

Laura Cristina Lima Diniz

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS DA HEMOLINFA DE *Triatoma infestans*
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2016

Laura Cristina Lima Diniz

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS DA HEMOLINFA DE *Triatoma infestans*
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Pedro Ismael da Silva Júnior

Versão Original

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 parcial

Diniz, Laura Cristina Lima.

Identificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) / Laura Cristina Lima Diniz. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Pedro Ismael da Silva Júnior.

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: Peptídeos antimicrobianos.

Versão do título para o inglês: Identification and characterization of antimicrobial peptides from the hemolymph of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae).

1. Peptídeos 2. Hemiptera 3. Antimicrobianos 4. *Triatoma infestans*
I. Pedro Ismael da Silva Júnior II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB079/2016

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

Candidato(a): Laura Cristina Lima Diniz.

Título da Identificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos
da hemolinfa de Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae).

Orientador(a): Pedro Ismael da Silva Júnior.

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 (CEUAIB)

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

São Paulo, 23 de fevereiro de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Identificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae)", protocolo nº. **I-1354/15**, sob a responsabilidade de Pedro Ismael da Silva Jr. e Laura Cristina Lima Diniz, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.


Dra. Wânia K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que mesmo nos momentos em que me faltou fé e confiança Ele esteve ao meu lado;

Aos meus pais Arildo, Márcia, e meus irmãos Lívia, Jonatan e Arthur, e a minha família como um todo por me darem diariamente todo amor e carinho do mundo.

Ao Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior, por sua orientação, apoio e amizade, me guiando durante mais essa etapa. E Também aos estimados colegas Soraia, Thiago, Katie, Thais, Ivan, Andrea G., Andrea R., Sandra, Débora, Rosa, Ana Helena, e Elisa por me acompanharem durante todos esses meses, e me ajudarem a tornar essa conquista possível.

Aos Colaboradores, Prof. Dr. Antônio de Miranda e Dra Karin do Amaral Riske, por me abrirem a possibilidade de realização dos experimentos em conjunto com os seus respectivos laboratórios na Universidade Federal de São Paulo.

Aos amigos e colegas da UNIFESP, em especial Rogério e Ana por todos os almoços, filmes e livros compartilhados nesse tempo, e ao Flávio e ao Thiago por toda a ajuda com os experimentos relacionados às sequencias e estruturas.

Aos meus amigos e familiares, próximos ou não, que tornaram essa caminhada mais fácil.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Para ser grande, sê inteiro;
Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és;
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive”

Fernando Pessoa

RESUMO

Diniz, LCL. Identificação e Caracterização de Peptídeos Antimicrobianos da Hemolinfa de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Os insetos representam uma das classes de animais mais antigas do planeta, e apresentam ampla distribuição geográfica além de totalizarem 81% de todas as espécies já descritas. Esse sucesso evolutivo é representado em parte por seu sistema imune inato (celular e humoral), que atua como sua principal linha de defesa. Em destaque está a produção de Peptídeos e/ ou Proteínas Antimicrobianas – PAMs. O *Triatoma infestans*, membro da subfamília Triatominae, popularmente conhecido como barbeiros, é hematófago e vetor da doença de chagas. No que se refere a pesquisas de PAMs em triatomíneos, algumas moléculas têm sido identificadas, mas no *T. infestans* ainda não há pesquisas nessa área, e por estarem em contato com uma diversidade de microrganismos durante o seu ciclo de vida acreditamos que eles produzem moléculas antimicrobianas. Nesse estudo, quatro peptídeos com atividade antimicrobiana foram identificados, caracterizados e sintetizados pelo método t-boc. Os peptídeos nomeados Tin-TK-I e II apresentaram similaridade com “Tachykinin-like” de insetos. Esses peptídeos apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e negativa e contra fungos. Não apresentaram atividade hemolítica, e o padrão de degradação foi diferente entre eles, sendo Tin-TK-I degradado por aminopeptidases, enquanto Tin-TK-II é degradado por carboxipeptidases. Quando analisados por difração circular, Tin-TK-I apresentou estrutura secundária randômica e Tin-TK-II estrutura de hélice 3_{10} , e ambos são capazes de lisar membranas vesiculares. O peptídeo nomeado Triastina apresentou similaridade com uma proteína cuticular rica em glicina de *T. infestans* e se mostrou ativo contra duas bactérias e três fungos. Não apresentou hemólise, e foi susceptível à degradação por amino e carboxi peptidases. Assumiu conformação secundária de hélice 3_{10} quando analisado por DC, e apresentou capacidade de lisar membranas. O peptídeo nomeado Triatomina apresentou similaridade com o fibrinopeptídeo A de humanos. Esse peptídeo apresentou atividade contra três bactérias e seis fungos. Um análogo obtido quando da síntese de Triatomina (Triato-A1) também apresentou atividade contra bactérias e fungos. Os dois peptídeos não foram hemolíticos, foram susceptíveis à degradação por aminopeptidases e apresentaram capacidade de formar poros na membrana sem gerar lise vesicular. Esses peptídeos apresentaram estrutura secundária em alfa-hélice quando analisados por difração circular. Nossa hipótese é que além da produção intrínseca de peptídeos antimicrobianos o *T. infestans* consegue absorver moléculas com potencial antimicrobiano de sua alimentação para utilizá-las em seu benefício. E com essas descobertas, conseguimos elucidar parte do sistema imune desse animal.

Palavras-chave: Peptídeos Antimicrobianos, *Triatoma infestans*, Fibrinopeptídeo A, Triastina, “Tachykinin-like”.

ABSTRACT

Diniz, LCL. Identification and Characterization of Antimicrobial Peptides from the Hemolymph of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). [Master thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Insects represent the oldest class of animals on the planet, and the present the wider geographic distribution, in a total of 81% of all catalogued species. This evolutive success is partially represented by their innate immune system (divided in cellular and humoral), that acts as their main defense mechanism. In highlight, there are the Antimicrobial Peptides or Proteins – AMPs. *Triatoma infestans*, member of the Triatominae subfamily, popularly known as kissing bugs, feeds with blood and has a major role as Chagas disease vector. Regarding new researches related to AMPs in triatomines, few molecules have been identified so far, and no research on this area have been developed with *T. infestans*, and due to the fact that this insect survives in a highly infectious habitat during its life cycle, we believe that it products antimicrobial molecules. On this study, four main AMPs have been identified and synthetized through the t-boc method. The samples nominated as Tin-TK-I and II were similar to Tachykinin-like proteins from insects. They were active against three bacteria and three fungi on the antimicrobial assay. They were not haemolytic, and showed different patterns of degradation, where Tin-TK-I were affected by aminopeptidases, as Tin-TK-II were affected by carboxipeptidases. On the CD, Tin-TK-I presents a random secondary structure, and Tin-TK-II has a helix 3_{10} secondary structure, and both of them were able to disrupt negatively charged membranes. The sample nominated Triastina was similar to a glycine rich cuticular protein from *T. infestans* and was active against two bacteria and three fungi on the antimicrobial assay. It was not hemolytic and was affected by both carboxi and aminopeptidases. Triastina has a secondary structure of a helix 3_{10} when analyzed by CD, and had the ability to generate pores that leads to intravesicular loss, and and then completely disrupts the membrane. The sample nominated Triatogen was similar to the human fibrinopeptide A. This peptide was active against three bacteria and six fungi on the antimicrobial assay. A analogue obtained during the SPPS of Triatomina (called Triato-A1) was also active against three bacteria and three fungi. They were not active against human eritrocites, and both were degenerated by aminopeptidases. They present a secondary structure of alfa-helix on the CD, and they were capable of generating pores on membranes. Our hypothesis is that beyond the intrinsic AMP production, *T. infestans* are able to absorb molecules from their feeding, using them as their own antimicrobial peptides. And, with these discoveries, new parts of its immune system start to be elucidated.

Keywords: Antimicrobial Peptides, *Triatoma infestans*, Fibrinopeptide A, Infestin, Tachykinin-like molecules.

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Representação da diferenciação de Pró-hemócitos de insetos	20
Figura 2 – Representação das etapas desencadeadas após infecção por microrganismos.....	22
Figura 3 – Comparação da incidência de <i>Triatoma infestans</i> na América do Sul antes e depois das iniciativas de erradicação.....	28
Figura 4 – Inoculação de microrganismos nos insetos.....	31
Figura 5 – Extração de hemolinfa.....	32
Figura 6 – Cromatograma do fracionamento das frações TIHT 5%, 40% e 80%	44
Figura 7– Determinação da massa através do software MagTran [®]	47
Figura 8 – Análise do Triatomina através dos softwares PEAKS [™] e MASCOT [®]	48
Figura 9 – Localização do FibrinopeptídeoA	48
Figura 10– Confirmação da sequência do análogo Triato-A1	49
Figura 11 – Interação entre o Triatomina e vesículas lipídicas.....	56
Figura 12 – Interação entre o Triato-A1 e vesículas lipídicas.....	56
Figura 13 – Padrões de difração no Dicroísmo Circular	57
Figura 14 – Padrão de difração apresentado pelo Triatomina	58
Figura 15 – Padrão de difração apresentado pelo Triato-A1.....	59
Figura 16 – Determinação da massa através do software MagTran [®]	62
Figura 17 – Análise do peptídeo 2 através do software MASCOT [®]	62
Figura 18 – Resultados obtidos da análise da amostra 2 provenientes do Peaks [™] .	63
Figura 19 - Interação entre a Triastina e vesículas lipídicas	66
Figura 20 – Difração apresentada pela Triastina.....	67
Figura 21 – Determinação da massa através do software MagTran [®]	68
Figura 22 – Resultados da análise provenientes do software MASCOT [®] .	69
Figura 23 - Interação entre o Tin-TK-I e vesículas lipídicas	75
Figura 24 - Interação entre o Tin-TK-II e vesículas lipídicas	75
Figura 25 – Difração apresentada pelo Tin-TK-I	76
Figura 26 – Difração apresentada pelo Tin-TK-II	77
Figura 27 – Alinhamento entre as sequências primárias através do ClustaW2.....	78

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Número de espécies descritas em cada Ordem da Classe Insecta	17
Tabela 2 – Etapas necessárias para a realização da síntese manual de peptídeos .	41
Tabela 3 – Teste de inibição de crescimento de microrganismos em meio líquido das amostras provenientes da cromatografia líquida.....	45
Tabela 4 – Teste de inibição de crescimento de microrganismos em meio líquido das amostras obtidas pela abertura de gradiente	46
Tabela 5 – Atividades antimicrobianas do Triatomina	50
Tabela 6 – Atividades antimicrobianas do Triato-A1	51
Tabela 7 – Perfil de degradação do Triatomina quando incubado em plasma.....	54
Tabela 8 – Perfil de degradação do Triato-A1 quando incubado em plasma.....	55
Tabela 9 – Número de FREPs já identificado dentro do filo Artropoda	60
Tabela 10 – Absorção de moléculas por insetos hematófagos	60
Tabela 11 – Atividades antimicrobianas da Triastina	63
Tabela 12 – Perfil de degradação da Triastina.....	66
Tabela 13 – Atividades antimicrobianas do Tin-TK-I.....	70
Tabela 14 – Atividades antimicrobianas do Tin-TK-II	71
Tabela 15 – Perfil de degradação do Tin-TK-I.....	74
Tabela 16 – Perfil de degradação do Tin-TK-II.....	74

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Ensaio hemolítico para Triatomina.....	53
Gráfico 2 – Degradação em plasma do Triatomina	53
Gráfico 3 – Degradação em plasma do análogo Triato-A1	54
Gráfico 4 - Degradação em plasma da Triastina.....	65
Gráfico 5 – Degradação em plasma do Tin-TK-I.....	73
Gráfico 6 – Degradação em plasma do Tin-TK-II.....	73

Lista de Abreviaturas e Siglas

μM	Micro Molar
Å	Angstrom
AA	Aminoácidos
ACN	Acetonitrila
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool BLAST
BOP	Hexafluorofosfato de Benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)Fosfônio
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cm	Centímetro
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropiletamida
DIPEA	Diisopropiletamina
DMF	Dimetilformina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
HCl	Ácido Clorídrico
HoBT	1-HidroxiBenzoTriazol
Hz	Hertz
IAA	Iodoacetoamida
KDa	Kilo Daltons
L	Litro
M	Molar
MeOH	Metanol
mg	MiliGrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI nr	National Center for Biotechnology Information non redundant
nm	Nanômetro
°C	Graus Célsius

PAM	Peptídeo antimicrobiano
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro Fetal Bovino
TEAP	Trietilaminofosfato
TFA	Ácido trifluoracético
TFMSA	Ácido Trifluorometasulfônico
TIHT	<i>Triatoma infestans</i> Hemolinfa total
UV	Ultravioleta
V	Volt
µL	Microlitro

Lista de Amniácidos

Alanina	Ala/A
Cisteína	Cys/C
Aspartato	Asp/D
Glutamato	Glu/E
Fenilalanina	Phe/F
Glicina	Gly/G
Histidina	His/H
Lisina	Lis/K
Leucina.....	Leu/L
Metionina.....	Met/M
Glutamina	Gln/Q
Arginina	Arg/R
Serina	Ser/S
Tirosina	Tyr/T
Valina	Val/V
Triptofano	Trp/W

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 MECANISMOS DE DEFESA DOS INSETOS	17
1.1.1 Barreiras Físicas	18
1.2.1 Barreiras Químico-Bioquímicas.....	19
1.2 PEPTIDEOS ANTIMICROBIANOS	22
1.2.1 Descrição Geral.....	22
1.2.2 Breve Histórico em Insetos.....	23
1.2.3 Classificação	24
1.2.4 Mecanismos de Ação	25
1.3 PEPTIDEOS ANTIMICROBIANOS EM TRIATOMINEOS.....	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. METODOLOGIA	31
3.1 ANIMAIS.....	31
3.2 IMUNIZAÇÃO DOS INSETOS	31
3.3 EXTRAÇÃO DA HEMOLINFA.....	31
3.4 PURIFICAÇÃO.....	32
3.4.1 Extração Ácida	32
3.4.2 Pré-Purificação.....	32
3.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE	33
3.4.3.1 Repurificação	33
3.5 BIOENSAIOS	33
3.5.1 Ensaio de Inibição de Crescimento em Meio Líquido.....	33
3.5.2 Atividade Hemolítica.....	34
3.5.3 Degradação em Plasma	35
3.5.4 Estudos de Interação Peptídeo/Vesícula.....	35
3.6 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	37
3.6.1 Eletroforese	37
3.6.1.1 SDS PAGE – Poliacrilamida	37
3.6.1.2 Gel de Tricina	37
3.6.2 Espectrometria de Massas	38

3.6.3 Dicroísmo Circular.....	38
3.7 ANÁLISE COMPUTACIONAL.....	39
3.7.1 Buscas em Bancos de Dados	39
3.7.2 Alinhamento de Estruturas Primárias	40
3.8 SÍNTESE MANUAL DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA.....	40
3.8.1 Etapas da Síntese	40
3.8.2 Clivagem dos Peptídeos da Resina	42
3.8.3 Purificação dos Peptídeos.....	43
3.8.4 Caracterização dos Peptídeos	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 FRACIONAMENTO DA HEMOLINFA TOTAL.....	44
4.2 ENSAIO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO.....	45
4.3 REPURIFICAÇÃO.....	46
4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS	47
4.4.1 <i>Triatomina</i> (Amostra 8 - TIHT80%17-9)	47
4.4.1.1 Caracterização da <i>Triatomina</i>	49
4.4.1.1.1 Síntese em fase sólida	49
4.4.1.1.2 Bioensaios.....	50
4.4.1.1.3 Caracterização estrutural	57
4.4.2 <i>Triastina</i> (Amostra 3 – TIHT40%19-9).....	61
4.4.2.1 Caracterização da <i>Triastina</i>	63
4.4.2.1.1 Bioensaios.....	63
4.4.2.1.2 Caracterização estrutural	67
4.4.3 <i>Tin-TK-I e II</i> (amostra 7 e 2 – TIHT40%38-9 e TIHT5%24-11).....	68
4.4.3.1 Caracterização dos Peptídeos relacionados à Taquicinina.....	69
4.4.3.1.1 Síntese em fase sólida	69
4.4.3.1.2 Bioensaios.....	70
4.4.3.1.3 Caracterização estrutural	75
5 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS*	83
ANEXOS	92
A – Manuscrito Artigo submetido para a revista	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 MECANISMOS DE DEFESA DOS INSETOS

Há tempos o homem se pergunta sobre a origem e o funcionamento geral dos fenômenos biológicos e fisiológicos existentes. Uma questão que sempre gerou questionamentos é como os insetos se defendem da grande quantidade de agentes agressores a que são expostos diariamente.

Os insetos surgiram a aproximadamente 400 milhões de anos atrás, sendo o fóssil mais antigo já encontrado datado em 396 milhões de anos, da espécie *Rhyniognatha hirsti*, que esteve entre os primeiros animais a conquistar o meio terrestre (Scourfield, 1940).

A Classe Insecta, do Filo Arthropoda, representa a classe de animais mais abundante do planeta, com mais de um milhão de espécies catalogadas, representando mais de três quartos de todas as espécies de animais já descritas.

Os membros da classe Insecta são distribuídos em 29 ordens (Tabela 1), onde quatro dessas (Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera) correspondem a 81% de todas as espécies de insetos já descritas (Arillo, Engel, 2006; Foottit, Adler, 2009; Grimaldi, Engel, 2005).

Possuem ampla distribuição terrestre, podendo ser encontrados em praticamente todos os habitats existentes, com exceção apenas de habitats marinhos. Essa ampla distribuição terrestre mantida ao longo de eras, sugere a necessidade de desenvolvimento de diferentes mecanismos de defesa ao longo da sua trajetória.

A partir dessa premissa, começaram a se desenvolver estudos para uma melhor compreensão do sistema imune desses animais.

Tabela 1 – Número de espécies descritas em cada Ordem da Classe Insecta

Enumeração da quantidade de espécies já descritas dentro de cada uma das 29 Ordens da classe Insecta.

Ordem	Número de Espécies	Ordem	Número de Espécies
Coleoptera	359.891	Isoptera	2864
Lepidoptera	156.793	Phasmatodea	2853
Diptera	152.244	Mantodea	2384
Hymenoptera	144.695	Siphonaptera	2048
Hemiptera	100.428	Dermaptera	1967
Orthoptera	23.616	Mecoptera	681
Trichoptera	12.868	Strepsiptera	603
Thysanoptera	5749	Zygentoma	527

Neuroptera	5704
Odonata	5680
Psocoptera	5574
Phthiraptera	5024
Blattaria	4565
Plecoptera	3497
Ephemeroptera	3046

Archaeognatha	504
Embiodea	458
Megaloptera	337
Raphidioptera	225
Notoptera	39
Zoraptera	34
TOTAL	1.004.898

Adaptado de Footitt, Adler, 2009.

1.1.1 Barreiras Físicas

Os insetos apresentam algumas linhas básicas de defesa. Primeiramente estão as defesas como camuflagem e mimetismo que os impedem de serem encontrados pelos predadores (onde o primeiro o mescla com o meio, e o segundo o faz parecer com algum outro inseto que não é visado pelo predador em questão). Uma segunda linha são as defesas mecânicas (venenos, cerdas e ferrões) e comportamentais (tanatose: simulação de morte), que são normalmente utilizadas frente a grandes predadores (Gullan, Cranston, 2005).

Como uma terceira linha de defesa, assim como os outros serem vivos, os insetos apresentam barreiras físicas de proteção, tais como o tegumento, o sistema respiratório, a membrana peritrófica (presente na porção média de seu intestino) que é seguida de epitélio muscular e traqueia (Gullan, Cranston, 2005; Maramorosch, Shope, 1975):

- O tegumento é caracterizado por uma estrutura compacta quitinizada, resistente a alterações químicas e físicas. É de origem ectodérmica e pode ser descrito como uma cápsula oca e contínua, modificada por complexas inflexões e projeções, ou pode ser composto como uma película mole e flexível ou ainda uma carapaça relativamente dura e rígida, reforçada por uma cutícula recobrimdo toda a sua superfície (Berti Filho, 1978). É formado basicamente por três camadas: a membrana basal, epiderme e a cutícula sendo a camada mais externa (Gullan, Cranston, 2005);
- O sistema respiratório, composto por espiráculos e pela traqueia, também exerce função de defesa e proteção. Seu epitélio é formado por células colunares com bordas em escova e esparsas células caliciformes. É responsável pela resistência a infecções devido à adesão celular através de junções adesivo-coesivas, que impedem o fluxo de solutos e solventes entre os compartimentos, e também por constituírem uma barreira negativamente carregada devido à sua rigorosa

manutenção da concentração de sódio, potássio e cálcio intra e extracelulares que regula a composição de soluto dos componentes do trato digestivo, fluidos intracelulares do próprio epitélio (mantendo as cargas negativas) (Gullan, Cranston, 2005; Maramorosch, Shope, 1975);

- A membrana peritrófica está presente na porção média do intestino do inseto (*midgut*), e tem inicialmente a mesma função que o muco nos mamíferos. Ela protege as células epiteliais de possíveis danos causados por partículas ingeridas, ocorrendo principalmente em animais hematófagos, e é altamente permeável a enzimas digestivas e aos produtos da digestão (Maramorosch, Shope, 1975). Sua produção é induzida por resposta direta à alimentação com sangue e/ou por distensão mecânica da parede do intestino. Na maior parte dos insetos a membrana peritrófica também forma uma membrana ao redor do alimento ingerido e o acompanha durante seu caminho no trato digestivo, perdendo sua integridade em torno de 3 a 6 dias após sua formação. E apesar de não prevenir o inseto contra a infecção, consegue limitar o grau de infecção por dificultar a passagem dos patógenos do trato digestivo para a hemolinfa (Gullan, Cranston, 2005).

1.2.1 Barreiras Químico-Bioquímicas

Assim como foram observadas barreiras físicas, do ponto de vista bioquímico também é necessária à presença de um sistema imune para realizar eventuais defesas.

Então, a partir de estudos sobre suas barreiras químico-bioquímicas, foi identificado o sistema imune, dentro do qual podemos encontrar a imunidade inata, que é dividida em humoral e celular (Beckage, 2008).

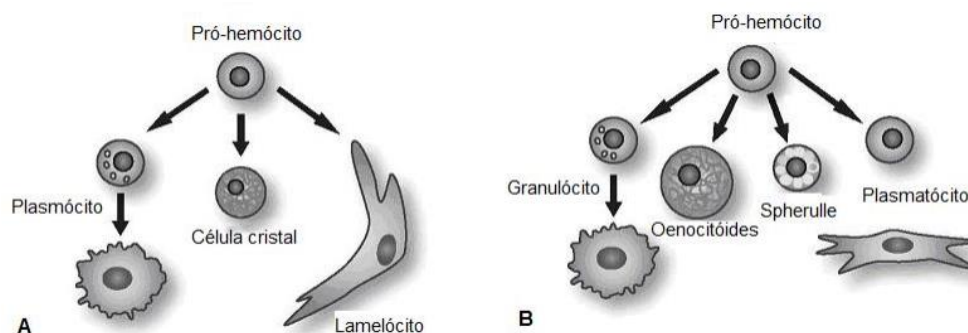
Curiosamente ainda não se tem dados exatos sobre o sistema adaptativo desses animais. Sabe-se que não apresentam um sistema imune adaptativo com células que promovem a memória imunológica propriamente dita, mas já foram descritas moléculas da superfamília das Imunoglobulinas Gs produzidas por esses animais (Watson et al., 2005), além de trabalhos que mostram uma certa especificidade na resposta imune frente a uma segunda exposição a patógenos (Kurtz, Franz, 2003; Little, Hultmark, Read, 2005; Sadd, Schimdt-Hempel, 2006). Então algum mecanismo de resposta rápida é requerido para conseguir defende-los de eventuais contaminações

por microrganismos, já que não possuem resposta imunológica em longo prazo ou memória imunológica comprovada.

