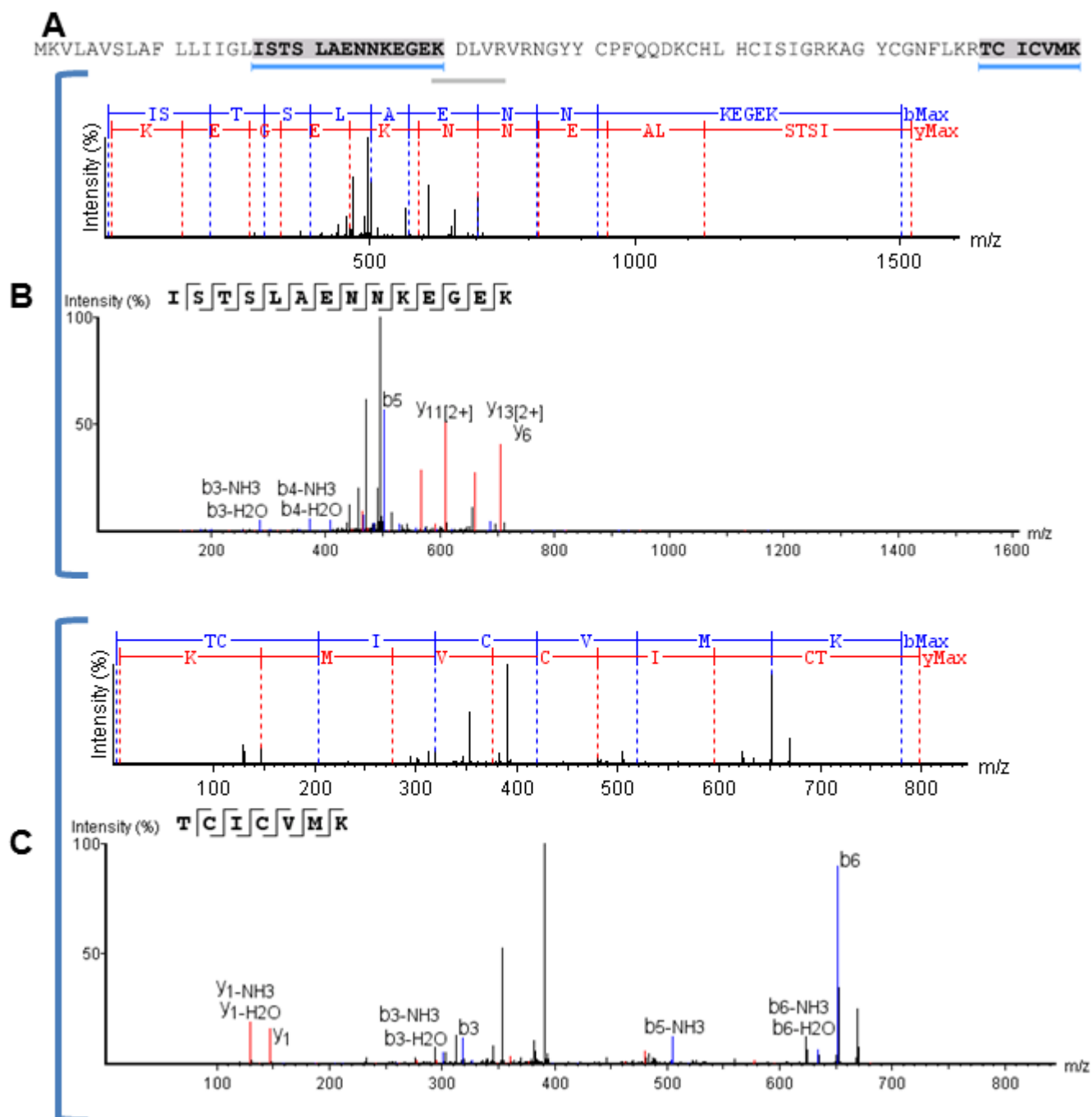


Figura 18 – Fragmentos da TSH40%-33 (Banda B) obtidos pelo software Peaks®. Na região superior a sequência completa da defensina do carrapato da espécie *Ixodes scapularis* (A), em cinza e grifado em azul na sequência da defensina, estão as regiões que mostraram similaridade com fragmentos analisados pela espectrometria de massas da amostra TSH40%-33 (Banda B). Abaixo a deconvolução dos resíduos de aminoácidos formada pela identificação dos íons referentes à série b-y e a tabela de íons que compõem: (B) o fragmento **ISTSLAENKKEGK** e (C) o fragmento **TCICVMK**.

A Banda B referente a amostra TSH40%-33 também apresenta fragmentos de defensinas encontradas na mesma espécie, entretanto essas moléculas descritas no carrapato *I. scapularis* são distintas, apesar de apresentarem o mesmo espectro de atividade antimicrobiana, contra bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas e sequências com resíduos de cisteínas conservadas em determinadas posições, elas são sintetizadas por diferentes sequências de mRNA (Wang, Zhu, 2011).

Em estudos estruturais realizados com as defensinas caracterizadas em carrapatos da espécie *Ixodes ricinus*, foi verificado que o sítio de ação desses peptídeos corresponde à região C-terminal, essa região é chamada de γ -core. É interessante ressaltar que em trabalho realizado com síntese química somente dessa região, foi capaz de inibir o crescimento microbiano de alguns dos microrganismos utilizados com a molécula inteira (Tonk et al., 2015). Outro fato interessante é que tanto os fragmentos localizados na banda A, quanto na banda B da fração TSH40%-33, apresentam regiões C-terminais similares com as regiões C-terminais da Scapularisina-20 e de outras defensinas descritas em carrapatos (Figura 19).

Scapularisin-20	CGGFLKKTCICVMK	14
DefMT3	CGNFLKRTCICVKK	14
DefMT6	CSGIKQTCTCYRK	14
DefMT7	CNGPFNIVCSCY--	12
	* * *	

Figura 19 – Sítio de ação das defensinas de *I. scapularis*. Alinhamento de regiões do C-terminal das moléculas: Scapularisina-20, DefMT3, DefMT6 e DefMT7. Essas regiões, conhecidas também como γ -core foram sintetizadas de defensinas descritas na espécie *I. scapularis*, e a síntese apenas dessa região foi capaz de inibir o crescimento de alguns dos microrganismos que foram testados com a molécula inteira (Tonk et al.,2015). A banda A e a banda B da fração TSH40%-33 presente no escorpião *T. serrulatus*, apresentam similaridade com a região C-terminal destas defensinas.

Os fragmentos obtidos no software Peaks®, referentes à Banda B, que também apresentaram similaridade com defensina descrita no carrapato *I. scapularis*, não foram localizados nos bancos de dados transcriptômicos disponíveis da glândula de veneno e intestino do escorpião *T. serrulatus*. Para a fração TSH40%-33 Banda A, que apresentou atividade contra todos os microrganismos testados e em sua sequência foram identificados fragmentos similares com defensinas descritas em outros aracnídeos, incluindo escorpiões, resolvemos

denominá-la Serrulina, o nome se deve ao fato de ter sido inicialmente caracterizada na espécie brasileira *T. serrulatus*.

4.2.3 Frações com atividade antimicrobiana dos hemócitos, eluídas em 80% de ACN.

O extrato ácido de hemócitos eluído em 80% de ACN em SepPak® C18 foi submetido à cromatografia líquida (CLAE-FR). As frações correspondentes ao picos foram coletados manualmente, concentradas à vácuo, ressuspendidas em água ultrapura e tiveram sua atividade antimicrobiana analisadas por ensaio de inibição de crescimento microbiano (Figura 20). Das frações testadas apenas uma fração (3) apresentou atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus* A270 como também podemos ver na figura 20.