A resposta inata é representada por três reações interconectadas (Hoffman et al., 1996), sendo a primeira reação a ativação de uma série de cascatas enzimáticas, como por exemplo, a ativação das cascatas de profenoloxidase e de coagulação (Blandin, Levashina, 2004; Cornelis, Soderhall, 2004; Hoffmann A., 1995; Strand, 2008; Theopold et al., 2004), a segunda reação a produção rápida e transitória de peptídeos antimicrobianos – PAMs – ambas pertencentes à imunidade humoral, e a terceira pertencente à imunidade celular, se refere às defesas como fagocitose e encapsulação que são mediadas principalmente pelos hemócitos (Gillespie et al., 1997; Irving et al., 2005; Strand, 2008; Strand, Pech, 1995).

Os principais constituintes da defesa celular de insetos contra infecções são os hemócitos presentes na hemolinfa. Essas células são comparáveis aos macrófagos em animais vertebrados (Meister, 2004; Strand, 2008). Estas células são derivadas dos pró-hemócitos (células jovens que aparecem nos estágios mais novos do desenvolvimento do inseto, dando origem aos hemócitos) e dependendo das suas características morfológicas, histoquímicas e funcionais podem apresentar nomes bem distintos (Meister, 2004).

Em linhas gerais, as células diferenciadas a partir dos pro-hemócitos da hemolinfa dos insetos são classificadas como granulócitos, plasmatócitos, esferulócitos e oenócitos (Figura 1). Os pro-hemócitos se diferenciam em lamelócitos essencialmente em situações de injúria, realizam principalmente a encapsulação dos alvos desconhecidos (Lanot et al., 2001; Meister, 2004; Strand, 2008).



Adaptação de Strand, 2008

Figura 1 – Representação da diferenciação de Pró-hemócitos de insetos

Representação da diferenciação dos pró-hemócitos nos principais tipos celulares presentes na hemolinfa dos insetos. (A) Três principais células circulantes da hemolinfa das larvas de *Drosophila*: Plasmócito,

Célula cristal e Lamelócito. (B) Classificação geral da diferenciação celular dos pró-hemócitos nos outros insetos: Granulócitos, Oenócitos, Esferulócitos e Plasmatócitos.

Em insetos sem injúrias, essas células aparentam, em sua maioria, estar completamente passivas na circulação ou na superfície de tecidos. Quando são submetidos a algum tipo de estresse (hormonal, injúrias e infecções), proteínas presentes no começo de cada cascata do sistema imune realizam o reconhecimento dos microrganismos ou partículas estranhas e induzem a ação das células (Hoffmann, 1995; Nyholm, Graf, 2012).

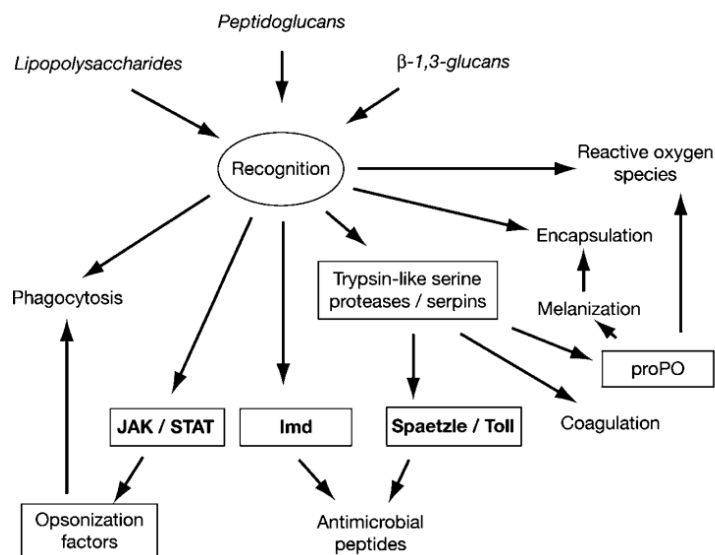
Em um primeiro contato com o organismo invasor, ocorre um aumento do número dessas populações celulares na hemolinfa através de estímulos para liberação de células de acumulação temporária, aumento da liberação de massas de células não proliferativas ou de órgãos fagocíticos, ou aumento na taxa de mitose dessas células já circulantes, que entram em contato com o alvo, se ligam a ele e induzem a formação de um fagossomo (vesícula contendo o alvo encapsulado) que posteriormente se une a um lisossomo e/ou endossomo, formando um fagolisossomo. Após essa fase de fagocitose, essas células podem começar a se agregar, formando anéis concêntricos de tecido conectivo fibroso, produzindo um nódulo que pode se mielinizar na tentativa de restringir o crescimento e movimento do organismo ali presente (Dunn, 1986). Geralmente essa encapsulação ocorre frente a grandes invasores, como parasitos, que não podem ser fagocitados por uma célula (Strand, 2008). Quando não ocorre a formação desses anéis de tecido conectivo fibroso, os hemócitos tentam apenas destruir o microrganismo liberando enzimas bacteriolíticas no seu citoplasma (Figura 2). O tempo de digestão intracelular de bactérias geralmente demora mais que 8 horas (Stuart, Ezekowitz, 2005).

Dentro do sistema imune inato humoral temos a produção de uma alta diversidade de moléculas solúveis. Uma das primeiras descobertas sobre essas moléculas foi a produção de um fator bactericida (contra bactérias Gram-negativas) modulável pelo calor que ocorre naturalmente em *Limulus polyphemus* (popularmente conhecido como caranguejo ferradura) ou em espécies de Lepidópteras (*Hyalophora cecropia*) as quais foram injetadas vacinas com preparados bacterianos. Além disso, foi observada, também em *H. cecropia*, a produção de um agente protetor não específico extremamente resistente a mudanças de pH e temperatura (Maramorosch, Shope, 1975). Atualmente esses fatores, que até então eram desconhecidos, já vêm sendo fortemente estudados e identificados como moléculas similares ao sistema

complemento, membros da cascata de coagulação, ou peptídeos antimicrobianos (Blandin, Levashina, 2004; Chinzei et al., 1990; Cornelis, Soderhall, 2004; Strand, 2008).

Geralmente o nível de peptídeos antimicrobianos na hemolinfa dos insetos sem infecções é baixo, elevando-se apenas frente a estímulos de infecção/invasão. Como os insetos não possuem mecanismos de memória imunológica há a necessidade de ativação das vias intracelulares para produção de PAMs a cada nova infecção.

Como principais vias que levam à produção de PAMs temos a *Spaetzle-Toll* - ativada em infecções por fungos e bactérias Gram-positivas, e a via *Imd* – ativada em infecções por bactérias Gram-negativas (figura 2). Devido à essa necessidade de ativar vias de sinalização para sintetizar novos RNAs frente a cada nova infecção, o tempo de produção dessas proteínas varia em torno de 8 horas (Dunn, 1986).



Fonte: Adaptado de Schmid-Hempel, 2005

Figura 2 – Representação das etapas desencadeadas após infecção por microrganismos.

Representação das etapas desencadeadas por infecções ou lesão tecidual em insetos, onde moléculas padrões de microrganismos (como lipopolissacarídeos - LPS, flagelina ou peptidoglicanos - PTG) são reconhecidas por receptores específicos nas células dos insetos, induzindo a ativação de cascatas de sinalização como JAK/STAT, Imd e Spaetzle/Toll, normalmente através do fator nuclear NF-κB, que leva à respostas como produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e NOS), além de recrutamento de hemócitos, fagocitose e ativação da cascata do complemento e de Profenoloxidase.

1.2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

1.2.1 Descrição Geral

Os PAMs fazem parte de um conjunto de estratégias desenvolvidas para defesa dos insetos frente a exposição de patógenos de diferentes origens. Eles são

componentes do sistema imune inato (Löfgren, 2012), podendo ser constitutivamente expressos ou induzidos por infecções (Li et al., 2012), sendo secretados na superfície de mucosas ou em fluidos corporais, e atua também como um componente da atividade de fagócitos (Zasloff, 1992). Apesar de possuírem um mecanismo de ação básico e “primitivo”, provém um rápido e efetivo meio de defesa contra patógenos (Lee et al., 2007; Li et al., 2012).

Já foram isolados e caracterizados PAMs de praticamente todos os organismos vivos, desde procariotos até os humanos (Li et al., 2012) e sua ampla distribuição nos Reinos Animal e Vegetal sugere que têm papel fundamental no sucesso evolutivo de organismos multicelulares mais complexos (Zasloff, 2002). Já foram descritos peptídeos com ação antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e até anti-cancerígena (Chapuisat et al., 2007; Lee et al., 2007; Li et al., 2012; Viljakainen, Pamilo, 2008).

1.2.2 Breve histórico em insetos

Foi tentando descobrir mais sobre a ação de componentes de defesa solúveis na hemolinfa desses animais, que moléculas com importante bioatividade, tais como os Peptídeos ou Proteínas Antimicrobianas – PAMs, começaram a serem descobertas.

São moléculas que foram descobertas em insetos primeiramente pelos estudos de Stevens (1962), seguido por Hink e Briggs (1968), Powning e Davidson (1973), Boman (1974) e Faye e Boman (1975). A partir desses estudos, o interesse por essas moléculas foi crescente, e em 1981 houve a caracterização das duas primeiras moléculas de PAM isoladas por Steiner e colaboradores, que por serem originadas da mariposa *Hyalophora cecropia*, foram nomeadas de Cecropinas, que dariam origem a um grande grupo de PAMs.

Nesta mesma década, Ganz e colaboradores (1985) descobriram uma nova classe de peptídeos chamados de Defensinas, mas dessa vez a descoberta foi em células de humanos e de coelhos. Essa classe se destacou devido à sua ação contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e até contra o vírus herpes simplex (Leher et al., 1991).

A partir dessas principais descobertas, esse campo de pesquisas passou por um período de intenso crescimento. Já foram isoladas e caracterizadas moléculas de diversas fontes - procariotos até os humanos (Li et al., 2012), e com diversas ações, tais como peptídeos com ações inibitórias - como inibidores de metaloproteases e

proteases (Ashida, et al. 2004; Vilcinskas, Wedde, 2002); peptídeos com ação em cascatas enzimáticas e de coagulação do sistema imune inato (Polanowski, Wilusz, 1996), assim como proteínas com capacidade de inibir a agregação plaquetária no sangue ingerido pelo inseto (Ribeiro, Garcia, 1981).

1.2.3 Classificação

Os PAMs são divididos em vários grupos baseados em seu tamanho, estrutura secundária e terciária, e na presença ou ausência de pontes dissulfeto (Reddy et al., 2004). Apesar de possuírem características estruturais diversificadas, a maioria dos PAMs são catiônicos e podem ser classificados em cinco principais grupos dependendo de sua estrutura primária e secundária: Lineares com estrutura Beta, Lineares com estrutura Alfa, Lineares com ombros, Cíclicos com alças e Derivados de grandes peptídeos de funções desconhecidas (Souza, De Simone, 2002). Classificações recentes dizem que podem ser classificados em três grandes grupos. Um grupo compreendendo os peptídeos com pontes dissulfeto intramoleculares (formando α -hélice- β -pregueado, estruturas de Grampo β -pregueado, ou estruturas mistas), um segundo grupo contendo peptídeos ricos em resíduos de Prolina e/ou Glicina, e um terceiro e último grupo contendo os peptídeos formados por α -hélices anfipáticas (Park, Lee, 2012). Dependendo da sequência de aminoácidos e atividade antimicrobianas os PAMs também podem ser classificados em cinco grandes grupos (Hwang et al., 2009; Li et al., 2012):

- As Cecropinas são um grupo de PAMs obtidos por indução, não sendo constitutivos (Li et al., 2012). Em sua forma madura apresentam aproximadamente de 35 a 39 aminoácidos de comprimento, e formam duas alfa-hélices lineares ligadas por uma articulação, que se integram às membranas celulares bacterianas ácidas e levam à sua ruptura (Charroux, et al., 2009; Duvic et al., 2012; Imamura et al., 2009; Li et al., 2012; Tanaka et al., 2005);
- A família das Defensinas é a única família de peptídeos catiônicos ricos em cisteína e polipeptídeos compostos estruturados por três ou quatro pontes dissulfeto (Li et al., 2012). Sua atividade é dependente da concentração de sal do meio (Yamaguchi, Ouchi, 2012), e são efetivos principalmente contra bactérias Gram-positivas e também apresentam algum potencial contra Gram-

- negativas, fungos e protozoários (Chapuisat et al., 2007; Li et al., 2012; Viljakainen, Pamilo, 2008);
- Os peptídeos ricos em prolina são predominantemente ativos contra bactérias Gram-negativas incluindo patógenos humanos e bactérias que se associam a plantas (Liu et al., 2007). Diferente dos outros grupos, o seu modo de ação não envolve lise de membrana, mas compreende a penetração em células susceptíveis, agindo no meio intracelular (Li et al., 2012);
 - Os Peptídeos ricos em glicina contêm de 14 a 22% de resíduos de glicina em sua constituição, o que afeta diretamente sua conformação terciária e o seu modo de ação consequentemente (Li et al., 2012). Apresenta ação contra fungos e Gram-negativas, podendo também agir destruindo a membrana de células cancerígenas (Lee et al., 2007);
 - As Lisozimas apresentam sequências de aproximadamente 34 resíduos de aminoácidos, e em situações normais se apresentam em baixos níveis circulantes na hemolinfa (Dunn, Drake, 1983) havendo aumento significativo apenas frente a infecções por bactérias (Anderson, Cook, 1979; Chadwick, 1970; Dunn, 1986; Powning, Davidson, 1973).

1.2.4 Mecanismos de Ação

Os fatores determinantes dos mecanismos microbicidas desses peptídeos estão relacionados às características das membranas celulares das células microbianas e a natureza físico-química do peptídeo (Liang, Kim, 1999). A maioria possui carga catiônica e hidrofobicidade relativamente alta em pH fisiológico, o que facilita a ligação e inserção a membrana das células microbianas (Souza, De Simone, 2002).

Dentro do grupo dos Insetos e Anfíbios os PAM produzidos são lineares, não possuem resíduos de cisteína e induzem efeitos danosos à célula microbiana por um mecanismo muito parecido com a resposta imunológica do sistema complemento nos humanos (Yamada, Natori, 1994; Zasloff, 1992). Dentro do grupo de PAMs com atividade antibacteriana, são mais comuns os que apresentam atividade simultânea contra Gram-positivas e negativas (Li et al., 2012).

Em bactérias Gram-positivas, a interação ocorrerá com a única membrana citoplasmática que envolve a célula bacteriana, enquanto em bactérias Gram-negativas a interação com a membrana externa (que funciona como parede celular) e com a

membrana citoplasmática se faz necessária para efetivação da atividade bactericida (Shai, 2002).

Os peptídeos catiônicos interagem possivelmente com o lipopolissacarídeo – LPS – encontrado na membrana externa das bactérias Gram-negativas e, subsequentemente, criam uma via de transporte rápida para transporte do próprio peptídeo. Assim, a propriedade de barreira seletiva da membrana é destruída e a célula bacteriana fica susceptível à passagem de uma grande variedade de moléculas, incluindo compostos hidrofóbicos, pequenas proteínas e/ou compostos antimicrobianos (Souza, De Simone, 2002).

Já foram descritos quatro principais meios de ação dos PAMs sobre a membrana celular. Eles podem se agregar formando canais, onde aumentam a permeabilidade de membrana, causando perda de parte do conteúdo intracelular, apesar de não ser totalmente eficiente para levar à morte celular (Brogden, 2005; Li et al., 2012). Outro meio de ação é conhecido como modelo toroidal, onde os peptídeos se agregam, ligam-se às membranas lipídicas, levando-as a se curvarem continuamente, fazendo com que ambos os peptídeos e o lipídeo se alinhem para que as porções hidrofílicas fiquem voltadas para o centro do poro formado (Brogden, 2005; Mihajlovic, Lazaridis, 2010). Os PAMs podem também agir como um Carpete de ação detergente que recobre a superfície celular até uma concentração limiar, levando à formação de agregados toroidais dos lipídeos da membrana (estabilizados pela porção anfipática dos peptídeos), gerando uma ruptura da mesma, conduzindo à morte celular (Brogden, 2005; Jean-Francois et al., 2008). Por último, o modelo de barril (barrel-stave model), onde feixes de hélices anfipáticas se oligomerizam e formam poros transmembrana com seus resíduos hidrofílicos voltados para a luz do poro. Alguns peptídeos de alfa-hélice atuam nesse mecanismo. A morte do microrganismo se daria então pela perda de polarização, por distúrbios na função de membrana na redistribuição de lipídeos, perda de conteúdo celular, e ativação de hidrolases que destroem a parede celular. (Brogden, 2005; Thevissen et al., 2007; Wu et al., 2010).

Além de sua ação em membranas, os PAMs podem apresentar ação intracelular que varia dependendo de suas características físicas e estruturais. Podem se ligar diretamente ao DNA levando a uma alteração da transcrição, pode inibir a síntese geral de DNA, RNA e proteínas e conseqüentemente podem inibir a síntese da parede

celular e do septo da membrana citoplasmática, podem ativar a autólise e conseguem inibir a atividade de enzimas intracelulares (Brogden, 2005).

1.3 PEPTIDEOS ANTIMICROBIANOS EM TRIATOMINEOS

Os membros da subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), popularmente conhecidos como barbeiros, são insetos hematófagos de grande interesse por serem organismos hematófagos transmissores do *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909).

Os triatomíneos podem entrar em contato com uma diversidade de microrganismos durante toda a sua vida, sejam estes provenientes do ambiente ou obtido durante a hematofagia. Na tentativa de eliminar esses microrganismos eles precisam induzir mecanismos inatos de defesa e a produção de PAMs é uma dentre as possibilidades (Assumpção et al., 2008; Waniek et al., 2009).

A espécie *Triatoma infestans*, foco de estudo neste trabalho, apresenta grande importância médica por ser um dos principais vetores da Doença de Chagas na América Central, e América do Sul (Figura 3).

Uma sequência de estratégias de prevenções primárias, voltadas para o controle da transmissão da doença de chagas, foram aplicadas para tentar erradicar o vetor da doença.

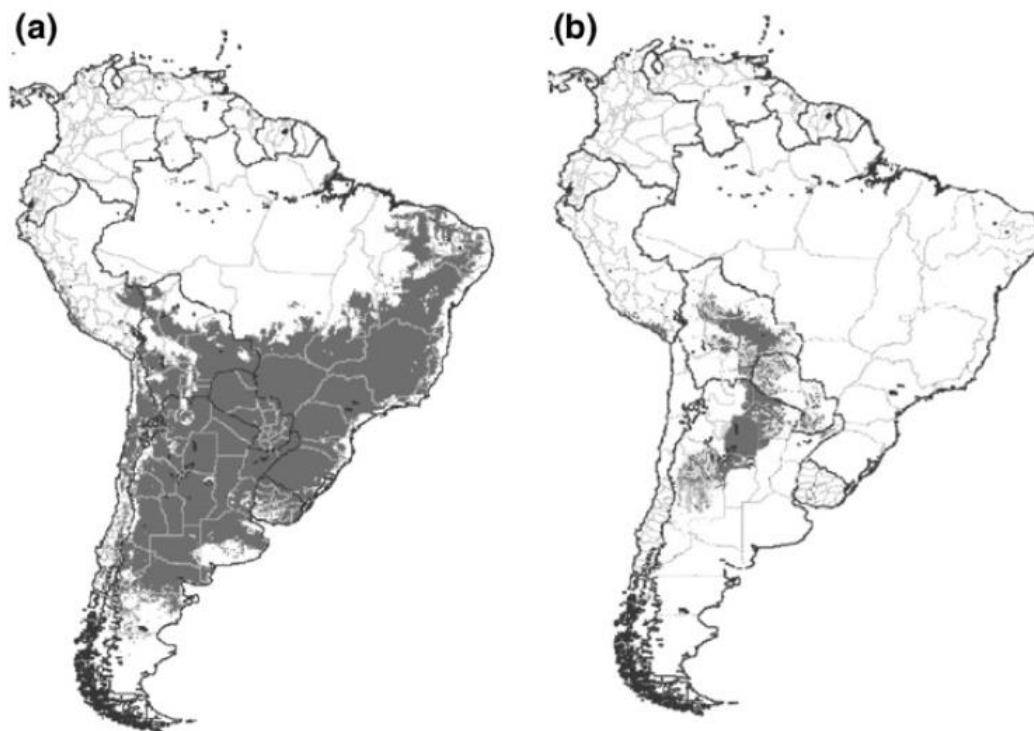
Essa estratégia básica, aplicada em toda a América do Sul, era dividida basicamente em três diferentes procedimentos: Controle direto do vetor (aplicação maciça de inseticidas); Melhoria habitacional (incentivo à construção de casas de alvenaria); e Ações de educação e organização social (Dias, Coura, 1997; Dias, 2011).

É possível observar uma redução significativa no tamanho populacional deste vetor dentro do país graças a essas práticas (Dias, Coura, 1997; Dias, 2011; Schofield et al., 2006), e até a década de 90 o *T. infestans* era considerado erradicado no Brasil. Contudo a doença de Chagas ainda se apresenta endêmica em alguns estados brasileiros, como por exemplo o estado de Minas Gerais, e já vem sendo retratados locais com reincidência do inseto (Ferreira, Silva, 2006; Leite, et al. 2001).

No que se refere à produção de PAMs pelos triatomíneos, poucas moléculas têm sido identificadas até o momento. Foi demonstrado que barbeiros da espécie *T. brasiliensis* expressam genes para duas Defensinas (*def3* e *def4*) em diversos tecidos tais como glândulas salivares, intestino, estômago, e corpo gorduroso (Waniek et al., 2009). Foram encontrados também que genes para proteínas Trialisinas que possuem

atividade antimicrobiana, expressos nas glândulas salivares de *T. infestans* (Assumpção et al., 2008).

Ainda não há pesquisas relacionadas à identificação de PAMs na hemolinfa de Triatomíneos, especificamente da espécie em estudo *T. Infestans*,



Fonte: Adaptado de Schofield et al., 2006.

Figura 3 – Comparação da incidência de *Triatoma infestans* na América do Sul antes e depois das iniciativas de erradicação

Representação da incidência de *Triatoma Infestans* na América do Sul no ano de 1991. Em A e B temos a representação das áreas de incidência antes e após as iniciativas de erradicação do inseto na América do Sul, respectivamente. Sendo que no Brasil ele pode ser observado em todas as regiões, com enfoque na Região Norte, área onde há menor distribuição do inseto no País.

Vale ressaltar que os estudos de PAMs em insetos não se devem apenas a busca de conhecimento dos mecanismos de defesa desses animais aos seus agentes agressores. Além da função de defesa dos insetos contra microrganismos, os PAMs têm ganhado grande destaque na comunidade científica visto que essas moléculas podem apresentar excelentes propriedades terapêuticas contra microrganismos que também afetam os seres humanos, incluindo vírus, bactérias e protozoários (Prates, Bloch, 2000).

Baseado nessas informações, acreditamos que os triatomíneos produzem grande quantidade e variedade de PAMs, no entanto trabalhos identificando e

caracterizando essas moléculas ainda são muito escassos. Além disso, estudos como esses se tornam essenciais para um melhor entendimento do sistema imune desses insetos, e também a fim de se criar uma possível alternativa para as atuais indústrias farmacêuticas, que enfrentam diretamente o desafio de identificar estratégias eficazes de se contrapor ao aparecimento de microrganismos multirresistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de moléculas bioativas, com enfoque em peptídeos antimicrobianos, na hemolinfa de *Triatoma infestans*, triatomíneo de grande importância na transmissão da doença de chagas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar moléculas bioativas da hemolinfa de triatomíneos da espécie *T. infestans*
- Avaliar sua atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos
- Avaliar sua ação hemolítica
- Caracterizar essas moléculas quanto ao seu tamanho e sua massa.
- Analisá-las por sequenciamento e compará-las com os bancos de dados específicos de insetos e Triatomíneos

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

A hemolinfa total utilizada no trabalho é proveniente de triatomíneos (adultos, machos e fêmeas) da espécie *T. infestans*, provenientes de uma colônia axênica, criados e mantidos em condições de laboratório, a 30 °C, em ambiente umedecido. A alimentação é realizada com sangue humano proveniente de um doador saudável a cada 20 dias, de acordo com o protocolo descrito por Martins e colaboradores (2001).