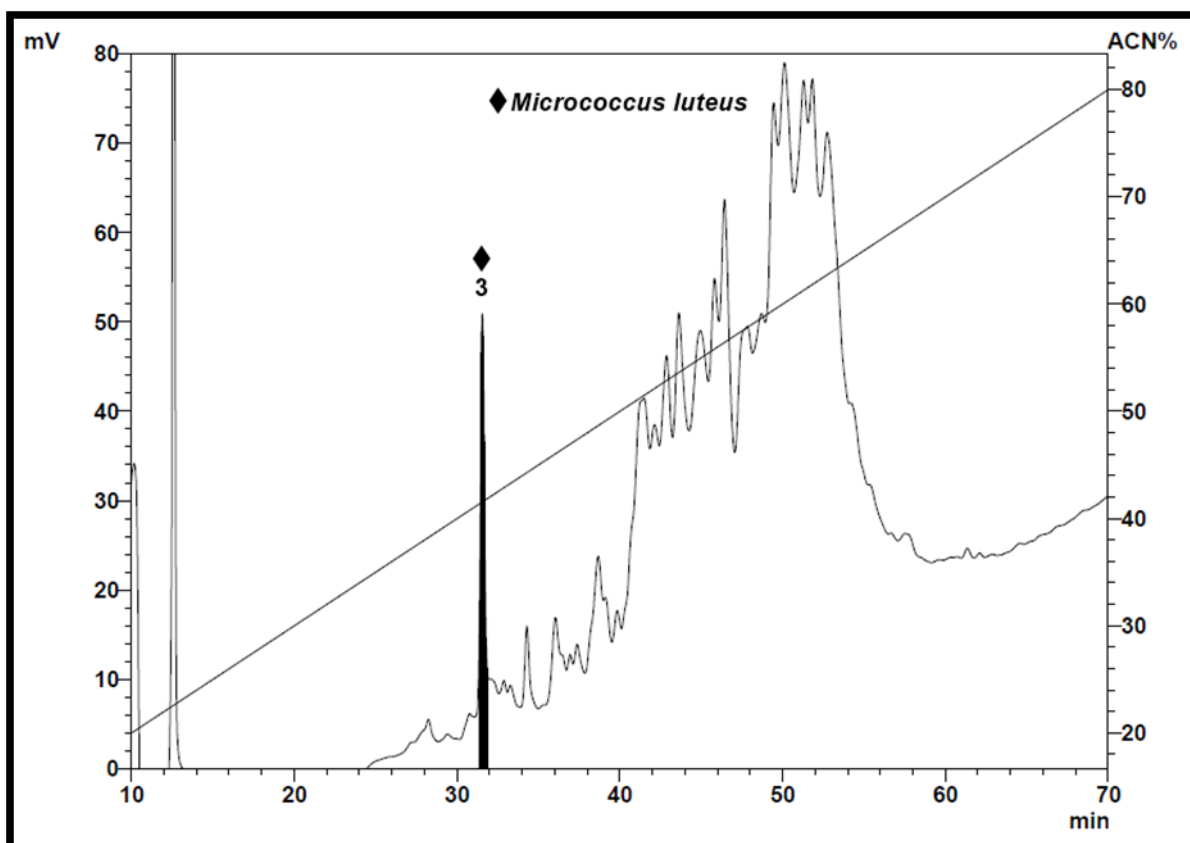


Figura 20 – Cromatografia líquida de alta eficiência das amostras dos hemócitos eluídas em 80% de acetonitrila - ACN. Após a primeira etapa de fracionamento por coluna Sep-pak® C18, as amostras dos hemócitos eluídas em 80% de ACN foram submetidas a uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando uma coluna semi-preparativa Jupter® C18 com gradiente linear de 20 a 80% de ACN em TFA 0,05% por 60 minutos em um fluxo de 1,5 ml/minutos. As frações foram coletadas manualmente e submetidas ao teste de inibição de crescimento microbiano em meio líquido. A fração 3 apresentou atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus* A270 (Bactéria Gram-positiva ♦).

Tabela 3 - Frações com atividade antimicrobiana do hemócitos do escorpião da espécie *Tityus serrulatus*. Frações coletadas manualmente por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR), e que após o teste de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido apresentaram atividade antimicrobiana contra os diferentes microrganismos testados. Frações que apresentaram atividade antimicrobiana (+) e que não apresentaram atividade antimicrobiana (-) nas diferentes frações dos hemócitos.

Frações		MICROORGANISMOS			
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Candida Albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
		SBS 363	A270	MDM 8	
HEMÓCITOS	5% TSH05%-12	+	+	+	+
	TSH40%-29	-	+	-	-
	TSH40%-30	-	+	-	-
	TSH40%-31	-	+	-	-
	40% TSH40%-32	-	+	-	-
	TSH40%-33	+	+	+	+
	TSH40%-34	-	+	-	-
	TSH40%-39	+	+	-	-
	80% TSH80%-03	-	+	-	-

Após identificar a atividade antimicrobiana da amostra TSH80%-3, a mesma foi quantificada e aproximadamente 10 µg foram aplicados a um gel de eletroforese em 20% de poliacrilamida (SDS-PAGE). A análise de eletroforese indicou a presença de uma banda entre as massas de 3 e 6 kDa (Figura 11). Essa banda foi extraída do gel e submedida ao processo de digestão “*in gel*”, utilizando-se tripsina como enzima. Os fragmentos obtidos foram aplicados a um espectrômetro de massas e o arquivo gerado foi analisado através do software Peaks® (Figura 21).

Foi identificado uma sequência de 8 aminoácidos correspondente ao fragmento de um peptídeo antimicrobiano denominado Phylloquinina. A Phylloquinina é um peptídeo antimicrobiano encontrado na secreção de pele do sapo africano da espécie *Phyllomedusa bicolor*, e apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana (Konig et al., 2012).

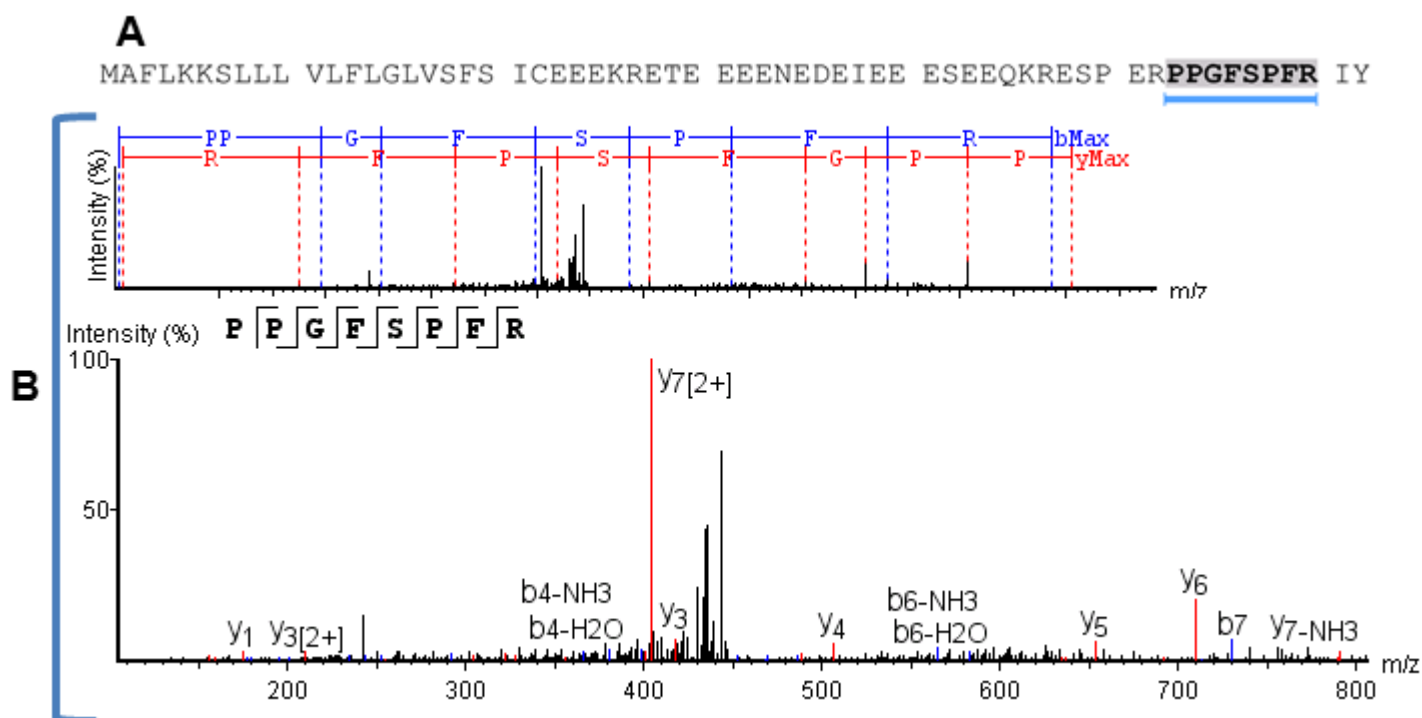


Figura 21 – Fragmentos da TSH80%-03 obtidos pelo software Peaks®. Na região superior (A) a sequência completa da Phylloquinina descrita como um peptídeo antimicrobiano presente na secreção da pele do sapo da espécie *Phyllomedusa bicolor*. Em cinza e grifado em azul as regiões que mostraram similaridade com fragmentos analisados pela espectrometria de massas da amostra TSH80%-03. Abaixo a deconvolução dos resíduos de aminoácidos formada pela identificação dos íons referentes à série b-y e a tabela de íons que compõem: (B) o fragmento **PPGFSPFR**, esse fragmento corresponde a bradiginina uma molécula envolvida no processo de vasodilatação.