3.2 IMUNIZAÇÃO DOS INSETOS

Os insetos foram inoculados utilizando-se uma mistura das bactérias *Enterobacter cloacea* e *Micrococcus luteus* A270. Alíquotas dos microrganismos (10^7 células/mL) foram misturadas e centrifugadas por 10 minutos a 16.000 xg, o sobrenadante foi descartado e o pelet utilizado para inoculação. A imunização foi realizada através da perfuração dos animais com uma agulha fina previamente mergulhada no depósito de material formado através da centrifugação da mistura de bactérias (Figura 4), assim como descrito por Boman e colaboradores (1974).



Fonte: Laura Cristina Lima Diniz

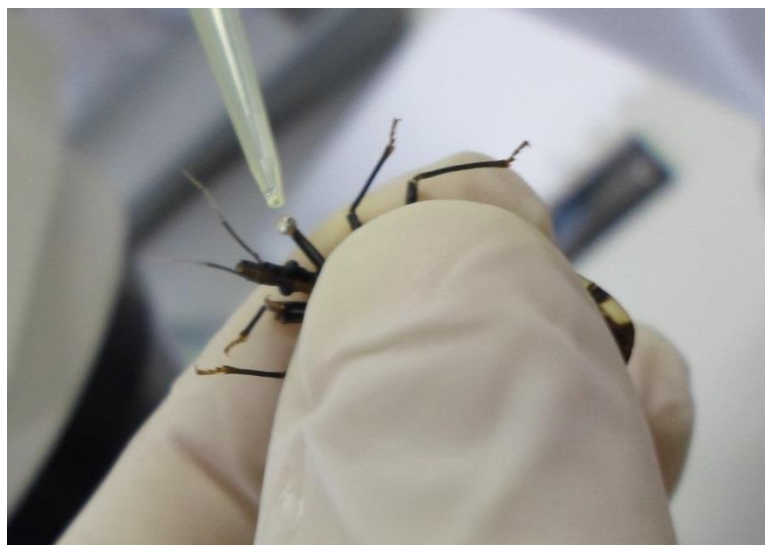
Figura 4 – Inoculação de microrganismos nos insetos

Desafio do *Triatoma infestans*. A agulha visualizada na imagem havia sido previamente mergulhada no pool de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (*Enterobacter cloacea* e *Micrococcus luteus* respectivamente).

3.3 EXTRAÇÃO DA HEMOLINFA

Após 72 horas da imunização, a hemolinfa total foi coletada através da secção do par de patas ligadas ao protorax ou metatorax, e pressionamento do abdome (Moreira et al., 2014). As gotas formadas foram coletadas com micropipetas (Figura 5) e armazenadas em tubos estéreis em gelo, contendo feniltiouréia – PTU – para evitar a ativação da cascata de profenoloxidase (Mello, Ratcliffe, 1995). Nesse procedimento

foram utilizados 17 insetos adultos, e o volume obtido foi 300 μ L de hemolinfa total, armazenada em freezer -80 °C até o uso.



Fonte: Laura Cristina Lima Diniz

Figura 5 – Extração de hemolinfa

Figura ilustrativa da extração de hemolinfa de um adulto da espécie *Triatoma infestans* por excisão do primeiro par de patas e leve pressionamento do abdome.

3.4 PURIFICAÇÃO

3.4.1 Extração Ácida

Para liberar o conteúdo intracelular dos hemócitos, foi realizada uma extração ácida do material, onde uma proporção 1:1 de ácido acético 2 M foi acrescentada ao volume de hemolinfa coletada para serem macerados juntos. A solução proveniente da maceração foi ressuspensa em 2,5 mL de ácido acético 2 M e levado para agitação (em agitador automático magnético Jenway®) a aproximadamente 1.369 xg em banho de gelo, para garantir a ação do ácido, e submetida à centrifugação a 16.000 xg por 30 minutos a 4 °C (Centrifuge 5804R Eppendorf® Instruments).

3.4.2 Pré-Purificação

O sobrenadante obtido foi aplicado em dois cartuchos Sep-Pak C18 (Water Associates) ligados em série e equilibrados com água acidificada (ácido trifluoroacético – TFA - 0,1%). Três eluições sequenciais foram realizadas utilizando-se diferentes concentrações de acetonitrila – ACN – em água acidificada (5%, 40% e 80%).

3.4.3 Cromatografia Líquida De Alta Eficiência – CLAE

As frações obtidas após a pré-purificação foram concentradas em centrífuga a vácuo, ressuspensas em água ultrapura acidificada (TFA 0,05%), e submetidas à CLAE. A Cromatografia foi realizada utilizando sistema UFLC Shimadzu modelo Proeminence com coluna de fase reversa semi-preparativa do tipo Júpiter C18 (250 mm x 10 mm, Phenomenex™) em um gradiente de concentração de 0% a 20% para a fração de 5%, de 2% a 60% para a fração de 40%, e de 20% a 80% para a fração de 80% de ACN acidificada (ACN/TFA) durante 60 minutos com fluxo de 1,5 mL/min. A absorvância foi monitorada em 225 nm, e cada molécula (ou grupo de moléculas) eluída da coluna cromatográfica, correspondentes aos frações no cromatograma, foram coletadas de forma manual, secas e ressuspensas em água ultrapura.

3.4.3.1 Repurificação

Quando necessário, uma segunda cromatografia foi realizada para garantir a homogeneidade do pico analisado. O gradiente para essa segunda cromatografia foi determinado a partir do tempo de retenção da fração alvo (concentração de ACN necessária para eluir a fração). Os valores inicial e final foram obtidos a partir da extensão da concentração de eluição de cada fração.

Esses procedimentos foram realizados em uma coluna analítica VP-ODS, com fluxo contínuo de 1.0 ml/min e a absorvância foi monitorada a 225 nm.

3.5 BIOENSAIOS

3.5.1 Ensaio de Inibição de Crescimento em Meio Líquido

Todas as frações obtidas nas cromatografias foram submetidos ao ensaio de inibição de crescimento em meio líquido, sendo testados contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos para avaliar se apresentam ação antimicrobiana. Os organismos utilizados nos ensaios foram: *Micrococcus luteus* A270, *Escherichia coli* SBS363 e *Candida parapsilosis* IOC 4564 (microrganismos padrões), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Micrococcus luteus* BR2, *Bacillus megaterium* ATCC 10778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterobacter cloacae* β -12, *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750, *Serratia marcescens* ATCC 4112, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Candida albicans* IOC 4558, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* PM 43, *Candida tropicalis* IOC 4560, *Cladosporium* sp. (isolado), *Penicillium expansum*

(isolado), *Aspergillus niger* (isolado), *Paecilomyces farinosus* IBCB-215 e *Cladosporium herbarum* ATCC 26362 (microrganismos adicionais).

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços com uma alíquota de 20 µL de cada fração coletada e 80 µL do microrganismo no meio de cultivo e em fase logarítmica de crescimento, na concentração final de 10^3 células/mL para bactérias e 10^4 células/mL para leveduras em cada poço. Os meios pobres de crescimento utilizado foram PB (peptonas 10 g/L; NaCl 5 g/L; pH 7,4) e Potato Dextrose Broth – PDB – Difco™, Houston, EUA, half strength, para bactéria e fungo respectivamente. Já os meios ricos de crescimento utilizados foram Ágar Mueller Hinton (peptonas 3 g/L; peptona de caseína 17,5 g/L; ágar 15 g/L; Ca^{2+} 20 – 25 mg/L; Mg^{2+} 10 – 12,5 mg/L; pH 7,4) e RPMI-1640 tamponado com MOPS 0,165 mol/L (RPMI sem bicarbonato 10,4 g/L; tampão MOPS [ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico] 34,53 g/L; pH 7,0) para bactérias e fungos respectivamente. Este ensaio é baseado nos ensaios descritos por Bulet e colaboradores (1993).

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima – CIM, o crescimento bacteriano foi analisado por medida da densidade óptica da cultura, num leitor de microplaca Victor 3 – 1420 (Perkin Elmer®) a 595 nm, após 18 horas de incubação a 30 °C sob agitação constante. Como controle de inibição de crescimento, foi utilizada a Estreptomicina, que é um antibiótico comercial com ação sobre todas as cepas acima citadas.

Para determinar a Concentração Bactericida Mínima – CBM, o crescimento bacteriano foi analisado por medida da densidade óptica da cultura, num leitor de microplaca Victor 3 – 1420 (Perkin Elmer®) a 595 nm, após 96 horas de incubação a 30 °C sob agitação constante.

3.5.2 Atividade Hemolítica

Foi utilizado, nesse ensaio, sangue de um doador humano saudável, coletado na presença de um tampão de citrato de sódio (150 mM; pH 7,4). O sangue foi centrifugado por 15 minutos a 700 xg, lavado três vezes e ressuspenso em PBS. As amostras provenientes do CLEA foram testadas ao menos três vezes, em diferentes concentrações, adicionando às amostras o mesmo volume de solução de eritrócitos (3%) em PBS. Essas soluções foram incubadas por 3 horas a 37 °C e então centrifugadas por 5 minutos a 700 xg. O sobrenadante foi transferido e usado para

medições de absorvância (405 nm) em um leitor de placa Victor (Victor - Perkin Elmer®).

As medidas de absorvância controle do sobrenadante, para 0% e 100% de hemólise foram obtidas da seguinte forma: para o controle negativo, 0% de hemólise, usamos o mesmo volume da mistura centrifugada, de uma solução 3% de hemácias com PBS. Para o controle positivo, foi usado o mesmo volume das amostras de eritrócitos com Triton X-100, 0,05%. O valor da absorvância foi determinado pela média das três soluções com diferentes concentrações da amostra (modificado de Hao et al., 2009).

3.5.3 Degradação em plasma

Para avaliar a resistência à degradação por enzimas presentes no soro 60 µL de cada peptídeo na concentração de 10 mg/mL permaneceram incubados em 200 µL de soro bovino fetal e 100 µL de PBS em um banho seco à 37 °C. Alíquotas de 100 µL foram retiradas em determinados tempos (0, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas) e as proteínas foram precipitadas com 10 µL de uma solução 50% TFA em água em tubos tipo eppendorf. Após agitados em vórtex, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 800 xg e 80 µL do sobrenadante foi injetado em um sistema CL-IES/EM. A identificação de cada peptídeo foi feita pela técnica de espectrometria de massas através do seu peso molecular, assim como dos fragmentos gerados em decorrência da degradação enzimática. Já o percentual de degradação foi obtido pela comparação da área dos picos de cada peptídeo no cromatograma obtido pelo detector UV-vis.

3.5.4 Estudos de interação peptídeo/vesícula

Para avaliar se os peptídeos agem diretamente em membrana, é necessário mimetizar uma bicamada lipídica celular. Para isso, são usados os chamados lipossomas, que são considerados como estruturas vesiculares, que se compõem de bicamadas que formam uma serie de coroas esféricas concêntricas, que no seu interior têm um compartimento intravesicular de solução.

Para sua formação, uma mistura de lipídeos é utilizada para conferir carga à membrana. São usados lipídeos carregados negativamente como 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)] – POPG – e neutros como 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina – POPC.

As Vesículas Unilamelares Gigantes – VUGs/GUVs– com composição lipídica de 30 mol% de POPG em POPC foram formadas a partir do método de eletroformação (Angelova e Dimitrov, 1986). Para tanto, 8 μ L de lipídio em solução de clorofórmio 2 mg/mL foram espalhados na superfície de duas lâminas condutoras de eletricidade (revestidas com óxido de estanho dopado com flúor). Após isto, os dois lados condutores das duas lâminas, que receberam a solução de lipídio, foram unidos por um espaçador de Teflon com 2 mm de espessura, preso as lâminas por duas presilhas de metal, formando uma câmara que foi preenchida por solução de sacarose 0,2 M (aproximadamente 1 mL). As lâminas foram então conectadas a um gerador de corrente alternada de 1 V com 10 Hz de frequência por 1 hora.

Após este período de formação das GUVs, estas foram transferidas para um tubo Eppendorf. Uma cela de observação foi preenchida com 95 μ L de uma solução 0,2 M glicose contendo os peptídeos na concentração desejada. Em seguida, 5 μ L da suspensão de GUVs foi adicionada à cela de observação, que foi então fechada com uma lamínula e a observação foi imediatamente iniciada com um microscópio invertido (Zeiss Axiovert 200, Jena, Alemanha) equipado com uma objetiva de 40 x e uma câmera digital PCO.edge 4.2. Devido a diferenças na densidade e no índice de refração entre as soluções de sacarose e glicose, melhorou-se o contraste entre o meio intra e extravesicular das GUVs quando observadas em microscopia ótica de contraste de fase.

Para cada peptídeo testado, analisou-se primeiramente o comportamento das GUVs na ausência de peptídeo, sendo este dado considerado como o comportamento controle, para uma comparação após a adição de cada peptídeo.

Em todas as análises quantitativas, os dados foram coletados através de filmagens, que tiveram duração total de 8 minutos. Este tempo de filmagem se mostrou suficiente para se traçar um perfil geral da ação dos peptídeos.

O vídeo captado foi convertido em imagens consecutivas (frames) e processados através do software ImageJ.

Este experimento foi realizado com o auxílio da Doutora Karin Riske, no Laboratório de Biomembranas do Departamento de Biofísica, da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

3.6 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

3.6.1 Eletroforese

3.6.1.1 SDS PAGE – Poliacrilamida

A eletroforese, sendo comum a utilização do método descrito por Laemmli (1970), é muito utilizada para a avaliação de proteínas através de sua migração no gel, no qual se consegue observar uma alta resolução das bandas proteicas de acordo com a concentração de acrilamida presente no meio.

Para avaliar a massa molecular das frações com atividade, foram realizadas eletroforeses em gel de acrilamida com concentração de 15%, através da utilização de um sistema Mini-PROTEAN III da Biorad® (18 x 16 cm x 1,5 mm), em voltagem constante de 100 V, sob condições redutoras (pela presença de β -mercaptoetanol). As amostras aplicadas no gel foram diluídas em tampão de amostra (350 mM de Tris/HCl; 30% de glicerol; 1,2 mg de azul de bromofenol), e aquecidas a 100 °C em termobloco durante 5 minutos. O material foi aplicado em um gel de empilhamento de 5% de poliacrilamida, utilizando para comparação o padrão PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

A revelação das bandas proteicas dispostas no gel se deu através da utilização do corante Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Aldrich, St. 17 Louis, EUA), e a descoloração se deu através da imersão contínua em uma solução contendo metanol/ácido acético/água, na proporção 30:10:60.

3.6.1.2 Gel de Tricina

Para avaliar a separação das moléculas de baixo peso presentes nas amostras com atividade, foi realizada uma eletroforese em gel de tricina padronizada por Hermann Schägger (2006).

Para o procedimento, foi realizada uma eletroforese em gel com diferentes concentrações, sendo a primeira de 16% de tricina no gel de corrida, a segunda de 10% de tricina no gel de empilhamento e a última de 4% de tricina no gel de empilhamento, utilizando o sistema Protean® II xi Cell da Biorad® (16 x 20 cm x 1,0 mm) em voltagem inicial de 30 V durante uma hora (até a amostra entrar completamente no gel) e 90 V durante 12 horas, sob condições redutoras.

Ao volume das amostras aplicadas no gel foi acrescentado de um volume proporcional de tampão de amostra (load buffer - 12% SDS [p/vol], 6% mercaptoethanol [vol/vol], 30% glicerol [p/vol], 0.05% Coomassie blue G-250, 150 mM Tris/HCl [pH 7.0]) e deixado em incubação a 37 °C por 30 minutos. As amostras preparadas foram aplicadas no gel de pente 4% e o padrão utilizado foi uma mistura de moléculas de peso molecular conhecido.

A revelação das bandas no gel foi realizada através da utilização do corante Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Aldrich, St. 17 Louis, EUA) após o gel ser submetido a uma imersão contínua em solução fixadora (100 mL de metanol, 20 mL de ácido acético, 1,45 g de Acetato de amônio, 80 mL de água ultrapura) por uma hora. O gel foi descorado através da imersão contínua em uma solução contendo metanol/ácido acético/água, na proporção 30:10:60.

3.6.2 *Espectrometria de Massas*

Para avaliar a pureza das moléculas obtidas e avaliar sua massa molecular, a análise de massas foi realizada em um LTQ XL Thermo Scientific (“Linear ion Trap Mass Spectrometer”) – O equipamento foi previamente calibrado com as seguintes substâncias: cafeína (m/z 192,5), acetato de L-MRFA em água (m/z 524,3) e Ultramark 1621. Para controle do equipamento foi utilizado ovoalbumina (43 kDa). As amostras foram previamente concentradas em uma centrifuga a vácuo e ressuspendidas em 15 µl em ácido fórmico 0,1%. Para análise foi utilizada coluna C18 (Waters) e um gradiente linear de acetonitrila de 0 a 80% em água acidificada (AF0,1%) em 60 minutos e o fluxo de 400 nL/min. Análises realizadas com o espectrômetro operando em modo positivo. Os espectros foram coletados e analisados no software Xcalibur 2.0 (Thermo Electron, EUA). A deconvolução dos valores de m/z para a obtenção das massas moleculares dos peptídeos foi realizada nos softwares MagTran 1.02 e MassAnalyser 1.03 (Zhang, Marshall, 1998).

3.6.3 *Dicroísmo Circular*

A técnica de Dicroísmo Circular é baseada na alteração da polarização da luz incidente sobre uma molécula. A luz, quando circularmente polarizada, é composta por dois componentes, um que gira no sentido horário – R – e outro que gira no sentido anti-horário - L. Quando esse feixe de luz polarizado incide sobre um aglomerado de

dentros quirais (e. g. proteínas ou peptídeos), parte desses componentes R e L são absorvidos, e a diferença dessa absorção define o sinal padrão da estrutura secundária encontrada neste centro (Kelly, et al., 2005).

Os espectros de dicroísmo circular – DC – foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco (J815, Jasco corp., Tokyo, Japão) na faixa de 190-250 nm, utilizando uma cela retangular de quartzo com caminho óptico de 1,0 mm. O equipamento utilizado se encontra no laboratório Laboratório de Compostos Bioativos – Lacombe – localizado na Universidade Federal do ABC – Santo André/SP, e o experimento realizado com o auxílio do estudante de Pós-Doutorado Flávio Lopes Alves.

Os espectros foram coletados com o tempo de resposta de 8 segundos, velocidade de aquisição 50 nm/min, passo 0,2 nm e em 4 aquisições. Os espectros foram feitos em soluções peptídicas de concentração 10^{-3} mol.L⁻¹ em água e soluções de Trifluoroetanol – TFE – em diversas porcentagens (10%, 30% e 50%). Os espectros são apresentados em elipticidade molar para que os valores sejam independentes da concentração da amostra e do caminho ótico da cubeta.

3.7 ANÁLISE COMPUTACIONAL

3.7.1 Buscas em Bancos de Dados

Os dados brutos referentes às análises MS/MS foram primeiramente processados no software Mascot Daemon® version 2.2.2, através de busca de similaridades em bancos de dados, tais como Swissprot, NCBI, além de bancos específicos de Hemípteras e Triatomíneos. As buscas por homologia de possíveis moléculas encontradas foram realizadas utilizando os bancos de dados padrões como ArachnoServer Spider Toxin Database (<http://www.arachnoserver.org>); The Arthropoda PartiGeneDatabases (<http://www.nematodes.org/NeglectedGenomes/ARTHROPODA>); PepBank peptide database (<http://pepbank.mgh.harvard.edu>); Bioactive Database (<http://biopd.bjmu.edu.cn>); Signal Peptide Database (<http://signalpeptide.de>); Signal Peptide Resource (<http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb>); Vector Base (<http://vectorbase.org/>); APD2: Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor (http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php) e BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sempre que possível filtros para insetos, hemípteras e triatomíneos foram utilizados no intuito de refinar as buscas.

Os arquivos gerados no equipamento LTQ-Orbitrap foram carregados no software PEAKS (Bioinformatics Solutions Inc.), submetidos a análise em bancos de dados padrões provenientes no software, além dos bancos de Insetos, Hemípteras, Triatomíneos, Fibrinogênio e Taquicininas (provenientes do Uniprot (www.uniprot.org, 1243446; 133071; 31334; 12342 e 1155 sequencias respectivamente em 25/03/2015), além de sequenciamento “*de novo*” quando nenhuma similaridade foi encontrada com os bancos de dados fornecidos. Os parâmetros de busca foram: tolerância do precursor: 10 ppm, tolerância dos fragmentos: 0.6 Da, sem presença de digestão enzimática.

Os resultados obtidos somente foram considerados válidos quando houve reprodutibilidade dos mesmos em análises por diferentes softwares.

3.7.2 Alinhamento de Estruturas Primárias

O alinhamento de estruturas primárias de diversas proteínas foi realizado por meio da ferramenta ClustalW2 version 2 (Larkin, et al., 2007), utilizando os parâmetros *default*.

3.8 SÍNTESE MANUAL DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

3.8.1 Etapas da síntese

Síntese manual de peptídeos em fase sólida (SPPS) é uma técnica desenvolvida por Merrifield em 1963, e que consiste basicamente na produção de um peptídeo a partir do ancoramento do aminoácido C-terminal a um polímero insolúvel, e sucessivas etapas de adição dos aminoácidos subsequentes à esta estrutura primária. Os reagentes e etapas utilizados na síntese através da estratégia t-Boc estão descritos na Tabela 2.

Os peptídeos foram sintetizados pelo método t-boc em fase solida manual na escala de 0,6 mmol, utilizando a resina MBAR com grau de substituição de 1,0 mmols/g de resina. Os acoplamentos foram realizados com excesso de 2,5 x de Boc-AA e DIC/HOBt em DCM/DMF (1:1 vol/vol), por 120 minutos. Para o monitoramento das etapas de desproteção e acoplamento foi utilizado o teste de Kaiser (Chan e White, 2000), também conhecido como teste de ninidrina, onde são acrescentados duas gotas Piridina, duas gotas de uma solução de Ninidrina (500 mg de Ninidrina diluído em 10 mL de n-Butanol) e duas gotas de uma solução de Fenol (80 g de Fenol diluído em 20

mL de n-Butanol) à solução contendo a peptidil-resina. A Ninidrina reage com o grupo amino do aminoácido a uma temperatura de 110 °C por dois minutos em meio alcalino, resultando em uma coloração amarela (resultado negativo) em que não existem aminogrupos livres ou em uma coloração púrpura (resultado positivo) quando há a existência de aminogrupos livres, e, portanto, há necessidade de reacoplamento.

Para os reacoplamentos foram realizados utilizando excesso de 2,5 vezes de Boc-AA, com adição de BOP em excesso de 2,5 vezes também e DIEA em DCM/NMP (1:1 v/v), controlando o pH aparente entre 8,0 - 9,0 por duas horas. Para a acetilação foi utilizado anidrido acético em DMF (1:4 v/v), por 20 minutos.

Tabela 2 – Etapas necessárias para a realização da síntese manual de peptídeos

Enumeração das etapas necessárias para a realização da síntese manual de peptídeos. As etapas são divididas em: Desproteção, onde o grupo protetor da porção C-termina do ultimo aminoácido incorporado é retirado; Neutralização, onde os grupos protetores desacoplados na etapa anterior são retirados do meio; Acoplamento, onde o novo aminoácido é incorporado; Teste de kaiser para confirmar se ocorreu o acoplamento ou o desacoplamento na sequência em formação.