Essa região, composta pela sequência de aminoácidos identificada pelo software Peaks® corresponde à família de bradiginina moléculas envolvida no processo fisiológico de vasodilatação. Essa substância foi descrita por agir em receptores de bradiginina de possíveis predadores dessas espécies de sapos e já foi descrita também a atividade antimicrobiana dessa molécula, garantindo assim a segurança dessa espécie contra predadores e contra microrganismos patogênicos (Konig et al., 2012). Esse fragmento não foi identificado nos bancos de dados dos transcritos de glândula do veneno e também nos transcritos do intestino do escorpião *T. serrulatus*.

Nesse trabalho foram identificadas 07 frações com atividade antimicrobiana no plasma e 9 frações nos hemócitos da hemolinfa do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* (Tabela 4).

Tabela 4 – Frações com atividade antimicrobiana da hemolinfa (plasma e hemócitos) do escorpião da espécie *Tityus serrulatus*. Frações coletadas manualmente por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR), e que após o teste de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido apresentaram atividade antimicrobiana contra os diferentes microrganismos testados. Frações que apresentaram atividade antimicrobiana (+) e que não apresentaram (-) nas diferentes frações do plasma e dos hemócitos.

Frações		MICRORGANISMOS				
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Candida Albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>	
		SBS 363	A270	MDM 8		
PLASMA	5%	TSP05%-02	+	+	+	-
		TSP05%-08	-	-	-	+
		TSP05%-12	-	-	-	+
	40%	TSP40%-02	-	+	+	-
		TSP40%-29	-	+	-	-
		TSP40%-32	-	+	-	-
	80%	TSP80%-02	-	+	-	-
HEMÓCITOS	5%	TSH05%-12	+	+	+	+
	40%	TSH40%-29	-	+	-	-
		TSH40%-30	-	+	-	-
		TSH40%-31	-	+	-	-
		TSH40%-32	-	+	-	-
		TSH40%-33	+	+	+	+
		TSH40%-34	-	+	-	-
		TSH40%-39	+	+	-	-
80%	TSH80%-03	-	+	-	-	

5 CONCLUSÕES

Identificamos nesse trabalho os primeiros peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa do escorpião brasileiro da espécie *Tityus serrulatus*. Essa análise foi realizada levando-se em consideração a separação do plasma e hemócitos, e foram obtidas 16 frações com atividade antimicrobiana, dessas frações, 7 foram descritas no plasma. As frações TSP05%-08 e TSP05%-12 apresentaram atividade antimicrobiana contra o fungo filamento *Aspergiulos niger*. A fração TSP05%-2 apresentou atividade antimicrobiana contra os outros microrganismos testados, bactéria Gram-positiva (*Micrococcus luteus* A270), Gram-negativa (*Escherichia coli* SBS 363) e contra levedura (*Candida albicans* MDM8), a TSP05%-2 apresentou também atividade hemolítica contra eritrócitos humanos nas concentrações de 18 µg/mL. Ainda no plasma, as frações TSP40%-02, TSP40%-29, TSP40%-32 e TSP80%-2 também apresentaram atividade antimicrobiana contra bactéria Gram-positiva e a fração TSP40%-2 apresentou também atividade contra leveduras.

Nas amostras provenientes dos hemócitos, foram identificadas 9 frações com atividade antimicrobiana, sendo que todas as frações apresentaram ação contra bactéria Gram-positiva. A fração TSH40%-39 apresentou atividade antimicrobiana contra bactéria Gram-negativa e também atividade hemolítica contra eritrócitos humanos a partir da concentração de 12 µg/mL. As frações TSH05%-12 e TSH40%-33 apresentaram atividade contra todos os microrganismos testados além de ter a sua concentração inibitória mínima entre 0,25 µg/mL - 0,5 µg/mL para bactéria Gram-positiva e 2 µg/mL - 4 µg/mL para bactéria Gram-negativa não apresenta atividade hemolítica.

A fração TSH40%-33, se mostrou heterogênea, composta por 2 bandas (A e B), ambas as bandas apresentaram similaridades com defensinas de carrapatos da espécie *Ixodes scapularis*. A molécula que denominamos Serrulina (Banda A) teve a sua sequência localizada em banco de dados do transcriptoma da glândula de veneno do escorpião e transcriptoma do intestino do *T. serrulatus*.

A fração TSH80%-3 apresentou similaridade com um peptídeo antimicrobiano presente em secreção da pele de sapos da espécie *Phyllomedusa bicolor*, uma proteína pertencente à família das bradicininas e que estão envolvidas também nos processos de vasodilatação.

Estes foram os primeiros peptídeos antimicrobianos descritos na hemolinfa do escorpião da espécie *Tityus serrulatus*. Algumas frações apresentaram atividade hemolítica, porém estas frações não passaram por mais etapas de purificações para que seja possível associar a atividade hemolítica e antimicrobiana a mesma molécula, para essas frações são necessários mais estudos. Todos os peptídeos antimicrobianos descritos neste trabalho contribuí para o estudo de novas moléculas com finalidades farmacológicas, uma vez que o aparecimento de microrganismos resistentes aos antibióticos atuais vem crescendo .

REFERÊNCIAS*

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai SHIV. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 7. ed.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct; 215(3): 403-10.

Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, et al. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest.* 1998 Sep 1; 102(5):874-80.

Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 1991 Jul; 196(1):80-3.

Baumann T, Kämpfer U, Schürch S, Schaller J, Largiadèr C, Nentwig W, Kuhn-Nentwig L. Ctenidins: antimicrobial glycine-rich peptides from the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Aug; 67(16):2787-98.

Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996; 12:393-416.

Brazil TK, Porto TJ. Os escorpiões. Editora da Universidade Federal da Bahia. Salvador 2010. 83p.

Brogden KA, Ackermann M, McCray PB, Tack BF. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int. J Antimicrob Agents.* 2003; 22: 465-478.

Brownell P, Polis G. Scorpion biology and research. New York: Oxford University Press. 2001; 431 p.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors.[Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Brusca RC, Brusca GJ. Invertebrates. 2nd Ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 2003; 936 p.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol*. 1999 Jun-Jul; 23(4-5):329-44.

Bulet P, Dimarcq JL, Hetru C, Lagueux M, Charlet M, Hegy G, Van Dorsselaer A, Hoffmann JA. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J Biol Chem*. 1993 Jul 15; 268 (20): 14893-7.

Bulet P, Stocklin R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein & Peptide Letters*. 2005; v. 12, n. 1, 3-11.

Burmester T. Evolution and adaptation of hemocyanin within spiders. In Nentwing W (ed) *Spider ecophysiology*. Springer, Heidelberg (this volume). 2013.

Candido DM. Escorpiões. In: Joly CA, Bicudo CEM (eds) *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo*. 1999; 25-34 p.

Chaparro E, da Silva Junior PI. Lacrain: the first antimicrobial peptide from the body extract of the Brazilian centipede *Scolopendra viridicornis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2016; doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.05.015.

Cociancich S, Goyffon M, Bontems F, Bulet P, Bouet F, Menez A, Hoffmann J. Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Jul 15; 194 (1) : 17-22.

da Silva Junior PI, 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*. 2000 Oct; 275 (43): 33464-70.

da Silva Junior PI. Sistema imune de aracnideos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*. [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo ; 2000.

Ehret-Sabatier L, Loew D, Goyffon M, Fehlbaum, P.; Hoffmann, J.; van Dorsselaer, A.; Bulet, P.; Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J Biol Chem.* 1996 Nov 22; 271 (47): 29537-44.

Fahrenbach WH. The cyanoblast: hemocyanin formation in *Limulus polyphemus*. *J Cell Biol.* 1970 Feb; 44 (2): 445-53.

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 Nov; 7 (11): 862-74.

FET V. Catalog of the scorpions of the world (1758-1998). New York: New York Entomological Society. 2000; 690 p.

Fogaça AC, da Silva Jr PI, Miranda MT, Bianchi AG, Miranda A, Ribolla PE, Daffre S. Antimicrobial Activity of a Bovine Hemoglobin Fragment in the Tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 25330–25334.

Fogaça AC, Lorenzini DM, Kaku L M, Esteves E, Bulet P, Daffre S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental and Comparative Immunology.* 2004; 28: 191–200.