Etapas		Numero de lavagens	Reagente
Desproteção	1	1	Metanol - MeOH
	2	3	Diclorometano - DCM
	3	1	50% TFA/DCM + 0,5 mL de anisol/g de resina inicial (incubação: 20 minutos)
Neutralização	4	2	2% de anisol/isopropanol
	5	2	10% Trietilamina – TEA/DCM
	6	2	MeOH
	7	2	10% TEA/DCM
	8	2	MeOH
	9	5	DCM
Acoplamento	10	1	2,5 Equivalentes de Boc-AA + 2,5 Equivalentes de DIC/HOBt em DCM/DMF (1:1 v/v)
	11	2	MeOH
	12	2	10% TEA/DCM
	13	2	MeOH
	14	5	DCM

Teste de Kaiser		Se negativo	Recomece da etapa 3
		Se positivo	Continue siga para a etapa 15
Reacoplamento	15	1	2,5 Equivalentes de Boc-AA + 2,5 Equivalentes de BOP/DIEA em DCM/NMP (1:1 v/v)
	16	2	MeOH
	17	2	10% DIEA/DCM
	18	2	MeOH
	19	5	DCM
Teste de Kaiser		Se negativo	Recomece da etapa 3
		Se positivo	Recomece da etapa 15

3.8.2 Clivagem dos peptídeos da resina

A fim de clivar os peptídeos da resina e desproteger totalmente as cadeias laterais na estratégia t-Boc, foi usado o ácido TFMSA. Para cada 1 g de peptídil-resina, foram adicionados 20% (m/v) de TFMSA, 70% (m/v) TFA, 5% (m/v) de o-cresol e 5% (m/v) de dimetilsulfeto. O processo foi iniciado pela adição de o-cresol e dimetilsulfeto ao peptídil-resina devidamente pesado em um balão volumétrico, onde eram mantidos sob agitação por um período de cinco minutos em banho de gelo e atmosfera de nitrogênio. Após isso, foi gotejado Acido trifluoroacético à mistura (com o auxílio de um funil de separação). E após 20 minutos de agitação, foi adicionado TFMSA e então essa solução permaneceu em agitação em câmara fria à 4 °C e o tempo de permanência foi escolhido de acordo com a sequência peptídica. Essa solução foi transferida para um béquer com 100 mL de água ultra pura após o tempo de incubação e mantida sob agitação por mais dez minutos. Passado este período, a solução foi filtrada e submetida a uma extração líquido-líquido com Éter etílico gelado em funil de separação. A solução aquosa foi separada por decantação, neutralizada com hidróxido de amônio para um pH de 5,0 e submetida a liofilização.

Antes do processo de liofilização, uma alíquota era retirada e injetada no sistema de CL-IES/EM para uma prévia caracterização dos peptídeos brutos, monitorando os tempos de retenção e a presença de possíveis contaminantes.

3.8.3 Purificação dos peptídeos

Os peptídeos liofilizados foram solubilizados em água ultra pura e injetados em um sistema de cromatografia (CLAE-FR/UV). A coluna cromatográfica semipreparativa utilizada foi Júpiter C₁₈ (25 x 250 mm, 300 Å, 15-20 µm) e comprimento de onda de 220 nm. Para a escolha dos gradientes da fase móvel e a duração da corrida cromatográfica foram levados em consideração os perfis cromatográficos dos peptídeos brutos em CL-IES/EM. A análise da presença de subprodutos indesejados orientava a escolha dos sistemas de solventes empregados e a quantidade de etapas de purificação. Se o perfil apresentasse muitos contaminantes, utilizava-se duas etapas, a primeira com o sistema 2 (TEAP pH 2,5 e 60% de ACN em 0,1% TFA), seguida do sistema 1 (0,1% TFA em 60% ACN em 0,1% TFA), ambas com fluxo de 10 mL/min. Isso para garantir uma maior capacidade de separação dos contaminantes e conseqüentemente, uma melhor purificação. Para os que continham baixo teor de contaminantes era empregado apenas o sistema 1 (0,1% TFA em 60% ACN em 0,1% TFA).

3.8.4 Caracterização dos peptídeos

As caracterizações dos peptídeos foram realizadas em CL-IES/EM utilizando uma coluna cromatográfica da Waters Nova-Park C₁₈ (2,1 x 150 mm, 60Å, 3,5 µm), seguindo o sistema 1 com fluxo de 0,3 mL/min. O tempo de corrida foi de 30 minutos em gradiente variando de 5 a 95% de solvente B. O intervalo de massas foi de 200-2000 Daltons e comprimento de onda de 214 nm. CL-IES/EM composto por um CLAE modelo Alliance 2695, um detector UV-Vis modelo 2487 e um espectrômetro de massas modelo 3100 com fonte de ionização eletrospray todos adquiridos da Waters Associates (Milford, MA, EUA). O sistema é controlado por uma Workstation Dell através do software denominado MassLynx.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FRACIONAMENTO DA HEMOLINFA TOTAL

A hemolinfa total, após sofrer extração ácida, foi submetida à pré-purificação utilizando-se colunas descartáveis Sep-Pak®C18, onde três eluições sequenciais foram realizadas em diferentes concentrações de ACN (5%, 40% e 80%).

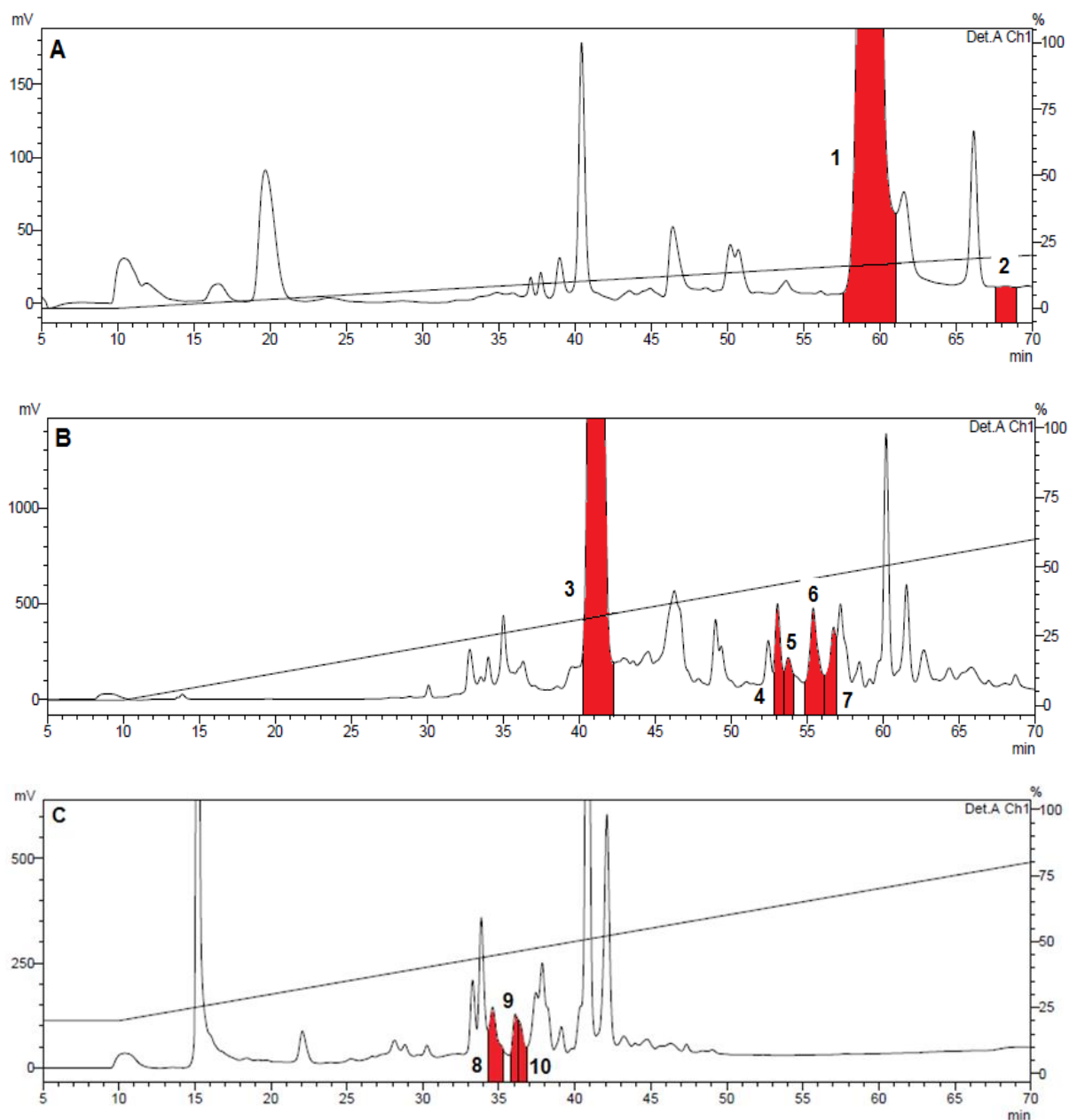


Figura 6 – Cromatograma do fracionamento das frações TIHT 5%, 40% e 80%

O cromatograma (A) representa a porção eluída com ACN em concentração de 5% (TIHT 5%) em uma coluna cromatográfica de fase reversa semi-preparativa do tipo Júpiter C18 (250 mm x 10 mm, Phenomenex™) em um gradiente de concentração de 0% a 20%, durante 60 minutos com fluxo de 1,5 mL/min. (B) representa a porção eluída com ACN em concentração de 40% (TIHT 40%) em uma coluna cromatográfica de fase reversa semi-preparativa do tipo Júpiter C18 (250 mm x 10 mm, Phenomenex™) em um gradiente de concentração de 2% a 60%, durante 60 minutos com fluxo de 1,5 mL/min. (C) representa a porção eluída com ACN em concentração de 80% (TIHT 80%) em uma coluna

cromatográfica de fase reversa semi-preparativa do tipo Júpiter C18 (250 mm x 10 mm, Phenomenex™) em um gradiente de concentração de 20% a 80%, durante 60 minutos com fluxo de 1,5 mL/min. Em destaque e numeradas de 1 a 10, temos as frações correspondentes às frações que apresentaram atividade antimicrobiana quando submetidas ao teste de inibição de crescimento microbiano em meio líquido.

As frações obtidas, como descrito acima, foram submetidas à CLAE e as coletas foram realizadas manualmente. Na primeira eluição, realizada com ACN na concentração de 5% (TIHT 5%), foram obtidas 24 frações (Figura 6A) sendo duas com atividade antimicrobiana, destacadas em vermelho. Na segunda eluição, realizada com ACN na concentração de 40% (TIHT 40%), foram obtidas 54 frações (Figura 6B) sendo cinco com atividade antimicrobiana, destacadas em vermelho. Na terceira e última eluição, realizada com ACN na concentração de 80% (TIHT 80%) foram obtidas 48 frações (Figura 6C) sendo três com atividade antimicrobiana, destacadas em vermelho.

4.2 ENSAIO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO

Na cromatografia do extrato ácido da hemolinfa foram coletadas manualmente 128 frações e todas submetidas a um ensaio de inibição de microrganismos em meio líquido. Essas frações foram avaliadas contra três diferentes microrganismos, uma bactéria Gram-positiva (*Micrococcus luteus* A270), uma bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli* SBS363) e um fungo dimórfico (*Candida parapsilosis* 4564). Essas espécies de bactérias e fungos foram escolhidas visto que as mesmas já haviam sido testadas em trabalhos como o de Silva Jr. (2000), Riciluca (2011) e Sayeg (2011), utilizando hemolinfa de aranhas e opiliões e demonstraram resultados com uma ótima abrangência e reprodutibilidade.

Tabela 3 – Teste de inibição de crescimento de microrganismos em meio líquido das amostras provenientes da cromatografia líquida

Representação dos resultados do ensaio de inibição de crescimento em meio líquido, representando a ação antimicrobiana de cada fração testada frente aos microrganismos citados. TIHT 5% representa a porção hidrofóbica da amostra de hemolinfa total eluída da coluna cromatográfica com ACN em concentração de 5%, contendo as frações 1 e 2, TIHT 40% representa a porção eluída com ACN de 40%, contendo as frações 3, 4, 5, 6 e 7, e TIHT 80% representa a porção eluída com ACN de 80%, contendo as frações 8, 9 e 10. Os microrganismos utilizados no ensaio são *Candida parapsilosis* (fungo), *Escherichia coli* cepa SBS363 (bactéria Gram negativa) e *Micrococcus luteus* cepa A270 (bactéria Gram positiva).

Numeração	Amostra	Microrganismo		
		<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Micrococcus Luteus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Amostra 1	TIHT 5% 21	+	-	-
Amostra 2	TIHT 5% 24	-	-	+
Amostra 3	TIHT 40% 19	+	-	-
Amostra 4	TIHT 40% 34	-	+	-
Amostra 5	TIHT 40% 35	-	-	+

Amostra 6	TIHT 40% 37	-	-	+
Amostra 7	TIHT 40% 38	-	+	-
Amostra 8	TIHT 80% 17	-	+	-
Amostra 9	TIHT 80% 19	-	+	-
Amostra 10	TIHT 80% 20	-	+	-

Na tabela 3 estão apresentadas as atividades antimicrobianas das frações 1 e 2 isoladas da eluição da hemolinfa com ACN 5% (Figura 6A e Tabela 3), das frações 3, 4, 5, 6 e 7, isoladas da eluição com ACN 40% (Figura 6B e Tabela 3) e das frações 8, 9 e 10 foram obtidas através da eluição com ACN 80% (Figura 6C e Tabela 3).

4.3 REPURIFICAÇÃO

Quando analisadas por eletroforese em Gel de Acrilamida, não houve o aparecimento de bandas em nenhuma das dez amostras, o que pode ser indicativo de moléculas de baixo peso. Já no gel de tricina, todas as amostras apresentaram mais de uma banda, sendo todas elas menores que três kDa (dados não mostrados). Além de apresentarem mais de uma banda no perfil eletroforético, uma análise inconclusiva dos dados provenientes do espectrômetro de massas também demonstrou heterogeneidade das amostras. Frente a isso, foi necessária realizar uma segunda etapa de purificação para obter uma melhor separação das frações.

Para cada uma das dez amostras foi realizada uma nova cromatografia. Todas as frações obtidas foram coletadas manualmente e submetidas a um segundo teste de inibição de crescimento de microrganismos em meio líquido para reafirmação das atividades, e o resultado obtido está demonstrado na tabela 2.

O teste foi realizado nos mesmos padrões do primeiro (Item 7). Três amostras não apresentaram atividade antimicrobiana após a repurificação e uma nova fração se mostrou ativa neste segundo teste. A perda da atividade das amostras pode ser devido ao fato de ocorrer perda de material a cada cromatografia realizada.

Tabela 4 – Teste de inibição de crescimento de microrganismos em meio líquido das amostras obtidas pela abertura de gradiente

Todas as frações provenientes da abertura de gradiente foram submetidas a um segundo teste de inibição de crescimento em meio líquido para reafirmação das atividades. Foram confirmadas 6 atividades e ocorreu o aparecimento de uma sétima atividade que não havia sido encontrada anteriormente. Três amostras não apresentaram atividade no segundo teste antimicrobiano.

Numeração	Fração	Pico	Microrganismo		
			<i>C. parapsilosis</i>	<i>M. Luteus</i>	<i>E. coli</i>
Amostra 8	80% - 17	9	-	+	-
Amostra 3	40% - 19	9	+	-	-
Amostra 5	40% - 35	9	-	-	+
Amostra 6	40% - 37	13	-	-	+

Amostra 7	40% - 38	9	-	+	-
Amostra 2 -1	5%-24	2	-	-	+
Amostra 2 - 2	5%-24	11	-	-	+

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

As 7 amostras purificadas foram submetidas à espectrometria de massas, para sua posterior identificação. Dentre todas, quatro amostras principais foram escolhidas para dar seguimento ao trabalho, devido à sua maior intensidade de sinal e clareza dos dados provenientes do espectrômetro de massas.

4.4.1 *Triatomina* (Amostra 8 - TIHT80%17-9)

Os dados provenientes do espectrômetro de massas, ao serem analisados através do software MagTran[®]1.02, indicaram a que a massa aproximada do peptídeo é 1530 Da (Figura 7).

O peptídeo ao ser analisado através do software MASCOT, em comparação com o banco de dados Swissprot, apresentou similaridade com a Cadeia Alfa do Fibrinogênio Humano (Figura 8A). Ao utilizarmos os mesmos parâmetros de busca através do Programa Peaks, o resultado se repete (Figura 8B).

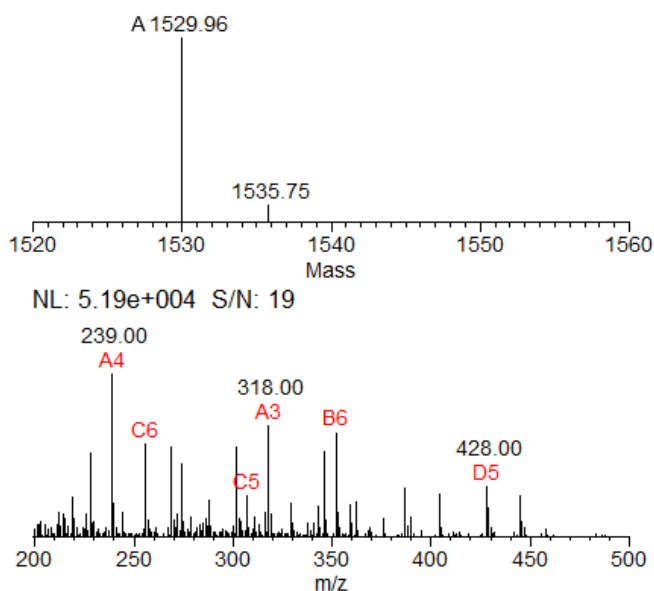


Figura 7– Determinação da massa através do software MagTran[®]

Análise realizada através do software MagTran[®]1.02, onde a deconvolução dos íons indica uma massa aproximada de 1529,96 Da para o peptídeo analisado.

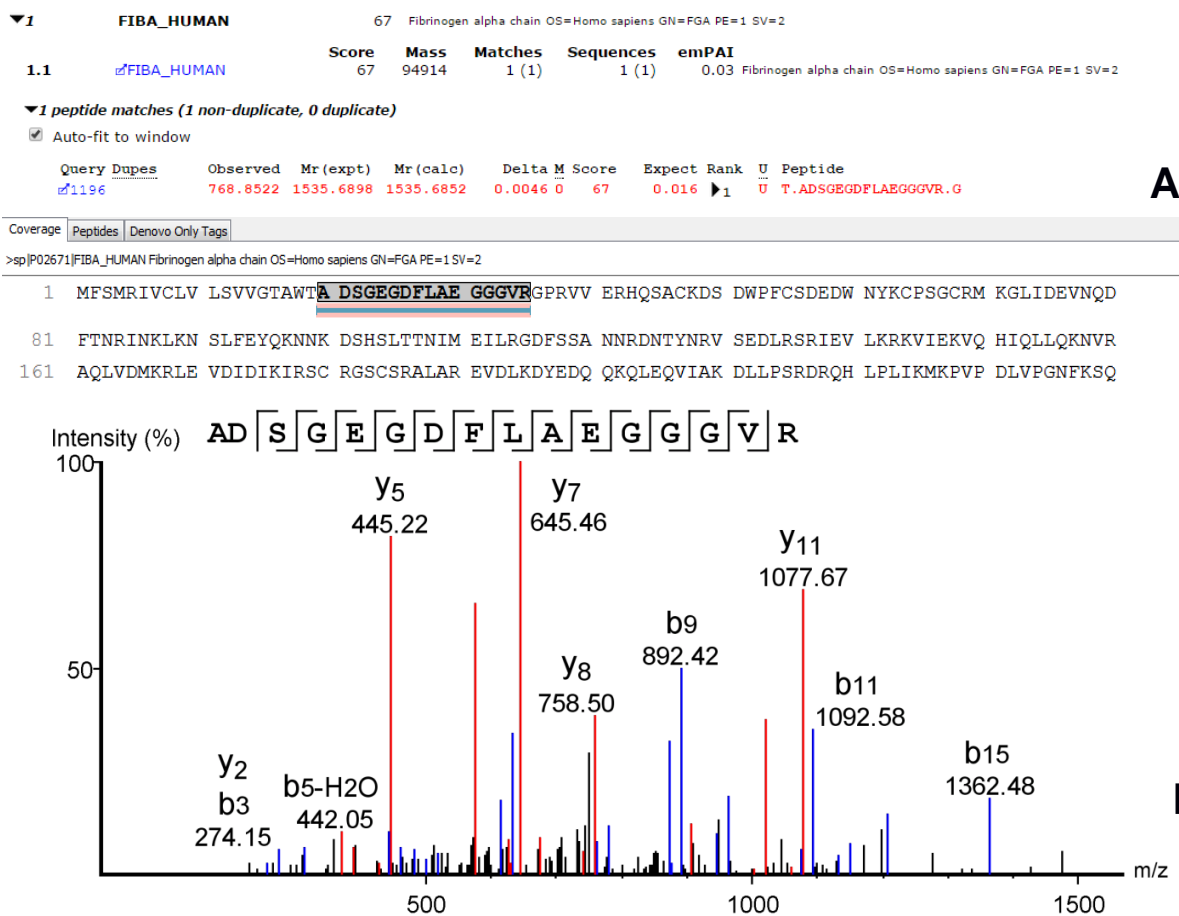


Figura 8 – Análise do Triatomina através dos softwares PEAKS™ e MASCOT®

Em A temos a representação do resultado obtido através do software MASCOT, utilizando o banco Swissprot como banco de dados para comparação. Já na figura B está o resultado da análise do Triatomina através do Peaks™, onde é possível observar a deconvolução da sequência dentro do espectro.

Através da deconvolução do espectro e do registro da molécula no site RCSB protein databank (<http://www.rcsb.org/>), é possível observar que a sequência encontrada no banco de dados corresponde exatamente ao peptídeo em questão (Figura 9), com a massa correspondente a 1535,69 Da. A partir destes resultados, o peptídeo foi nomeado de Triatomina.

Molecule: FIBINOPEPTIDE A
 Organism: Homo sapiens
 UniProtKB: Search PDB | P02671



Figura 9 – Localização do Fibrinopeptídeo A

Ao observarmos o registro da molécula do fibrinopeptídeo A no site RCSB protein databank (<http://www.rcsb.org/>), podemos ver a localização da mesma dentro do fibrinogênio, logo após o peptídeo

senal. A sequência destacada em vermelho, que corresponde ao Fibrinopeptídeo A, é exatamente a mesma sequência discriminada nos resultados obtidos no MASCOT® e no Peaks™.

4.4.1.1 Caracterização da Triatomina

4.4.1.1.1 Síntese em fase sólida

Após a confirmação da sequência, o Triatomina foi sintetizado pela técnica de SPPS t-boc, e durante a etapa de purificação do mesmo, foi observado a formação de um análogo com massa de 1618 Da.

Após análises sequenciais, houve a confirmação de que o análogo (chamado Triato-A1) apresenta o grupo protetor Tosil (massa molecular de 154,2) acoplado à Arginina C-terminal (Figura 10A) e perdeu a alanina da décima posição na cadeia ficando com 15 resíduos de aminoácidos em sua composição (Figura 10B).

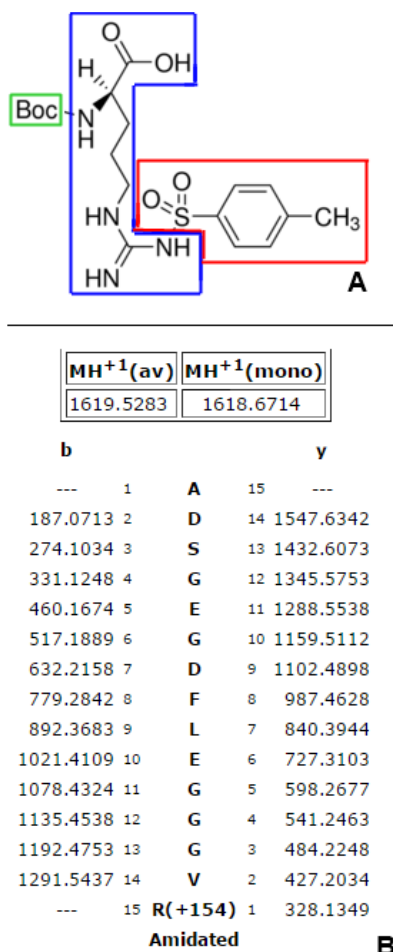


Figura 10– Confirmação da sequência do análogo Triato-A1

Em A temos a representação da estrutura espacial da Arginina ligada ao seu grupo protetor, chamado tosil (Boc-Arg-Tos). Destacado em verde está representado o grupo Boc, que é o grupo protetor que impede a formação inespecífica de ligações peptídicas durante a síntese. Destacado em azul está a estrutura da Arginina. E, por fim, destacado em vermelho está a estrutura do grupo Tosil, protetor da cadeia lateral da arginina. O grupamento Tosil apresenta uma fórmula estrutural representada por p-

CH₃C₆H₄SO₂- e tem como massa 154,19 unidades de massa atômica. Já na figura B está o resultado da análise da sequência do Triato-A1 (através do site <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/mssearch.cgi>), onde é possível verificar que a massa observada do análogo corresponde à adição de massa do grupo tosil à arginina e a perda da alanina.