Fukuzawa AH, Vellutini BC, Lorenzini DM, da Silva Junior PI, Mortara RA, da Silva JMC, Daffre S. The roles of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev Comp Immunol.* 2008; 32:716-725.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Ministério da Saúde, Brasília, 1998.

FUNDACENTRO. Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho. Prevenção de Acidente com Animais Peçonhentos. Ministério do Trabalho e emprego – São Paulo. 2001; 49 p.

Fuzita FJ, Pinkse MW, Patane JS, Juliano MA, Verhaert PD, Lopes AR. Biochemical, transcriptomic and proteomic analyses of digestion in the scorpion *Tityus serrulatus*: insights into function and evolution of digestion in an ancient arthropod. PLoS One. 2015 Apr 15;10(4):e0123841. doi: 10.1371/journal.pone.0123841. eCollection.

Galgóczy L, Lukács G, Nyilasi I, Papp T, Vágvölgyi C. Antifungal activity of statins and their interaction with amphotericin B against clinically important Zygomycetes. Acta Biol Hung. 2010 Sep;61(3):356-65. doi: 10.1556/ABiol.61.2010.3.11.

Ganz T, Lehrer RI. Defensins. Pharmacol Ther. 1995 May;66(2):191-205.

Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. J Clin Invest. 1985 Oct;76(4):1427-35.

Ganz T. The role of Antimicrobial Peptides in Innate Immunity. integr. comp. biol. 2003; 43: 300–304.

Godoy LD, Liberato JL, da Silva Junior PI, dos Santos WF. Mygalin: a new anticonvulsant polyamine in acute seizure model and neuroethological schedule. Cent Nerv Syst Agents Med Chem. Jun 2013; 13 (2): 122-31.

Hanna SL, Sherman NE, Kinter MT, Goldberg JB. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Microbiology. 2000; 146, 2495–2508.

Hao G, Shi YH, Tang YL, Lee GW. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Bufenin 2. *Peptides*. Aug 2009;30(8):1421-7. doi: 10.1016/j.peptides.2009.05.016.

Hoffmann R, Bulet P, Uurge L, Otvös L Jr. Range of activity and metabolic stability of synthetic antibacterial glycopeptides from insects. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Feb 2;1426(3):459-67.

Holak TA, Engström A, Kraulis PJ, Lindeberg G, Bennich H, Jones TA, Gronenborn AM, Clore GM. The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry*. 1988 Oct 4;27(20):7620-9.

Hultmark D, Engström A, Andersson K, Steiner H, Bennich H, Boman HG. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J*. 1983;2(4):571-6.

Iwanaga S, Kawabata S, Muta T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *J Biochem*. 1998 Jan;123(1):1-15.

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

Kawabata S. Immunocompetent molecules and their response network in horseshoe crab. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 708: 122-136.

Kawabata S, Koshihara T, Shibata T. The lipopolysaccharide-activated innate immune response network of the horseshoe crab. *ISJ*. 2009; 6: 59-77.

Kemper B. Site of hemocyanin biosynthesis in the tarantula *Euryplema californicum*. *Naturwissenschaften*. 1983; 70: 255-256.

König E, Clark VC, Shaw C, Bininda-Emonds OR. Molecular cloning of skin peptide precursor-encoding cDNAs from tibial gland secretion of the Giant Monkey Frog, *Phyllomedusa bicolor* (Hylidae, Anura). *Peptides*. 2012 Dec;38(2):371-6. doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.010. Epub 2012 Sep 19.

Kropf C. Hydraulic system of locomotion. In: Nentwig W (ed) *Spider ecophysiology*. Springer, Heidelberg. 2013.

Kurata S. Intra - and extracellular recognition of pathogens and activation of innate immunity. *Yakugaku Zasshi*. 2006 Dec;126(12):1213-8,.

Kwon TH, Lee SY, Lee JH, Choi JS, Kawabata S, Iwanaga S, Lee BL. Purification and characterization of prophenoloxidase from the hemolymph of coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Mol Cells*. 1997 Feb 28; 7(1): 90-7.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-5.

Lehrer, R.I.; Ganz, T.; Selsted, M.E.; Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell*. 1991 Jan 25;64 (2): 229-30.

Lorenzini DM, Fukuzawa AH, da Silva PI Jr, Machado-Santelli G, Bijovsky AT, 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*. 2003 Oct;33(10):1011-6.