4.4.1.1.2 Bioensaios

Os ensaios de inibição de microrganismos foram refeitos com os microrganismos padrões, para confirmação das atividades, e com mais 17 microrganismos para ampliar a avaliação do espectro de atividades apresentados pelos sintéticos (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 – Atividades antimicrobianas do Triatomina

Tabela representativa dos valores de CIM e CBM obtidos para o Triatomina nos ensaios de inibição de crescimento em meio líquido.

Microrganismos	CIM µM (mg/mL)	
	MH	PB
Bactérias Gram-positivas		
<i>Micrococcus luteus</i>	NA ^a	140 – 70 (0,20 – 0,10)
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	NA
<i>Micrococcus luteus BR2</i>	NA	NA
<i>Bacillus megaterium</i>	NA	NA
<i>Bacillus subtilis</i>	NA	NA
Bactérias Gram-negativas		
<i>Alcaligenes faecalis</i>	NA	NA
<i>Enterobacter cloacae</i>	NA	NA
<i>Serratia marcescens</i>	NA	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA	30 – 15 (0,05 – 0,02)
<i>Escherichia coli</i>	NA	30 – 15 (0,05 – 0,02)

Microrganismos	CIM µM (mg/mL)		CBM µM (mg/mL)	
	RPMI	PDB	RPMI	PDB
Leveduras				
<i>Candida albicans</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Candida parapsilosis</i>	NA	140 – 70 (0,20 – 0,10)	NA	NA
<i>Cryptococcus neoformans</i>	NA	140 – 70 (0,20 – 0,10)	NA	NA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Candida tropicalis</i>	NA	35 – 17,5 (0,05 – 0,02)	NA	35 – 17,5 (0,05 – 0,02)

Filamentosos				
<i>Cladosporium sp.</i>	140 – 70 (0,20 – 0,10)	140 – 70 (0,20 – 0,10)	NA	140 – 70 (0,20 – 0,10)
<i>Penicilium expansum</i>	140 – 70 (0,20 – 0,10)	140 – 70 (0,20 – 0,10)	NA	140 – 70 (0,20 – 0,10)
<i>Aspergillus niger</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Paecilomyces farinosus</i>	NA	140 – 70 (0,20 – 0,10)	NA	140 – 70 (0,20 – 0,10)
<i>Cladosporium herbarum</i>	NA	NA	NA	NA

*NA - não ativo na concentração 140 µM.

Tabela 6 – Atividades antimicrobianas do Triato-A1

Tabela representativa dos valores de CIM e CBM obtidos para o Triato-A1 nos ensaios de inibição de crescimento em meio líquido.

Microorganismos	CIM µM (mg/mL)	
	MH	PB
Bactérias Gram-positivas		
<i>Micrococcus luteus</i>	NA ^a	120 – 60 (0,18 – 0,09)
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	NA
<i>Micrococcus luteus BR2</i>	NA	NA
<i>Bacillus megaterium</i>	NA	NA
<i>Bacillus subtilis</i>	NA	NA
Bactérias Gram-negativas		
<i>Alcaligenes faecalis</i>	NA	NA
<i>Enterobacter cloacae</i>	NA	NA
<i>Serratia marcescens</i>	NA	120 – 60 (0,18 – 0,09)
<i>Escherichia coli</i>	NA	30 – 15 (0,04 – 0,02)

Microorganismos	CIM µM (mg/mL)		CBM µM (mg/mL)	
	RPMI	PDB	RPMI	PDB
Leveduras				
<i>Candida albicans</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Candida parapsilosis</i>	120 – 60 (0,18 – 0,09)	120 – 60 (0,18 – 0,09)	NA	NA
<i>Cryptococcus neoformans</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Candida tropicalis</i>	NA	60 – 30 (0,09 – 0,04)	NA	60 – 30 (0,09 – 0,04)

Filamentosos				
<i>Cladosporum sp.</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Penicilium expansum</i>	NA	120 – 60 (0,18 – 0,09)	NA	120 – 60 (0,18 – 0,09)
<i>Aspergillus niger</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Paecilomyces farinosus</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Cladosporum herbarum</i>	NA	NA	NA	NA

*NA - não ativo na concentração 120 µM.

A atividade antimicrobiana contra *M. luteus* observada no peptídeo nativo se repetiu no peptídeo sintético (Item 3, Tabela 4). Quando comparado à Triatomina, o Triato-A1 apresentou menor espectro de atividade tanto para o número de microrganismos afetados, quanto para a inibição total do crescimento.

A Triatomina se mostrou ativa contra as bactérias *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e contra os fungos *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida tropicalis* e *Paecilomyces farinosus*, sendo fungicida frente ao *Cladosporum sp.* e *Penicilium expansum*. Seu análogo apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* e *Escherichia coli*, e frente os fungos *Candida tropicalis* e *Penicilium expansum*, sendo fungicida contra *Candida parapsilosis*.

Em continuidade aos ensaios biológicos, foi realizado o ensaio de hemólise, que avalia a capacidade citolítica dos peptídeos frente hemácias humanas. Para o Triatomina foi possível observar uma hemólise de 0,3% quando em uma concentração de 420 µM (Gráfico 1), já o seu análogo apresenta uma hemólise de 0,7% quando em uma concentração de 360 µM e 0,5% de hemólise quando em uma concentração de 120 µM, semelhante ao resultado representado o gráfico 1 (dado não mostrado). Todos os três valores não são significativos quando comparados com o controle positivo de hemólise (Silva P. Jr, 2000).

Pensando em uma possível aplicação *in vivo* desses peptídeos, ambos foram submetidos a um teste de degradação em plasma, para avaliar sua resistência à degradação frente a proteínas plasmáticas (Gráficos 2 e 3). Esses dados são fornecidos em porcentagem de degradação avaliando a porcentagem da área dos picos de cada peptídeo no cromatograma obtido pelo detector UV-vis.

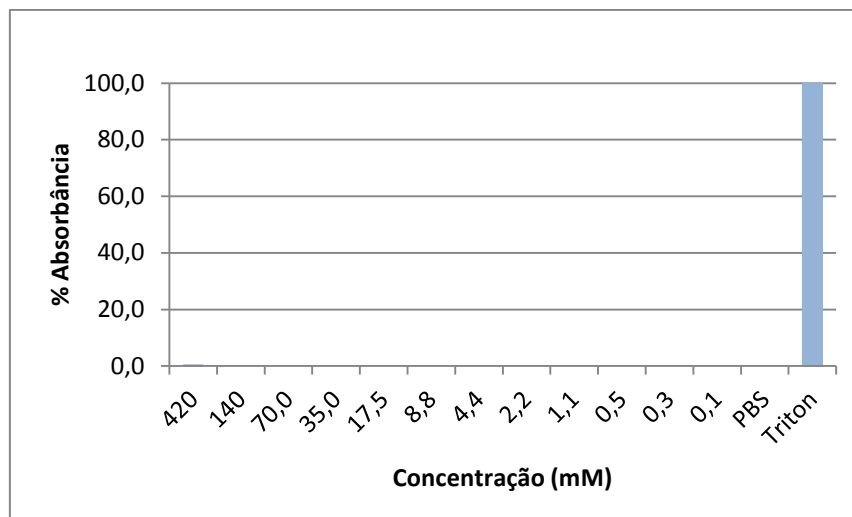


Gráfico 1 – Ensaio hemolítico para Triatomina

Ensaio hemolítico realizado com o Triatomina, onde o mesmo foi incubado, em diluição seriada, com uma solução 3% de hemácias. O peptídeo em questão apresentou 0,3% de hemólise quando testado na concentração de 360 μ M, o que é considerada uma hemólise não significativa.

Para o Triatomina, temos uma degradação iniciada já em 15 minutos de incubação, onde a porcentagem de peptídeos em solução decaiu de 87% para 70%. Essa degradação se torna mais lenta ao passar do tempo, já que quando avaliados os tempos 30 e 60 minutos, o decaimento é de apenas 10% em cada (60% e 50% respectivamente), e apresenta um decaimento maior de 13% aos 120 minutos (37% de peptídeos em solução).

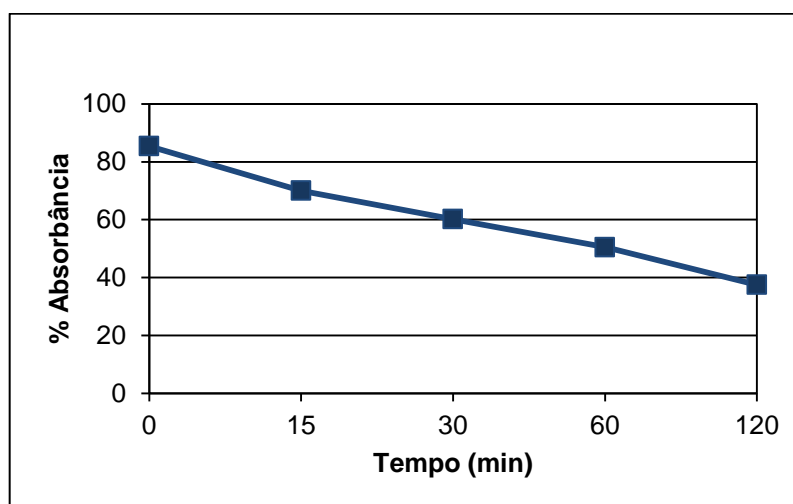


Gráfico 2 – Degradação em plasma do Triatomina

Resistência do Triatomina à degradação quando incubado em plasma, onde se observa 87% de peptídeos no tempo 0 e 37% no tempo 120 minutos. Portanto, avaliando sua resistência à degradação, apenas 57% de todo o peptídeo injetado foi degradado por proteínas plasmáticas em duas horas de incubação.

Ao avaliarmos este perfil de degradação em relação às massas encontradas no espectro de massas em cada tempo de degradação, é possível observar que ocorre uma degradação a partir da porção N-terminal da sequência (Tabela 7), sendo indicativo da ação de uma aminopeptidase (Taylor, 1993).

Tabela 7 – Perfil de degradação do Triatomina quando incubado em plasma

Perfil de degradação observada para o Triatomina ao ser incubado em plasma. No tempo zero não foi encontrada nenhuma massa além da massa correspondente à sequência completa do peptídeo em questão (ADSGEGFLAEGGGVR – 1535 Da). No tempo 15 e 30 minutos é possível observar o aparecimento de uma massa de 1465 Da (perda de 71 Da), correspondente a uma alanina. Já no tempo 60 minutos é possível observar o aparecimento de uma massa de 1020 Da (perda de 512 Da), correspondente a perda dos cinco resíduos de aminoácidos da posição n-terminal da sequência (alanina, ácido aspártico, serina, glicina, ácido glutâmico e glicina respectivamente). E por fim, no tempo 120 minutos é possível observar todas as massas correspondentes a clivagens em cada uma das ligações peptídicas até a sexta ligação, tendo início na porção n-terminal.

Tempo (min)	Massas Encontradas	Degradação Correspondentes
0	-----	Sem degradação
15	1465	-A
30	1465	-A
60	1465, 1020	-A, -ADSGEG
120	1465, 1350, 1263, 1205, 1076, 1020	-A, -AD, -ADS, -ADSG, -ADSGE, -ADSGEG

Para o análogo Triato-A1, temos uma degradação rápida, iniciada já em 15 minutos de incubação, onde a porcentagem de peptídeos em solução decai de 87% para 52%. Essa degradação se torna mais brusca ao passar do tempo, já que o decaimento é de 32% no tempo 30 minutos, chegando a ser totalmente degradado em 60 minutos.

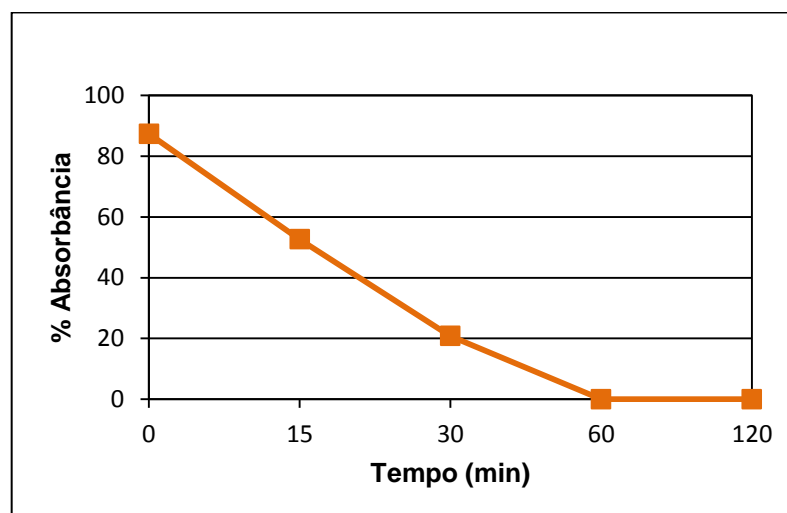


Gráfico 3 – Degradação em plasma do análogo Triato-A1

Resistência do análogo Triato-A1 à degradação quando incubado em plasma, onde se observa 87% de peptídeos no tempo 0 e 0% no tempo 120 minutos. Portanto, avaliando sua resistência à degradação, 100% do peptídeo injetado foi degradado por proteínas plasmáticas em duas horas de incubação.

Ao avaliarmos este perfil de degradação em relação às massas encontradas no espectro de massas em cada tempo de degradação, é possível observar que ocorre uma degradação a partir da porção N-terminal da sequência (Tabela 8), sendo indicativo da ação de uma aminopeptidase (Taylor, 1993).

Tabela 8 – Perfil de degradação do Triato-A1 quando incubado em plasma

Perfil de degradação observada para o Triato-A1 ao ser incubado em plasma. No tempo zero não foi encontrada nenhuma massa além da massa correspondente à sequência completa do peptídeo em questão (ADSGEGDFLEGGVR[+154] – 1618 Da). No tempo 15 e 30 minutos é possível observar o aparecimento de uma massa de 1547 (perda de 71 Da), correspondente a uma alanina. Já no tempo 60 minutos é possível observar o aparecimento de uma massa de 1433 Da (perda de 185 Da), correspondente à perda de dois resíduos de aminoácido da sequência (alanina e ácido aspártico respectivamente). E por fim, no tempo 120 minutos é possível observar todas as massas correspondentes a clivagens em cada uma das ligações peptídicas até a terceira ligação, tendo início na porção n-terminal.

Tempo (min)	Massas Encontradas	Degradação Correspondentes
0	-----	Sem degradação
15	1547	-A
30	1547	-A
60	1547, 1433	-A, -AD
120	1547, 1433, 1345	-A, -AD, -ADS

Apesar de sua degradação também ocorrer a partir de sua porção N-terminal, o análogo Triato-A1 é degradado em metade do tempo necessário para ocorrer a degradação de apenas metade do original. Já foi verificado que as aminopeptidases, de uma forma geral, variam de afinidade de acordo com a presença de metais nas sequências, diferenças de Km, sequência específicas de dois ou três aminoácidos na porção final da molécula (Taylor, 1993). Essa característica dessa classe de enzimas pode justificar a maior facilidade de degradação do análogo, devido ao fato de a sequência original ter perdido um pouco do seu caráter hidrofóbico, devido à perda de uma alanina.

Para melhor compreender parte do mecanismo de interação entre os peptídeos sintetizados com as células alvo, os mesmos foram incubados em uma solução de glicose 0,2 M contendo vesículas carregadas negativamente (mimetizando membranas plasmáticas).

Como é possível observar, tanto o Triatomina quanto o seu Análogo apresentaram ação na membrana, mas não foram capazes de rompê-la (Figuras 11 e 12). Provavelmente ambos agem formando poros, uma vez que o halo escuro próximo à borda da vesícula, formado pela diferença da proporção intra e extravascular de

açúcares (sacarose e glicose respectivamente), diminui, indicando que a membrana passa a ser permeável.

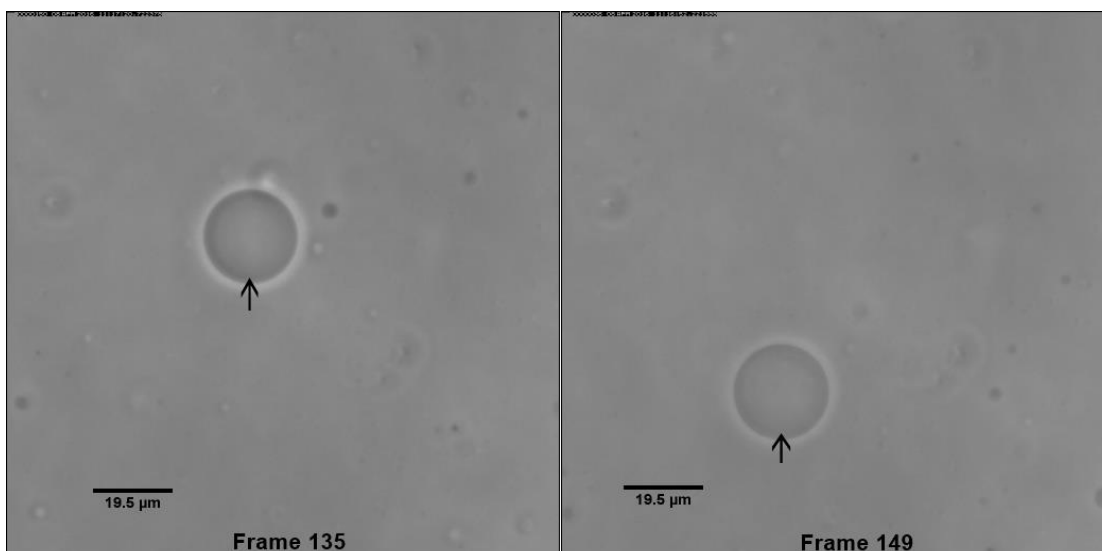


Figura 11 – Interação entre o Triatomina e vesículas lipídicas

Interação entre o Triatomina e uma bicamada lipídica carregada negativamente. Comparando a vesícula (apontada com a seta) em dois momentos distintos da incubação (Frame 135 e 149), é possível observar uma diminuição do halo escuro (formado pela diferença da proporção intra e extravesicular de açúcares) próximo à sua borda. Essa alteração na permeabilidade vesicular, juntamente com o fato de a membrana permanecer intacta, demonstra que o Triatomina tem a capacidade de formar poros, mas não apresenta a capacidade de romper a membrana.

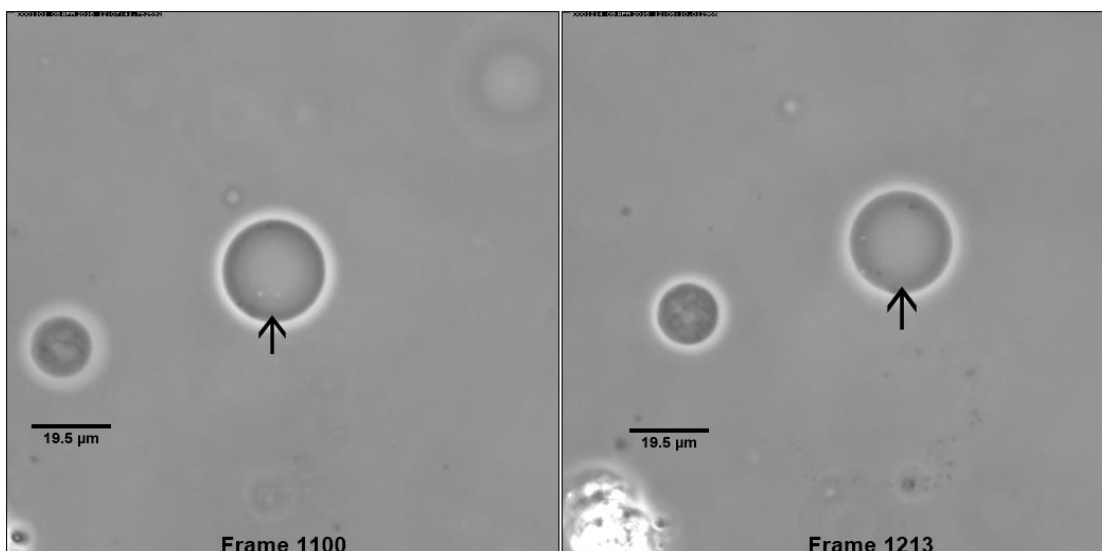


Figura 12 – Interação entre o Triato-A1 e vesículas lipídicas

Interação entre o Triato-A1 e uma bicamada lipídica carregada negativamente. Comparando a vesícula (apontada com a seta) em dois momentos distintos da incubação (Frame 1100 e 1213), é possível observar uma diminuição do halo escuro (formado pela diferença da proporção intra e extravesicular de açúcares) próximo à sua borda. Essa alteração na permeabilidade vesicular, juntamente com o fato de a membrana permanecer intacta, demonstra que o Triato-A1 tem a capacidade de formar de poros, mas não apresenta a capacidade de romper a membrana.

4.4.1.1.3 Caracterização estrutural

Como caracterização estrutural, para poder avaliar o modo de ação dos peptídeos, o teste de Dicroísmo Circular foi realizado. Esse teste avalia a formação da estrutura tridimensional das proteínas/peptídeos a partir da refração da luz polarizada que incide sobre a molécula, a medida quem que um líquido mais higroscópico é introduzido à solução. Cinco possíveis padrões de difração podem ser observados (Figura 13), sendo eles padrão de α -hélice, Dobra β -antiparalela, Hélice 3_{10} estendida, Dobra β tipo 1 e randômico (Kelly et al., 2005).

Pode ser observado nas figuras 14 e 15 que tanto o Triatomina quanto seu análogo apresentaram um padrão de bandas positivas e negativas correspondentes a uma estrutura de alfa-hélice. Corroborando com Scheraga (2004), que ilustra uma interação de fragmentos provenientes do fibrinogênio com a trombina. Nesse padrão de interação, existência de prótons em posições específicas de ambas as sequências, induz a formação de hélices para uma melhor interação peptídeo/proteína (Scheraga, 2004).

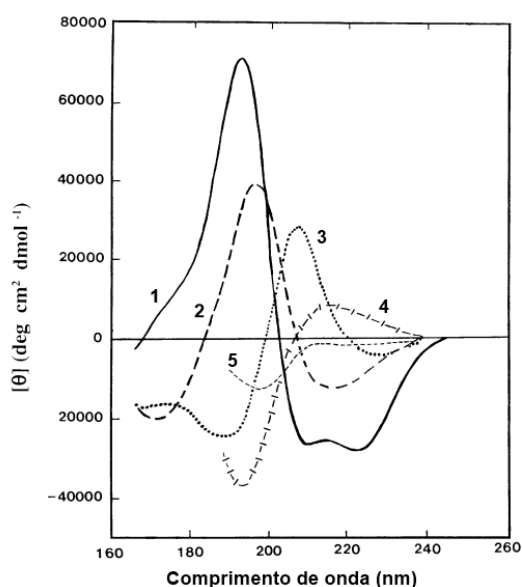


Figura 13 – Padrões de difração no Dicroísmo Circular

Padrões de difração encontrados no Dicroísmo Circular. O padrão enumerado como 1 é correspondente as bandas de uma formação em α -hélice, o de número dois corresponde a uma formação em dobra β -antiparalela, o de número três corresponde a uma Dobra β tipo 1, a de número quatro corresponde a uma estrutura em hélice 3_{10} estendida, e por fim a de número cinco corresponde a uma formação não definida, ou randômica. A medida da difração é feita em elipticidade molar por comprimento de onda para que os valores sejam independentes da concentração da amostra e do caminho ótico da cubeta.