Mattila TM, Bechsgaard JS, Hansen TT, Schierup MH, Bilde T. Orthologous genes identified by transcriptome sequencing in the spider genus *Stegodyphus*. *BMC Genomics*. 2012 Feb 14;13:70. doi: 10.1186/1471-2164-13-70.

Nagai T, Kawabata S. A link between blood coagulation and prophenoloxidase activatin in arthropod host defense. *J Biol Chem*. 2000;275: 29264-29267.

Nagai T, Osaki T, Kawabata S. Functional conversion hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *J Biol Chem*. 2001; 276: 27166-27170.

Nentwing LK, Nentwing W. The Immune System of Spider. In: NENTWING, W. *Spider Ecophysiology*. Bern: Springer. 2013; 82 p.

Osaki T, Kawabata S. Structure and function of coagulogen, a clottable protein in horseshoe crabs. *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61:1257-1265.

Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit Rev Biotechnol*. 2012 Jun;32(2):143-71.

Pereira LS, da Silva Junior PI, Miranda MT, Almeida IC, 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*. 2007 Jan 26; 352(4): 953-9.

Prendini LW, Wheeler C. Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. *Cladistics*. 2005; v. 30, p. 446-494.

Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents*. 2004 Dec;24(6):536-47.

Riciluca KCT. Purificação caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa de *Acanthoscurria rondoniae* (Mygalomorphae, Theraphosidae). [tese (Mestrado em Ciências da Saúde Pública)]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Saúde de São Paulo ; 2011.

Rodríguez de la Vega RC, García BI, D'Ambrosio C, Diego-García E, Scaloni A, Possani L. Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Jun;61(12): 1507-19.

Sayegh RSR. Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa de *Acutisoma longipes* (Gonyleptidae; Opiliones). [tese (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisa e Tecnologia; 2011.

Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *J Mol Med (Berl)*. 2005 Aug;83(8):587-95.

Schutte BC, McCray PB Jr. [beta]-defensins in lung host defense. *Annu Rev Physiol*. 2002;64:709-48.

Seitz KA. Zur histologie und Feinstruktur des Herzens und der Hamocyten von *Cupiennius salei* keys. (Aranea, Ctenidae). *Zool JB Anat*. 1972; 89: 351-384.

Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW, Lehrer RI. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest*. 1985 Oct;76(4):1436-9.

Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2002; v.66, n. 4, p.236-248.

Sherman RG. Chelicerates. In: RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY A.F. (eds) *Invertebrate blood cells*. 1981; vol 2. Academic, London.

Sherman RG. Ultrastructurally different hemocytes in a spider. *Can J Zoo*. 1973; 51: 1155-1159.

Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB Jr. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14961-6.

Söderhäll K, Cerenius L. Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol*. 1998; 10: 23-28.

Söderhäll K, Smith VJ. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev Comp Immunol*. Spring. 1983; 7 (2): 229-39.

Stone KL, Williams KR. Enzymatic digestion of proteins in gels for mass spectrometric identification and structural analysis. *Curr Protoc Protein Sci*. 2004; 11: 11-3.

Tellez GA, Castano JC. Péptidos antimicrobianos. Antimicrobial peptides. Asociación colombiana de infectología revista infectio. 2010; 14(1): 55-67.

Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K. Plant defensins. *Planta*. 2002 Dec;216(2):193-202. Epub 2002 Oct 8.

Tian C, Gao B, Fang Q, Ye G, Zhu S. Antimicrobial peptide-like genes in *Nasonia vitripennis*: a genomic perspective. *BMC Genomics*. 2010 Mar 19;11:187. doi: 10.1186/1471-2164-11-187.

Tonk M, Cabezas-Cruz A, Valdés JJ, Rego RO, Grubhoffer L, Estrada-Peña A, Vilcinskis A, Kotsyfakis M, Rahnamaeian M. *Ixodes ricinus* defensins attack distantly-related pathogens. *Dev Comp Immunol*. 2015 Dec;5(2):35865.

Walker JM. Gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Methods Mol Biol*. 1994; (8): 32:35.

Wang Y, Zhu S. The defensin gene family expansion in the tick *Ixodes scapularis*. *Developmental and Comparative Immunology*. 2011; (35): 1128 - 1134.

Wikner C, Huckstorf K. The circulatory system of spiders. In: Netwing W (ed) *Spider ecophysiology*. Springer, Heidelberg (this volume), 2013.

Zasloff M. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *Lancet*. 2002 Oct 12;360(9340):1116-7.