Alfa-hélices são estruturas helicoidais fortemente retorcidas em torno de um eixo imaginário longitudinal que passa pelo seu centro. A unidade repetitiva é uma volta simples da hélice (chamada de passo), que se estende por 5,4 Å ao longo do eixo, onde cada eixo da hélice inclui 3,6 resíduos de aminoácidos (Nelson e Cox, 2014).

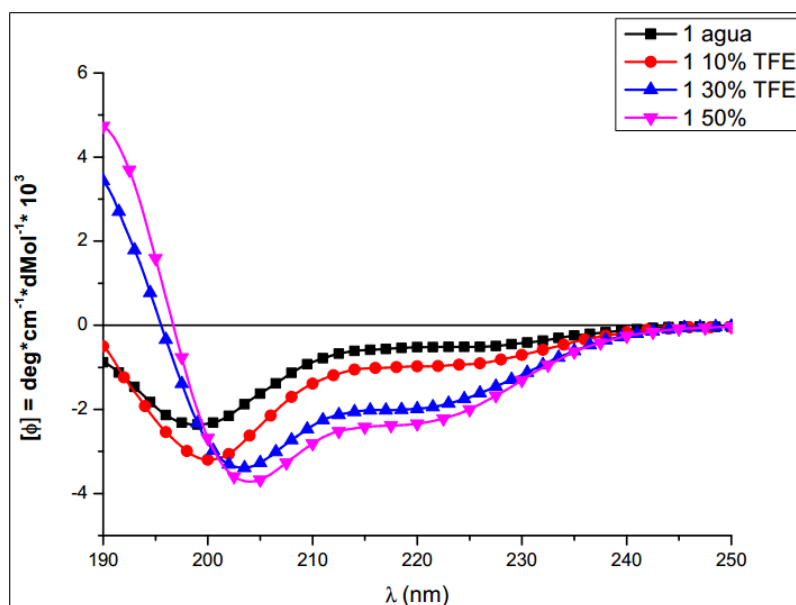


Figura 14 – Padrão de difração apresentado pelo Triatomina

Diferença de absorvância da luz polarizada apresentada pelo Triatomina quando tende ao seu estado nativo. Como observado na legenda, a linha com quadrados corresponde ao comportamento da molécula na presença de água, onde o peptídeo apresenta um padrão de estrutura randômica. Ao ser submetido a um aumento gradativo de trifluoroetanol (10% - linha com círculos; 30% - com triângulos; e 50% - com triângulos invertidos), o peptídeo passa a apresentar uma conformação de α -hélice, com uma banda negativa branda em torno de 220 nm, uma banda negativa proeminente em torno de 200/205 nm e uma banda positiva proeminente em 190 nm.

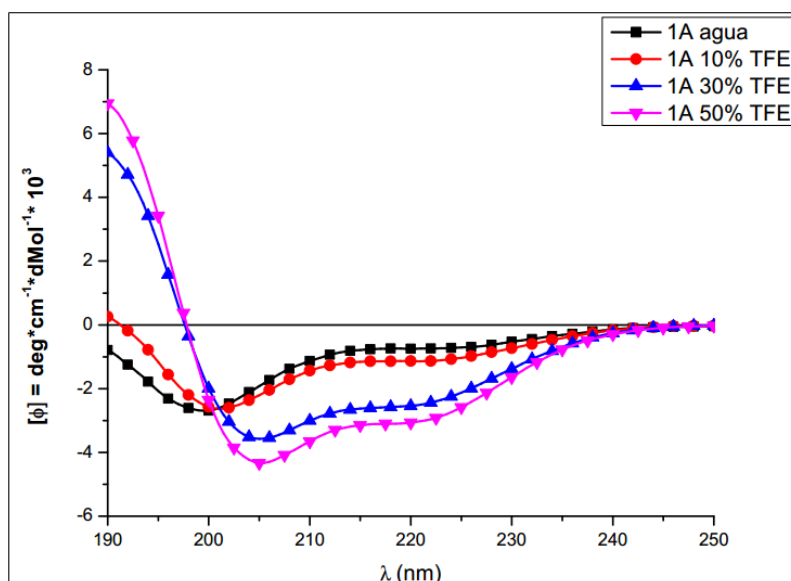


Figura 15 – Padrão de difração apresentado pelo Triato-A1

Diferença de absorvância da luz polarizada apresentada pelo Triato-A1 quando tende ao seu estado nativo. Como observado na legenda, a linha com quadrados corresponde ao comportamento da molécula na presença de água, onde o peptídeo apresenta um padrão de estrutura randômica. Ao ser submetido a um aumento gradativo de trifluoroetanol (10% - linha com círculos; 30% - com triângulos; e 50% - com triângulos invertidos), o peptídeo passa a apresentar uma conformação de α -hélice, com uma banda negativa branda em torno de 220 nm, uma banda negativa proeminente em torno de 200/205 nm e uma banda positiva proeminente em 190 nm.

Considerando que as sequências contêm 16 e 15 aminoácidos em sua composição, e que cada passo da hélice deve conter 3,6 aminoácidos, a estrutura formada pelo Triatomina deve conter 4,5 voltas, e a formada por seu análogo deve conter 4 voltas na hélice.

A clivagem do Fibrinogênio nas cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ ocorre pela ação específica da Trombina no sítio específico Arg-Gly, num estágio final da cascata de coagulação, liberando os fibrinopeptídeos A e B (Riedel et al., 2011; Scheraga, 2004). Em se tratando de atividade antimicrobiana poucos estudos foram realizados com essas moléculas, e não conseguiram comprovar sua ação (Påhlman et al, 2013).

Já foi verificado que alguns invertebrados possuem componentes de uma classe de peptídeos chamada de peptídeos relacionados ao fibrinogênio ou - FREP (fibrinogen-related peptides). Componentes dessa classe já foram identificados em ascídeos, equinodermos, anelídeos, artrópodes, nematódeos, quinidários e moluscos (Tabela 9) (Adams et al, 2000; Adema et al., 1997; Chai et al, 2012; Fan et al., 2008; Gokudan et al., 1999; Misra et al., 2002; Rego et al, 2005; Sterba et al., 2011; Wang et al., 2005), e demonstrou-se também que o papel dessa classe de moléculas em invertebrados está relacionada primeiramente à mecanismos de defesa, tais como aglutinação e ação antimicrobiana (Hanington, Zhang, 2011). E apesar de apresentarem similaridade com porções do fibrinogênio ou moléculas diretamente relacionadas a ele, ainda não foi verificada similaridades entre os componentes dessa família e o fibrinopeptídeo A.

Ao sofrer rompimento ou lesão, a exposição do tecido fibrótico do vaso sanguíneo humano gera a ativação da pró-trombina em trombina, que por sua vez cliva o fibrinogênio, desencadeando o processo de coagulação. Durante sua alimentação, o inseto hematófago deve perfurar o vaso, ativando, portanto a cascata de coagulação momentos antes da injeção de saliva no local, mas devido à presença de inibidores de

trombina na saliva desse inseto, a trombina é inativada alguns instantes após a perfuração da pele (Zavalova et al., 2002).

Tabela 9 – Número de FREPs já identificado dentro do filo Artropoda

Representação do número de moléculas pertencentes às espécies dentro do filo Artropoda. Dentre as espécies com maior número de representantes da classe estão a *Drosophila spp.*, *Culex pipiens quinquefasciatus* e *Anopheles gambiae*.

Filo	Espécie	FREPs
Artropoda	<i>Bombyx mori</i>	3
	<i>Nasonia vitripennis</i>	1
	<i>Apis mellifera</i>	3
	<i>Drosophila spp.</i>	312
	<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>	93
	<i>Anopheles gambiae</i>	59
	<i>Aedes aegypti</i>	35
	<i>Tribolium castaneum</i>	7
	<i>Pediculus humanus corporis</i>	2
	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	3
	<i>Ixodes scapularis</i>	27
	<i>Daphnia pulex</i>	37

(Adaptado de Hanington e Zhang, 2011)

Ainda é difícil especular sobre a origem exata desse Fibrinopeptídeo na hemolinfa do *T. infestans*, se a clivagem do fibrinogênio ocorre num primeiro momento da picada do inseto (antes da deposição da saliva – levando à formação de alguns peptídeos, que são ingeridos antes da inibição da trombina) ou se ocorre dentro do intestino do animal por ação de alguma protease semelhante à trombina. Já foi descrito previamente situações onde o invertebrado induz a fragmentação de uma proteína e usa um de seus subprodutos em benefício próprio (Fogaça et al., 1999, Riciluca et al., 2012). Além de apresentarem essa capacidade de utilização, já foi descrito que várias espécies têm a capacidade de absorver moléculas inteiras ou fragmentos de moléculas provenientes de sua alimentação (Tabela 10).

Tabela 10 – Absorção de moléculas por insetos hematófagos

Representação das moléculas absorvidas por insetos hematófagos a partir de sua alimentação. Dando enfoque ao Hemiptera *Rhodnius prolixus*, triatomíneo filogeneticamente mais próximo da espécie de estudo deste trabalho, que realiza absorção da hemoglobina.

	Espécies	Estágio	Proteína
Diptera	<i>Aedes aegypti</i>	Adulto	IgG anti SFB de ratos adultos
	<i>Anopheles spp.</i>	Adulto	Anti-Rickettsia de ratos IgG Humano Adulto anti-Plasmodium falciparum Humano IgG Humano Anti-Rickettsia typhi de Ratos anti-SFB de Coelho
	<i>Culex pipiens</i>	Adulto	Anti-Rickettsia typhi de Ratos
	<i>Glossina morsitans</i>	Adulto	Albumina Adultos Humano

	<i>Haematobia irritans</i>	Adulto	IgG Bovina e Caprina adultas
	<i>Hypoderma bovis</i>	Larva	Proteínas do Soro
	<i>Hypoderma lineatum</i>	Larva	IgG Bovina
Hemiptera	<i>Rhodnius prolixus</i>	Adulto	Hemoglobina
Siphonaptera	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	IgG Felina
	<i>Xenopsylla cheopis</i>	Adulto	Anti- <i>Rickettsia typhi</i> de Ratos

(Adaptado de Jeffers, Roe, 2008)

Como não há similaridade entre o Fibrinopeptídeo A – FbPA – de humanos com a família de peptídeos derivados de fibrinogênio presentes em insetos, podemos sugerir que o mecanismo para obtenção desse peptídeo pelo *T. infestans* se assemelhe aos meios utilizados pelos invertebrados supracitados devido ao fato de a identificação ter ocorrido na hemolinfa do inseto. Mas maiores estudos ainda devem ser realizados para avaliar como ocorre a passagem desse peptídeo do conteúdo alimentar presente no intestino médio para a hemolinfa do mesmo.

4.4.2 Triastina (Amostra 3 – TIHT40%19-9)

Os dados provenientes do espectrômetro de massas, ao serem analisados através do software MagTran[®]1.02, indicaram que a massa aproximada do peptídeo é 1280 Da (Figura 16).

Ao ser analisada através do software MASCOT, utilizando como comparação o banco de dados Hemiptera, o peptídeo apresentou similaridade com uma proteína putativa da cutícula do próprio *T. infestans* (Figura 17). Ao utilizarmos os mesmos parâmetros de busca através do Programa Peaks, o resultado se repete (Figura 18).

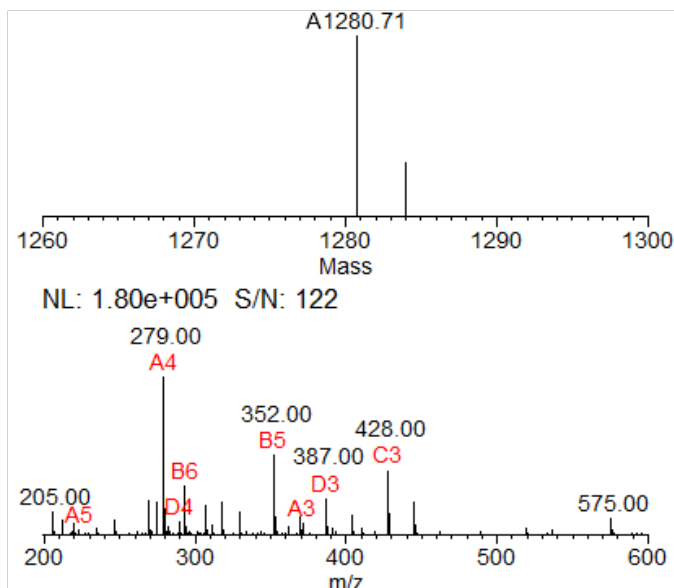


Figura 16 – Determinação da massa através do software MagTran®

Análise realizada através do software MagTran® 1.02, onde a deconvolução dos íons indica uma massa aproximada de 1280,71 Da para o peptídeo analisado.

▼1 gi|604788889|gb|JA... 64 putative glycine-rich cuticle protein [Triatoma infestans]

	Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI
1.1 gi 604788889 gb JAC:	64	8834	10 (3)	10 (3)	1.39 putative glycine-rich cuticle protein [Triatoma infestans]

▼10 peptide matches (10 non-duplicate, 0 duplicate)

Auto-fit to window

Query	Dupes	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	M	Score	Expect	Rank	U	Peptide
633		511.7541	1021.4937	1021.4941	-0.0005	0	33	0.033	▶1	U	G.FGGSRGTGGGLG.G
642		515.2513	1028.4880	1028.4887	-0.0007	0	23		▶2	U	G.TGLGSSHGSGLG.G
762		543.7622	1085.5099	1085.5102	-0.0003	0	18		▶7	U	G.TGLGSSHGSGLGG.S
1330		647.8105	1293.6064	1293.6062	0.0002	0	43	0.0096	▶1	U	G.TGGGFGGSRGTGGGLG.G

Figura 17 – Análise do peptídeo 2 através do software MASCOT®

Representado na figura está o resultado da análise do peptídeo 2 através do software MASCOT, utilizando o banco Hemiptera (118063 seqüências) como banco de dados para comparação. Destacado na imagem, esta é a seqüência com maior homologia ($p < 0,05$) dentre todas encontradas.

Apesar de ambos os softwares conseguirem encontrar mais de uma seqüência, presentes dentro da mesma molécula, a seqüência considerada como o resultado é a destacada na Figura 17 e demonstrada na deconvolução na figura 18 (seqüência: TGGGFGGSRGTGGGLG), pois foi o único resultado com maior score (onde $p < 0,05$), maior número de matches e com uma melhor deconvolução da seqüência dentro do espectro, em comparação com as outras seqüências encontradas.

>tr|A0A023F5J2|A0A023F5J2_TRIIF Putative glycine-rich cuticle protein OS=Triatoma infestans PE=2 SV=1

1 MKLLAWLIFI VGLVMAIAMP DRQGYGSSGS **LGTGTHGHGT GGGFGGSRGT GGGLG**GSHGS HSGGGLGSSR

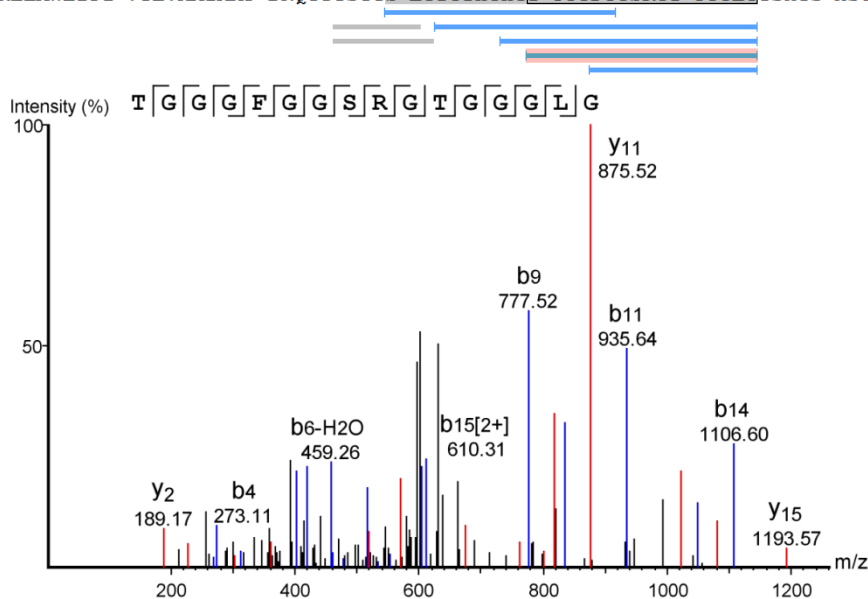


Figura 18 – Resultados obtidos da análise da amostra 2 provenientes do Peaks™

Representado na figura está o resultado da análise da amostra 2 através do software Peaks™, utilizando o banco Hemiptera como banco de dados para comparação, onde podemos observar a posição da sequência dentro da molécula completa e a sua deconvolução dentro do espectro.

4.4.2.1 Caracterização da Triastina

4.4.2.1.1 Bioensaios

Os ensaios de inibição de microrganismos foram refeitos com os microrganismos padrões, para confirmação das atividades, e com mais 17 microrganismos para ampliar a avaliação do espectro de atividades apresentados pelos sintéticos (Tabela 11).

Tabela 11 – Atividades antimicrobianas da Triastina

Tabela representativa dos valores de CIM e CBM obtidos para o Triatomina nos ensaios de inibição de crescimento em meio líquido. NA representa as bactérias e meios de cultura utilizado aos quais o Triatomina não foi capaz de inibir o crescimento microbiano

Microrganismos	CIM µM (mg/mL)	
	MH	PB
Bacterias Gram-positivas		
<i>Micrococcus luteus</i>	NA ^a	NA
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	NA
<i>Micrococcus luteus BR2</i>	NA	NA
<i>Bacillus megaterium</i>	NA	NA
<i>Bacillus subtilis</i>	NA	NA
Bacterias Gram-negativas		
<i>Alcaligenes faecalis</i>	NA	NA
<i>Enterobacter cloacae</i>	NA	NA

<i>Serratia marcescens</i>	NA	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA	17,5 – 8,8 (0,02 – 0,01)
<i>Escherichia coli</i>	NA	17,5 – 8,8 (0,02 – 0,01)

Microorganismos	CIM μM (mg/mL)		CBM μM (mg/mL)	
	RPMI	PDB	RPMI	PDB
	Leveduras			
<i>Candida albicans</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Candida parapsilosis</i>	NA	140 – 70 (0,18 – 0,09)	NA	140 – 70 (0,18 – 0,09)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	140 – 70 (0,18 – 0,09)	140 – 70 (0,18 – 0,09)	140 – 70 (0,18 – 0,09)	140 – 70 (0,18 – 0,09)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Candida tropicalis</i>	NA	NA	NA	NA
Filamentosos				
<i>Cladosporium sp.</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Penicilium expansum</i>	140 – 70 (0,18 – 0,09)	140 – 70 (0,18 – 0,09)	NA	140 – 70 (0,18 – 0,09)
<i>Aspergillus niger</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Paecilomyces farinosus</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Cladosporium herbarum</i>	NA	NA	NA	NA

*NA - não ativo na concentração 140 μM.

Sua atividade antimicrobiana contra *C. parapsilosis* observada no peptídeo nativo se repetiu no peptídeo sintético (Item 3, Tabela 4). Se apresentou ativo contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, foi fungistático frente a *Candida parapsilosis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e contra os fungos *Cryptococcus neoformans* e *Penicilium expansum* teve ação fungicida.

A sequência encontrada corresponde a uma sequência rica em glicina, contendo 50% de resíduos de glicina em sua composição. Assim como já descrito na literatura, a classe de peptídeos ricos em glicina apresentam atividade principal contra fungos e/ou bactérias Gram-negativas (Lee et al. 2007), corroborando com o resultado do teste antimicrobiano, onde a amostra em questão apresentou-se ativa contra *C. parapsilosis*.

Em continuidade aos testes biológicos, foi realizado o ensaio de hemólise, que avalia a capacidade citolítica dos peptídeos frente hemácias humanas. Para a Triastina foi possível observar uma hemólise de 0,4% quando em uma concentração de 420 μM

(dado não mostrado - semelhante ao resultado representado o gráfico 1), sendo este valor considerado não são significativo quando comparado com o controle positivo de hemólise (Silva P. Jr, 2000).

Visando uma possível aplicação *in vivo* do peptídeo, ele foi submetido a um teste de degradação em plasma, para avaliar sua resistência à degradação frente a proteínas plasmáticas (Gráfico 6). Esses dados são fornecidos em porcentagem de degradação avaliando a porcentagem da área dos picos de cada peptídeo no cromatograma obtido pelo detector UV-vis.

Para a Triastina, temos uma degradação iniciada já em 15 minutos de incubação, onde a porcentagem de peptídeos em solução decai de 77% para 64%. Essa degradação se torna mais lenta ao passar do tempo, já que quando avaliado no tempo 30 minutos a porcentagem de peptídeos é de 61% e em 60 minutos é de 54%, onde apresenta um decaimento mais lento, sendo que decai apenas 2% aos 120 minutos, chegando a 52% de peptídeos em solução.

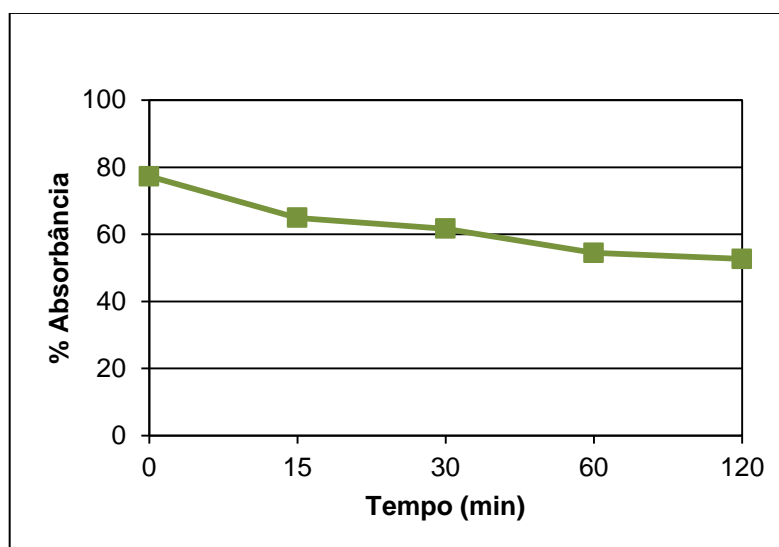


Gráfico 4 - Degradação em plasma da Triastina

Resistência da Triastina à degradação quando incubado em plasma, onde se observa 77% de peptídeos no tempo 0 e 52% no tempo 120 minutos. Portanto, avaliando sua resistência à degradação, apenas 32% de todo o peptídeo injetado foi degradado por proteínas plasmáticas em duas horas de incubação.

Ao avaliarmos seu perfil de degradação em relação às massas encontradas no espectro de massas em cada tempo de degradação, é possível observar que sua degradação ocorre tanto a partir da porção N-terminal da sequência quanto da porção C-terminal (Tabela 12), sendo indicativo de uma ação entre aminopeptidases (Taylor, 1993) e carboxipeptidases (Barber, Fisher, 1972).

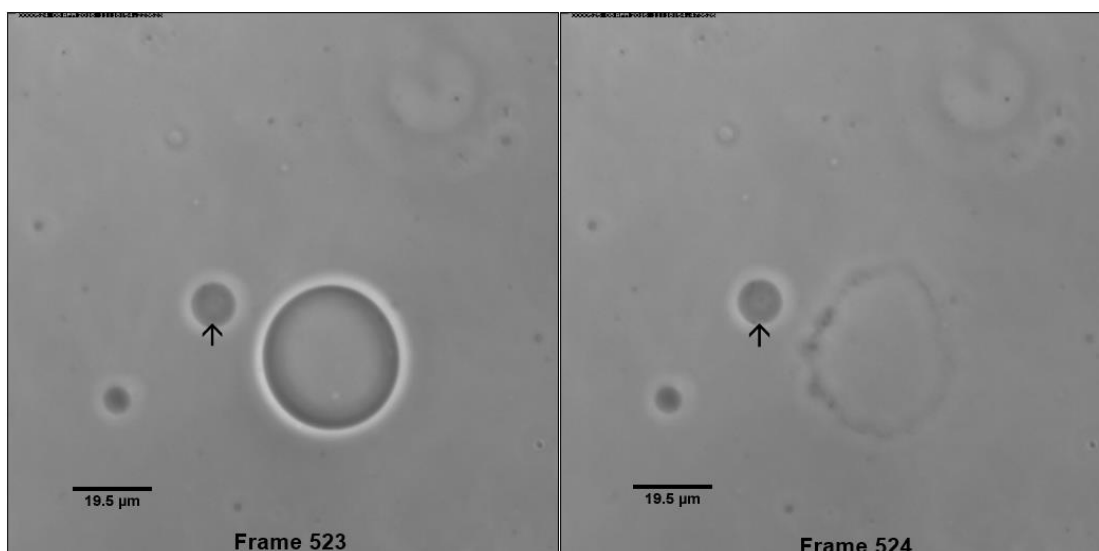
Tabela 12 – Perfil de degradação da Triastina

Perfil de degradação observada para a Triastina ao ser incubado em plasma. No tempo zero não foi encontrada nenhuma massa além da massa correspondente à sequência completa do peptídeo em questão (TGGGFGGSRGTGGGLG – 1294 Da). No tempo 15, 30 e 60 minutos é possível observar o aparecimento de uma massa de 1237 Da (perda de 57Da), correspondente a uma glicina (posição C-terminal). E por fim, no tempo 120 minutos é possível observar o aparecimento das massas 1237, 1136 e 1078, que correspondem a perda de uma glicina, tirosina e uma tirosina junto de uma glicina nas posições C-terminal, N-terminal e N-terminal respectivamente.

Tempo (min)	Massas Encontradas	Degradação Correspondentes
0	-----	Sem degradação
15	1237	-G
30	1237	-G
60	1237	-G
120	1237, 1136, 1078	-G, -T, -TG

Em busca de respostas sobre o mecanismo de interação entre os peptídeos sintetizados com as células alvo, os mesmos foram incubados em uma solução de glicose 0,2 M contendo vesículas carregadas negativamente (mimetizando membranas plasmáticas).

A Triastina apresenta uma importante ação quando incubado com vesículas negativamente carregado. Como é possível observar na vesícula principal, o peptídeo apresenta a capacidade de lisar membranas (Figuras 19 – Frame 523 e 524). Em menores proporções, na vesícula secundária (marcada com uma seta) é visível a ausência do halo escuro próximo à borda da vesícula (indicativo da diferença de açúcares intra e extravesiculares), indicando que a membrana passou a ser permeável.

**Figura 19 - Interação entre a Triastina e vesículas lipídicas**

Interação entre a Triastina e uma bicamada lipídica carregada negativamente. Seu comportamento pode ser observado a vesícula principal. Nela é possível observar sua capacidade de lise da vesícula por ruptura de membrana. Em segundo plano, é possível observar uma vesícula secundária (seta), onde há ausência do halo escuro interno (formado pela diferença da proporção intra e extravesicular de açúcares) próximo à sua borda, proveniente de uma alteração na permeabilidade vesicular.

4.4.2.1.2 Caracterização estrutural

Como caracterização estrutural, para poder avaliar o modo de ação dos peptídeos, o teste de Dicroísmo Circular foi realizado. O Peptídeo Triastina apresenta um padrão de bandas positivas e negativas correspondentes a uma estrutura de Hélice-3₁₀, como pode ser observado na Figura 20.

A estrutura chamada de Hélice-3₁₀ ou Hélice-3₁₀ estendida é 4º tipo de estrutura secundária mais comum, perdendo apenas para α -hélices, dobras β e (Barlow e Thornton, 1988; Rohl et al., 1992), que apresenta passos com voltas de 120º (correspondendo a 3 aminoácidos por volta), com uma translação de 2,0 Å (0,2 nm) a longo de seu eixo, e possui 10 átomos de cada volta formando pontes de hidrogênio (Cooley et al, 2010; Weaver, 2000).

Considerando que uma estrutura de Hélice 3₁₀ contém 3 aminoácidos por volta, a Triastina apresenta uma hélice com aproximadamente 5 voltas, e apesar de conter 10 glicinas (aminoácido neutro) em sua composição, apresenta T, S, R e L, que são carregados, e que provavelmente ficam dispostos em lados opostos da hélice.

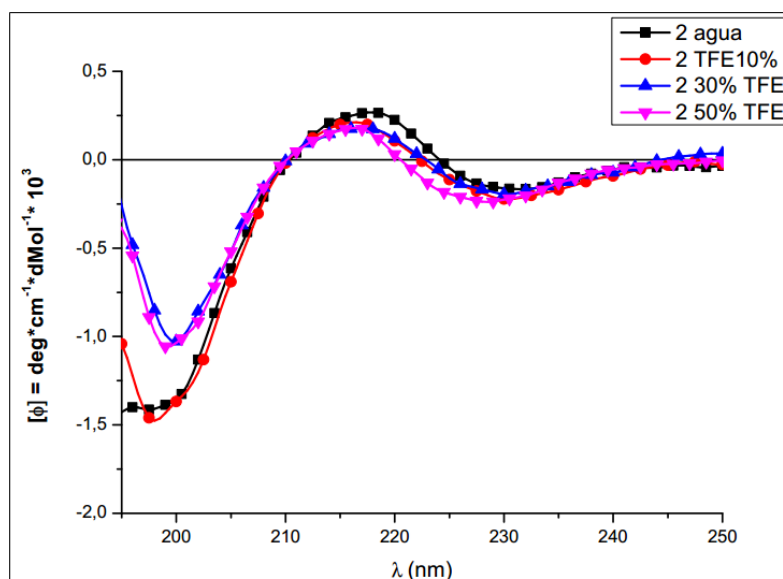


Figura 20 – Difração apresentada pela Triastina

Diferença da absorvância da luz polarizada apresentada pela Triastina quando tende ao seu estado nativo. Como observado na legenda, a linha com quadrados corresponde ao comportamento da molécula na presença de água, onde o peptídeo apresenta um padrão de estrutura randômica. Ao ser submetido a um aumento gradativo de trifluoroetanol (10% - linha com círculos; 30% - com triângulos; e 50% - com triângulos invertidos), o peptídeo passa a apresentar uma conformação de hélice₃₁₀, com uma banda negativa branda em torno de 230 nm, uma banda positiva em 215 nm e outra banda negativa proeminente em torno de 200 nm.

4.4.3 Tin-TK-I e II (amostra 7 e 2 – TIHT40%38-9 e TIHT5%24-11)

Os dados provenientes do espectrômetro de massas, ao serem analisados através do software MagTran[®]1.02, indicaram a que a massa aproximada do peptídeo 5 é de 951Da, e do peptídeo 7 é 1034 (Figura 21).

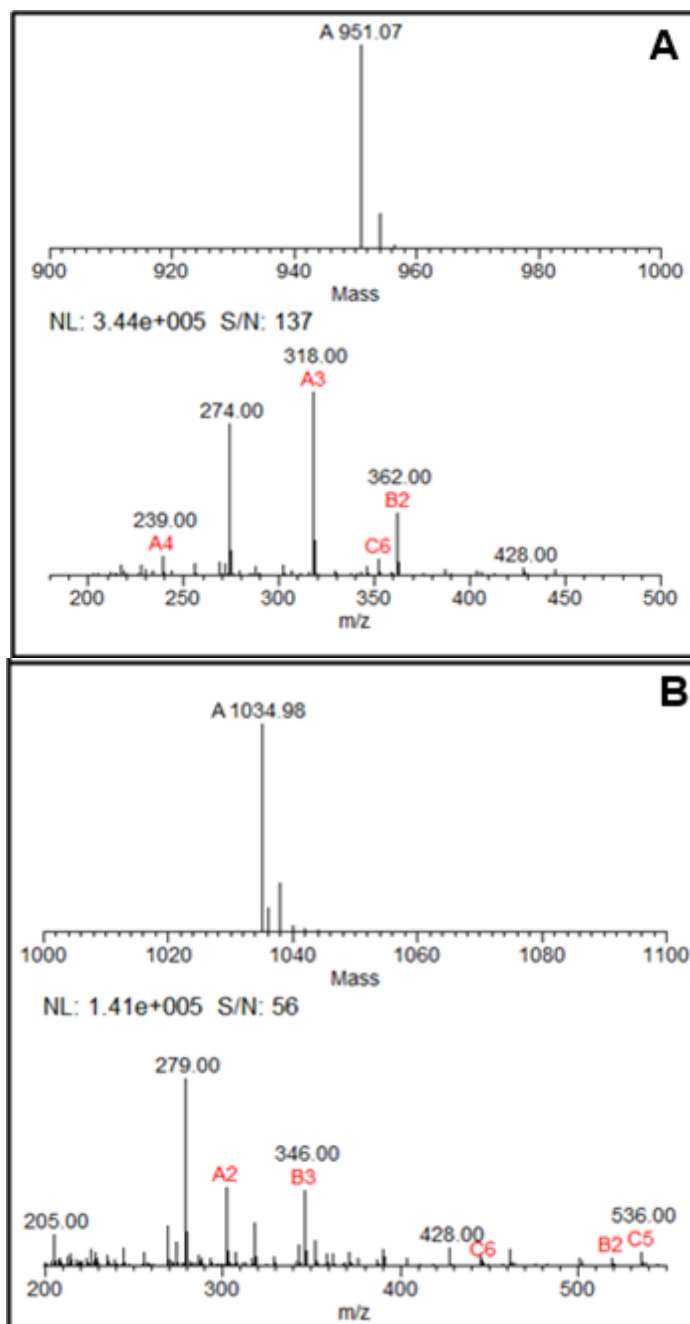


Figura 21 – Determinação da massa através do software MagTran[®]

Análise realizada através do software MagTran[®]1.02. Em A, deconvolução dos íons para o peptídeo 5 indica uma massa aproximada de 951,07 Da, e em B a deconvolução dos íons do peptídeo 7 indica uma massa aproximada de 1034,98 Da.

Em uma abordagem inicial, os documentos foram analisados através do software Mascot[®]. Ao utilizarmos a ferramenta MS/MS ion source, a busca se mostrou

inconclusiva, mas ao utilizarmos a ferramenta Fingerprint, utilizando o banco de dados de Hemiptera para comparação, os peptídeos 5 e 7 apresentaram similaridade com peptídeos relacionados à Taquicinas do tipo 1 e 2 respectivamente, provenientes de diferentes espécies de insetos (Figura 22), e devido a isso, foram nomeados Tin-TK-I e II.

```

MS data file      : 05_exact_pico_20.83.txt
Database          : Hemiptera_valid val (118063 sequences; 39182613 residues)
Timestamp         : 8 Jan 2015 at 16:40:35 GMT
Top Score         : 40 for gi|641662747|ref|XP_008182378.1|, PREDICTED: uncharacterized protein LOC103309234 [Acyrtosiphon pisum]
gi|641662747|ref|XP_008182378.1|    Mass: 2743    Score: 40    Expect: 12    Matches: 15
PREDICTED: uncharacterized protein LOC103309234 [Acyrtosiphon pisum]
gi|300681128|sp|P86563.1|TRP1_BANDI    Mass: 920    Score: 16    Expect: 2.8e+003    Matches: 8
RecName: Full=Tachykinin-related peptide 1; Short=TKRP-1
gi|300681133|sp|P86594.1|TRP1_PYRAP    Mass: 920    Score: 16    Expect: 2.8e+003    Matches: 8
RecName: Full=Tachykinin-related peptide 1; Short=TKRP-1
gi|300681132|sp|P86587.1|TRP1_PENRU    Mass: 920    Score: 16    Expect: 2.8e+003    Matches: 8
RecName: Full=Tachykinin-related peptide 1; Short=TKRP-1
gi|300681131|sp|P86582.1|TRP1_ONCFA    Mass: 920    Score: 16    Expect: 2.8e+003    Matches: 8
RecName: Full=Tachykinin-related peptide 1; Short=TKRP-1
gi|300681130|sp|P86575.1|TRP1_NEZVI    Mass: 920    Score: 16    Expect: 2.8e+003    Matches: 8
RecName: Full=Tachykinin-related peptide 1; Short=TKRP-1
gi|300681129|sp|P86569.1|TRP1_EUSSE    Mass: 920    Score: 16    Expect: 2.8e+003    Matches: 8
RecName: Full=Tachykinin-related peptide 1; Short=TKRP-1
gi|300681127|sp|P86557.1|TRP1_ACRHI    Mass: 920    Score: 16    Expect: 2.8e+003    Matches: 8
RecName: Full=Tachykinin-related peptide 1; Short=TKRP-1

MS data file      : 07.txt
Database          : Hemiptera_valid val (118063 sequences; 39182613 residues)
Timestamp         : 8 Jan 2015 at 16:41:10 GMT
Top Score         : 30 for gi|300681135|sp|P86564.1|TRP2_BANDI, RecName: Full=Tachykinin-related peptide 2; Short=TKRP-2
gi|300681135|sp|P86564.1|TRP2_BANDI    Mass: 1024   Score: 30    Expect: 1.3e+002    Matches: 8
RecName: Full=Tachykinin-related peptide 2; Short=TKRP-2
gi|300681139|sp|P86588.1|TRP2_PENRU    Mass: 1024   Score: 30    Expect: 1.3e+002    Matches: 8
RecName: Full=Tachykinin-related peptide 2; Short=TKRP-2
gi|300681137|sp|P86576.1|TRP2_NEZVI    Mass: 1024   Score: 30    Expect: 1.3e+002    Matches: 8
RecName: Full=Tachykinin-related peptide 2; Short=TKRP-2
gi|300681136|sp|P86570.1|TRP2_EUSSE    Mass: 1024   Score: 30    Expect: 1.3e+002    Matches: 8
RecName: Full=Tachykinin-related peptide 2; Short=TKRP-2
gi|300681134|sp|P86558.1|TRP2_ACRHI    Mass: 1024   Score: 30    Expect: 1.3e+002    Matches: 8
RecName: Full=Tachykinin-related peptide 2; Short=TKRP-2

```

Figura 22 – Resultados da análise provenientes do software MASCOT®.

Representado na figura A está o resultado da análise da amostra 5 e em B o resultado da amostra 7, ambos obtidos através do software MASCOT® – ferramenta Fingerprint, utilizando o banco Hemiptera (com 118063 sequências) como banco de dados para comparação. As nomenclaturas BANDI, PYRAP, PENRU, ONCFA, NEZVI, EUSSE, ACRHI correspondem às espécies *Banasa dimiata*, *Pyrrhocoris apterus*, *Pentatoma rufipes*, *Oncopeltus fasciatus*, *Nezara viridula*, *Euchistus servus* e *Acrosternum hilare* respectivamente.

4.4.3.1 Caracterização dos Peptídeos relacionados à Taquicinas

4.4.3.1.1 Síntese em fase sólida

Após a confirmação das sequências, ambos foram sintetizados pela técnica de SPSS t-boc, devido às dificuldades de síntese, as metioninas presentes nas

sequências foram substituídas por Norleucinas. Portanto as sequências sintetizadas foram: GPSGFLGNR e APAAGRRGNR.

4.4.3.1.2 Bioensaios

Os ensaios de inibição de microrganismos foram refeitos com os microrganismos padrões, para confirmação das atividades, e com mais 17 microrganismos para ampliar a avaliação do espectro de atividades apresentados pelos sintéticos (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13 – Atividades antimicrobianas do Tin-TK-I

Tabela representativa dos valores de CIM e CBM obtidos para o Tin-TK-I nos ensaios de inibição de crescimento em meio líquido.

Microrganismos	CIM µM (mg/mL)	
	MH	PB
Bactérias Gram-positivas		
<i>Micrococcus luteus</i>	200 – 100 (0,20 – 0,10)	50 - 25 (0,05 – 0,02)
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	NA
<i>Micrococcus luteus BR2</i>	NA	NA
<i>Bacillus megaterium</i>	NA	NA
<i>Bacillus subtilis</i>	NA	NA
Bactérias Gram-negativas		
<i>Alcaligenes faecalis</i>	NA	NA
<i>Enterobacter cloacae</i>	NA	NA
<i>Serratia marcescens</i>	NA	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 – 50 (0,10 – 0,05)	100 – 50 (0,10 – 0,05)
<i>Escherichia coli</i>	NA	100 – 50 (0,10 – 0,05)

Microorganismos	CIM µM (mg/mL)		CBM µM (mg/mL)	
	RPMI	PDB	RPMI	PDB
Leveduras				
<i>Candida albicans</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Candida parapsilosis</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Cryptococcus neoformans</i>	NA	200 – 100 (0,20 – 0,10)	NA	200 – 100 (0,20 – 0,10)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Candida tropicalis</i>	NA	NA	NA	NA
Filamentosos				
<i>Cladosporum sp.</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Penicilium expansum</i>	200 – 100 (0,20 – 0,10)	200 – 100 (0,20 – 0,10)	200 – 100 (0,20 – 0,10)	200 – 100 (0,20 – 0,10)
<i>Aspergillus niger</i>	NA	200 – 100 (0,20 – 0,10)	NA	200 – 100 (0,20 – 0,10)
<i>Paecilomyces farinosus</i>	NA	NA	NA	NA

<i>Cladosporium herbarum</i>	NA	NA	NA	NA
------------------------------	----	----	----	----

*NA - não ativo na concentração 200 µM.

Tabela 14 – Atividades antimicrobianas do Tin-TK-II

Tabela representativa dos valores de CIM e CBM obtidos para o Tin-TK-II nos ensaios de inibição de crescimento em meio líquido.

Microrganismos	CIM µM (mg/mL)		CBM µM (mg/mL)	
	MH	PB	RPMI	PDB
Bactérias Gram-positivas				
<i>Micrococcus luteus</i>	NA ^a	180 – 90 (0,18 – 0,09)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	NA		
<i>Micrococcus luteus BR2</i>	NA	NA		
<i>Bacillus megaterium</i>	NA	NA		
<i>Bacillus subtilis</i>	NA	NA		
Bactérias Gram-negativas				
<i>Alcaligenes faecalis</i>	NA	NA		
<i>Enterobacter cloacae</i>	NA	NA		
<i>Serratia marcescens</i>	NA	NA		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	180 – 90 (0,18 – 0,09)	90 – 45 (0,09 – 0,04)		
<i>Escherichia coli</i>	NA	90 – 45 (0,09 – 0,04)		
Leveduras				
<i>Candida albicans</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Candida parapsilosis</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Cryptococcus neoformans</i>	NA	180 – 90 (0,18 – 0,09)	NA	180 – 90 (0,18 – 0,09)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Candida tropicalis</i>	NA	NA	NA	NA
Filamentosos				
<i>Cladosporium sp.</i>	NA	180 – 90 (0,18 – 0,09)	NA	180 – 90 (0,18 – 0,09)
<i>Penicilium expansum</i>	180 – 90 (0,18 – 0,09)	180 – 90 (0,18 – 0,09)	180 – 90 (0,18 – 0,09)	180 – 90 (0,18 – 0,09)
<i>Aspergillus niger</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Paecilomyces farinosus</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Cladosporium herbarum</i>	NA	NA	NA	NA

*NA - não ativo na concentração 180 µM.

A atividade de ambos se manteve igual à observada no peptídeo nativo, onde Tin-TK-I se manteve ativo contra *M. luteus* e Tin-TK-II se manteve ativo contra *E. coli* (Item 3, Tabela 4).

O Tin-TK-I se foi ativo contra as bactérias *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, foi fungicida contra *Penicillium expansum* e fungioestático contra *Cryptococcus neoformans*, e *Aspergillus Niger*.

O peptídeo Tin-TK-II, por sua vez, apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, e foi fungioestático frente os fungos *Cryptococcus neoformans* e *Cladosporum sp*, e fungicida frente ao *Penicillium expansum*.

Em continuidade aos testes biológicos, foi realizado o ensaio de hemólise, que avalia a capacidade citolítica dos peptídeos frente hemácias humanas. Para o Tin-TK-I foi possível observar uma hemólise decrescente de 0,9%, 0,6%, 0,5%, 0,3% e 0,2% nas concentrações de 600 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM e 25 µM respectivamente, já o peptídeo Tin-TK-II 0,5% e 0,1% nas concentrações 360 e 120 µM respectivamente (dados não mostrados, semelhantes ao resultado representado o gráfico 1). Todos os valores não são significativos quando comparados com o controle positivo de hemólise (Silva P. Jr, 2000).

Tendo em vista uma possível aplicação *in vivo* desses peptídeos, ambos foram submetidos a um teste de degradação em plasma, para avaliar sua resistência à degradação frente a proteínas plasmáticas. Esses dados são fornecidos em porcentagem de degradação avaliando a porcentagem da área dos picos de cada peptídeo no cromatograma obtido pelo detector UV-vis.

Para o peptídeo Tin-TK-I, temos uma degradação iniciada já em 15 minutos de incubação, onde a porcentagem de peptídeos em solução decaiu de 85% para 69%. Essa degradação vai aumentando gradativamente, sendo possível observar um decaimento de 9%, 20% e 29% de degradação nos tempos 30, 60 e 120 minutos, chegando ao final com 16% de peptídeos intactos em solução (Gráfico 9).

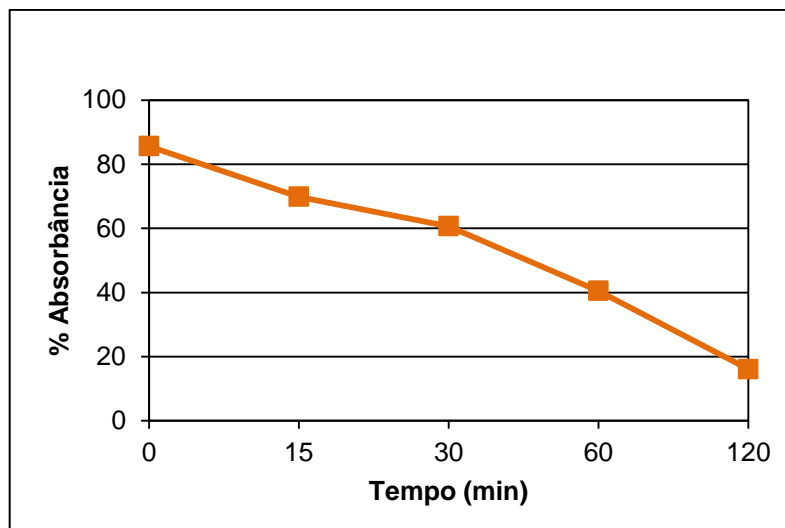


Gráfico 5 – Degradação em plasma do Tin-TK-I

Resistência do Tin-TK-I à degradação quando incubado em plasma, onde se observa 85% de peptídeos no tempo 0 e 16% no tempo 120 minutos. Portanto, avaliando sua resistência à degradação, 81% de todo o peptídeo injetado foi degradado por proteínas plasmáticas em duas horas de incubação.

Para o peptídeo Tin-TK-II, temos uma degradação que também se inicia já em 15 minutos de incubação, onde a porcentagem de peptídeos em solução decai drasticamente de 85% para 34%. Essa degradação continua acontecendo rapidamente, sendo possível observar 14% de peptídeos no tempo 30 minutos, 2% no tempo 60 minutos, chegando ao final com apenas 1% de peptídeos em solução (Gráfico 10).

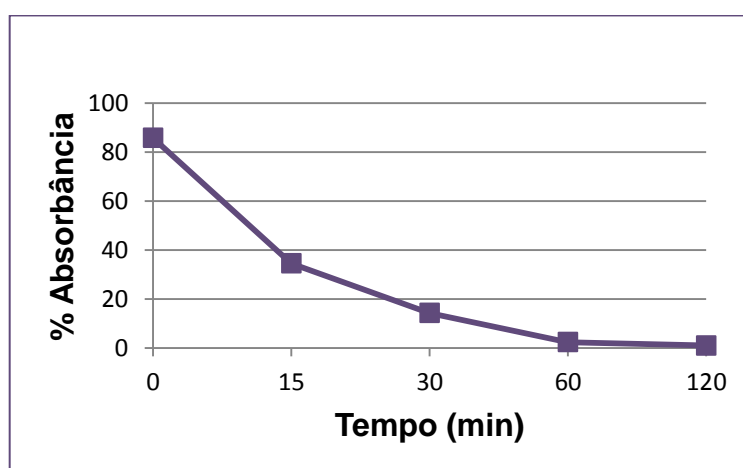


Gráfico 6 – Degradação em plasma do Tin-TK-II

Resistência do Tin-TK-II à degradação quando incubado em plasma, onde se observa 85% de peptídeos no tempo 0 e 16% no tempo 120 minutos. Portanto, avaliando sua resistência à degradação, 81% de todo o peptídeo injetado foi degradado por proteínas plasmáticas em duas horas de incubação.

Ao avaliarmos este perfil de degradação do Tin-TK-I em relação às massas encontradas no espectro de massas em cada tempo de degradação, é possível

observar que ocorre uma degradação a partir da porção N-terminal da sequência (Tabela 15), sendo indicativo da ação de uma aminopeptidase (Taylor, 1993).

O perfil do peptídeo Tin-TK-II demonstra uma degradação a partir da porção C-terminal da sequência (Tabela 16), sendo indicativo da ação de uma carboxipeptidase (Barber, Fisher, 1972).

Tabela 15 – Perfil de degradação do Tin-TK-I

Perfil de degradação observado para o Tin-TK-I ao ser incubado em plasma. No tempo zero não foi encontrada nenhuma massa além da massa correspondente a sequência completa do peptídeo em questão (GPSGFLGNR – 903 Da). No tempo 15 é possível observar o aparecimento de massas de 846 e 749 Da (perda de 57 e 154 Da), correspondentes a uma glicina e uma glicina acoplada a prolina. Nos tempos 30 e 60 minutos é possível observar o aparecimento de massas de 661 e 604 Da (perda de 242 e 299 Da), correspondentes a complexos glicina/prolina/serina e glicina/prolina/serina/glicina. E por fim, no tempo 120 minutos é possível observar todas as massas correspondentes a clivagens em cada uma das ligações peptídicas até a quinta ligação, tendo início na porção n-terminal.

Tempo (min)	Massas Encontradas	Degradação Correspondentes
0	-----	Sem degradação
15	846, 749	-G, -GP
30	846, 749, 661, 604	-G, -GP, -GPS, -GPSG
60	846, 749, 661, 604	-G, -GP, -GPS, -GPSG
120	846, 749, 661, 604, 457	-G, -GP, -GPS, -GPSG, -GPSGF

Tabela 16 – Perfil de degradação do Tin-TK-II

Perfil de degradação observado para o Tin-TK-II ao ser incubado em plasma. No tempo zero não foi encontrada nenhuma massa além da massa correspondente a sequência completa do peptídeo em questão (APAAGFFGNR – 1006 Da). No tempo 15 é possível observar o aparecimento de massas de 850 e 736 Da (perda de 156 e 270 Da), correspondentes a uma arginina e uma arginina acoplada a norleucina. Nos tempos 30, 60 e 120 minutos é possível observar o aparecimento de mais uma massa de 681 Da (perda de 325 Da), correspondente a um complexo arginina/norleucina/glicina, sendo que as massas observadas correspondem a clivagens das ligações peptídicas até a terceira ligação, tendo início na porção c-terminal.

Tempo (min)	Massas Encontradas	Degradação Correspondentes
0	-----	Sem degradação
15	850, 736	-R, -RN
30	850, 736, 681	-R, -RN, -RNG
60	850, 736, 681	-R, -RN, -RNG
120	850, 736, 681	-R, -RN, -RNG

Para melhor ilustrar o mecanismo de interação entre os peptídeos sintetizados com as células alvo, os mesmos foram incubados em uma solução de glicose 0,2 M contendo vesículas carregadas negativamente (mimetizando membranas plasmáticas).

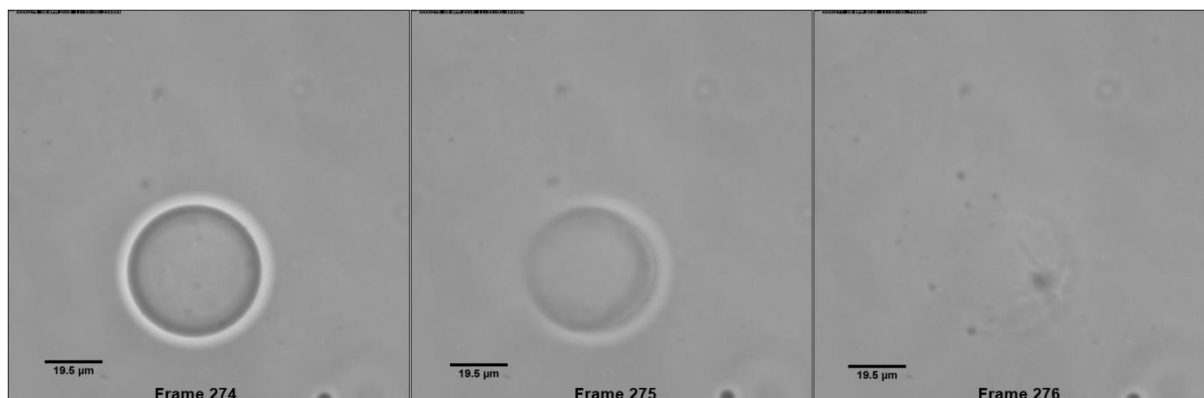


Figura 23 - Interação entre o Tin-TK-I e vesículas lipídicas

Interação entre o Tin-TK-I e uma bicamada lipídica carregada negativamente. Frames consecutivos mostram a ação do peptídeo sobre a vesícula em três momentos distintos da incubação (Frame 274 a 276).

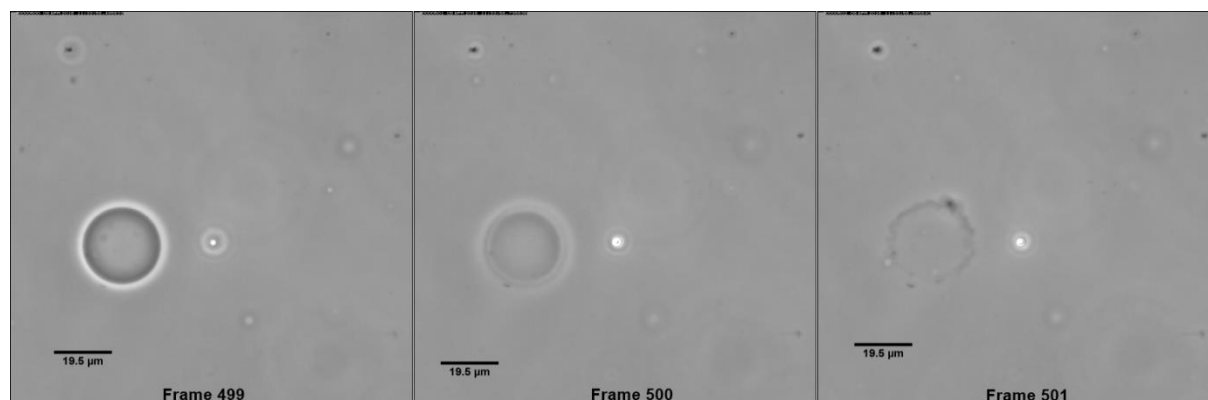


Figura 24 - Interação entre o Tin-TK-II e vesículas lipídicas

Interação entre o Tin-TK-I e uma bicamada lipídica carregada negativamente. Frames consecutivos mostram a ação do peptídeo sobre a vesícula em três momentos distintos da incubação (Frame 499 a 501).

Como é possível observar, tanto o Tin-TK-I quanto o II apresentaram forte ação na membrana. Ambos apresentaram ação rápida e efetiva, sendo capazes de rompê-las com facilidade (Figuras 23 e 24). Em uma ação rápida a vesícula observada é rompida, provavelmente através da formação de poros ou por sua disrupção (Brogden, 2005).

4.4.3.1.3 Caracterização estrutural

Como caracterização estrutural, para poder avaliar o modo de ação dos peptídeos, o teste de Dicroísmo Circular foi realizado. Esse teste avalia a formação da estrutura tridimensional das proteínas/peptídeos a partir da refração da luz polarizada que incide sobre a molécula, a medida quem que um líquido mais higroscópico é introduzido à solução.

Pode ser observado na figura 25 que o padrão observado corresponde a uma estrutura randômica e a figura 26 demonstra que o peptídeo Tin-TK-II apresenta um padrão de hélice-3₁₀.

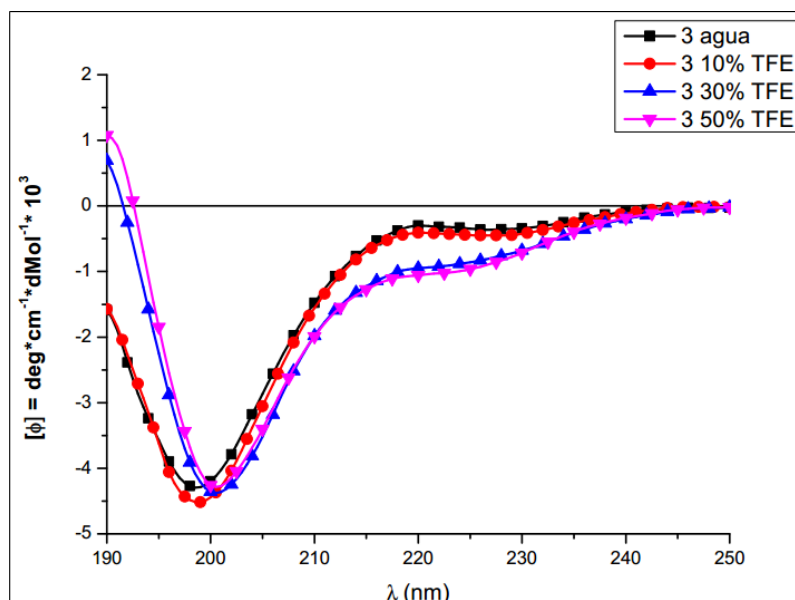


Figura 25 – Difração apresentada pelo Tin-TK-I

Diferença de absorvância da luz polarizada apresentada pelo Triatomina-A1 quando tende ao seu estado nativo. Como observado na legenda, a linha com quadrados corresponde ao comportamento da molécula na presença de água, onde o peptídeo apresenta um padrão de estrutura randômica. Ao ser submetido a um aumento gradativo de trifluoroetanol (10% - linha com círculos; 30% - com triângulos; e 50% - com triângulos invertidos), o peptídeo passa a apresentar uma conformação de α -hélice, com uma banda negativa branda em torno de 220 nm, uma banda negativa proeminente em torno de 200/205 nm e uma banda positiva proeminente em 190 nm.

O peptídeo Tin-TK-I assume um estado randômico, provavelmente devido a dois principais fatores: a) seu comprimento de apenas 9 aminoácidos; b) quase metade de sua sequência é composta por aminoácidos pequenos e neutros (três glicinas e uma prolina), o que dificulta a formação de uma estrutura secundária estável.

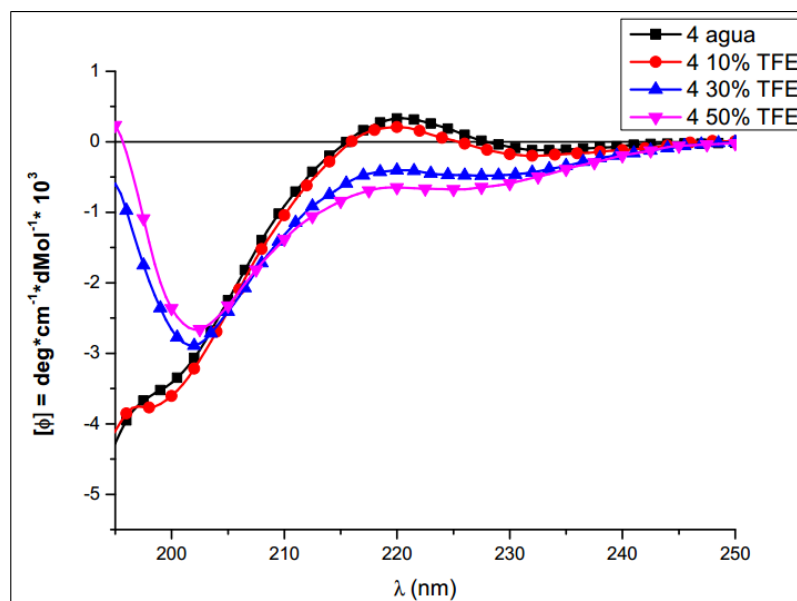


Figura 26 – Difração apresentada pelo Tin-TK-II

Diferença da absorvância da luz polarizada apresentada pelo Tin-TK-II quando tende ao seu estado nativo. Como observado na legenda, a linha com quadrados corresponde ao comportamento da molécula na presença de água, onde o peptídeo apresenta um padrão de estrutura randômica. Ao ser submetido a um aumento gradativo de trifluoroetanol (10% - linha com círculos; 30% - com triângulos; e 50% - com triângulos invertidos), o peptídeo passa a apresentar uma conformação de hélice₃₁₀, com uma banda negativa branda em torno de 230 nm, uma banda positiva em 215 nm e outra banda negativa proeminente em torno de 200 nm.

Considerando que uma estrutura de Hélice 3_{10} apresenta passos com voltas de 120° (correspondendo a 3 aminoácidos por volta), e possui 10 átomos de cada volta formando pontes de hidrogênio (Cooley et al, 2010; Weaver, 2000), o peptídeo Tin-TK-I apresenta uma hélice com aproximadamente 3 voltas.

As Taquicininas são proteínas pertencentes a uma super família, que começaram a ser descobertas em 1931 por Von Euler and Gaddum, sendo seus principais representantes elementos pertencentes ao sistema nervoso, principalmente neurotransmissores/neuromoduladores. Uma subfamília descoberta em insetos, chamada de Peptídeos relacionados à taquicinina (ou Taquicinina-like), já vem sendo amplamente estudada (Vanden, et al. 1999; Severini, et al. 2002).

Em 2009, Ons e colaboradores, ao descreverem o neuropeptidoma do *Rhodnius prolixus*, descobriram 7 peptídeos relacionados à taquicinina. Como os resultados obtidos não incluíram essas sequências, um alinhamento entre elas e as sequências encontradas nos resultados foi realizado (Figura 27). Todas as sequências foram obtidas através do banco Uniprot, onde foram encontradas 6 sequências para as

espécies *B. dimiata*, *N. viridula*, *E. servus* e *A. hilare*, 7 para as espécies *P. apterus*, *P. rufipes*, *O. fasciatus* e para *R. prolixus*.

Ao observarmos o alinhamento entre as sequências identificadas podemos comprovar a similaridade entre elas, principalmente em se tratando das espécies *T. infestans* e *R. prolixus* (Figura 27). Como característica da família de proteínas, a porção C-terminal de todos os peptídeos é bem conservada entre as espécies, e com a presença de um resíduo de Fenilalanina na quinta posição a partir desta extremidade (Severini et al., 2002).

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

p31111 TRP1 TINF	--GPS-GFLGMR-- 9	p21111 TRP2 TINF	-APAA-GFFGMR-- 10
sp P86563 TRP1_BANDI	--GPS-GFLGMR-- 9	sp P86564 TRP2_BANDI	-APAA-GFFGMR-- 10
sp P86594 TRP1_PYRAP	--GPS-GFLGMR-- 9	sp P86588 TRP2_PENRU	-APAA-GFFGMR-- 10
sp P86587 TRP1_PENRU	--GPS-GFLGMR-- 9	sp P86576 TRP2_NEZVI	-APAA-GFFGMR-- 10
sp P86582 TRP1_ONCFA	--GPS-GFLGMR-- 9	sp P86570 TRP2_EUSSE	-APAA-GFFGMR-- 10
sp P86575 TRP1_NEZVI	--GPS-GFLGMR-- 9	sp P86558 TRP2_ACRHI	-APAA-GFFGMR-- 10
sp P86569 TRP1_EUSSE	--GPS-GFLGMR-- 9	sp P85804 TRP3_RHOPR	-APAS-GFFGMR-- 10
sp P86557 TRP1_ACRHI	--GPS-GFLGMR-- 9	sp P86595 TRP2_PYRAP	-APAS-GFFGMR-- 10
sp P85802 TRP1_RHOPR	---SGPGFMGVR-- 9	sp P86583 TRP2_ONCFA	-APAS-GFFGMR-- 10
sp P86593 TRP6_PYRAP	-APSSMGFMGMR-- 11	sp P86572 TRP4_EUSSE	-SPAS-GFFGMR-- 10
sp P86567 TRP5_BANDI	--APLMGFQGV-- 10	sp P86560 TRP4_ACRHI	-SPAS-GFFGMR-- 10
sp P86591 TRP5_PENRU	--APLMGFQGV-- 10	sp P86578 TRP4_NEZVI	-SPAS-GFFGMR-- 10
sp P86579 TRP5_NEZVI	--APLMGFQGV-- 10	sp P86590 TRP4_PENRU	-SPAS-GFFGMR-- 10
sp P86573 TRP5_EUSSE	--APLMGFQGV-- 10	sp P86566 TRP4_BANDI	-SPAS-GFFGMR-- 10
sp P86561 TRP5_ACRHI	--APLMGFQGV-- 10	sp P86597 TRP4_PYRAP	-TPAS-GFFGMR-- 10
sp P85803 TRP2_RHOPR	---TSMGFQGV-- 9	sp P86585 TRP4_ONCFA	-NPAS-GFFGMR-- 10
sp P85808 TRP7_RHOPR	-SPATMGFAGV-- 11	sp P86565 TRP3_BANDI	-GPSS-GFFGMR-- 10
sp P85806 TRP5_RHOPR	-APACVGFQGM-- 11	sp P86589 TRP3_PENRU	-GPSS-GFFGMR-- 10
sp P86598 TRP5_PYRAP	--APVMGFQGM-- 10	sp P86577 TRP3_NEZVI	-GPSS-GFFGMR-- 10
sp P86586 TRP5_ONCFA	--APVMGFQGM-- 10	sp P86571 TRP3_EUSSE	-GPSS-GFFGMR-- 10
sp P86568 TRP6_BANDI	--APSMGFMGMR-- 10	sp P86559 TRP3_ACRHI	-GPSS-GFFGMR-- 10
sp P86592 TRP6_PENRU	--APSMGFMGMR-- 10	sp P86596 TRP3_PYRAP	-GPSS-GFFGTR-- 10
sp P86581 TRP6_ONCFA	--APSMGFMGMR-- 10	sp P86584 TRP3_ONCFA	-APSS-GFFGTR-- 10
sp P86580 TRP6_NEZVI	--APSMGFMGMR-- 10	sp P85807 TRP6_RHOPR	-GPSSSAFFGMR-- 11
sp P86574 TRP6_EUSSE	--APSMGFMGMR-- 10	sp P86555 ALLTR_PYRAP	-GFKNVALSTARGF 13
sp P86562 TRP6_ACRHI	--APSMGFMGMR-- 10	sp P86554 ALLTR_PENRU	-GFKNVALSTARGF 13
sp P85805 TRP4_RHOPR	--TPSDGFMGMR-- 10	sp P86553 ALLTR_ONCFA	-GFKNVALSTARGF 13
sp P85809 TRP8_RHOPR	QERRAMGFVGM-- 12		

Figura 27 – Alinhamento entre as sequências primárias através do ClustalW2

Alinhados na figura, estão as sequências de peptídeos relacionados à Taquicinina das espécies *Banasa dimiata*, *Nezara viridula*, *Euchistus servus* e *Acrosternum hilare*, 7 para as espécies *Pyrrhocoris apterus*, *Pentatoma rufipes*, *Oncopeltus fasciatus* e as sequências já descritas em *Rhodnius prolixus*. Todas as sequências foram obtidas através do banco Uniprot. Destacado em primeiro lugar em cada coluna estão as sequências mais prováveis encontradas para o *Triatoma infestans*, e logo abaixo estão os peptídeos com maior similaridade dentre os demais. Também destacado, estão as duas sequências de *Rhodnius prolixus* que apresentam uma maior similaridade com as sequências alvo.

Alguns trabalhos têm demonstrado que componentes dessa Família em vertebrados possuem atividade antimicrobiana contra algumas cepas de bactérias tais

como *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa* (Berger, et al., 2009; El Karim, et al., 2008; Hansen, et al., 2006; Yi, et al., 2014).

Como são moléculas que pertencem a uma classe de neurotransmissores, ainda há poucas informações na literatura com enfoque em sua estrutura tridimensional, principalmente em invertebrados. Além da função como correspondentes a neurotransmissores em invertebrados, já foram descritos dois peptídeos relacionados à Taquicinina isolados do invertebrado *Urechis unicinctus* (invertebrado popularmente conhecido como peixe-penis), que apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos (Sung et al., 2008).

5 CONCLUSÃO

No sistema imune de artrópodes, em contraste com o dos vertebrados, a imunidade adaptativa ainda não foi confirmada, ou seja, nesses animais o sistema imune baseia-se somente numa resposta inata. Dentre os mecanismos de defesa do sistema imune inato, os PAMs se destacam como um dos mais eficientes. Neste trabalho utilizamos o *T. infestans* como modelo experimental para a caracterização de PAMs presentes na hemolinfa de artrópodes hematófagos, tendo em vista que não há registros de estudos dessa natureza utilizando essa espécie. Dessa forma, demonstramos a ocorrência dez frações com atividade antimicrobiana obtidas na purificação da hemolinfa.

O peptídeo 1, nomeado Triatogênio, apresentou-se compatível com o fibrinopeptídeo A de humanos, e a partir de embasamentos em estudos prévios, sugerimos que o aparecimento dessa molécula na hemolinfa do inseto se dê por absorção intestinal. Produzimos também um análogo, onde faltava uma alanina na décima posição e o grupo protetor da arginina da décima sexta posição não foi removido. Ele se mostrou menos ativo e foi degradado no plasma mais rapidamente que a Triatomina, demonstrando a importância desses aminoácidos para a atividade do peptídeo.

Ambos os peptídeos, depois de sintetizados, foram submetidos ao teste hemolítico e a novos testes antimicrobianos. Ambos não causaram hemólise e apresentaram um maior espectro de atividades. O Triatogênio se mostrou ativo contra as bactérias *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e contra os fungos *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida tropicalis*, *Penicillium expansum*, *Cladosporum sp.* e *Paecilomyces farinosus*. Seu análogo apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias *Micrococcus luteus*, *Serratia marscens* e *Escherichia coli*, e frente os fungos *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Aspergillus Niger*.

Quando analisados em presença de plasma, ambos apresentaram degradação da sequência a partir de sua porção N-terminal, indicando que estão sob ação de uma aminopeptidase. Além disso, ambos apresentaram conformação em alfa-hélice quando analisados através do dicroísmo circular, e não conseguiram romper as vesículas, apesar de formar poros que levam à uma perda do conteúdo de açúcares intravesiculares.

O peptídeo 2, nomeado Triastina, apresentou-se compatível com uma molécula rica em glicina presente na cutícula do próprio *T. infestans*. Depois de sintetizado, a Triastina não foi capaz de lisar hemácias humanas e apresentou-se ativo contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e contra os fungos *Cryptococcus neoformans* e *Penicilium expansum*.

Quando analisado em presença de plasma, apresentou a perda de aminoácidos de ambos os lados (C e N-terminal) da sequência, padrão de degradação correspondente a ação concomitante de carboxi e aminopeptidases.

A Triastina apresentou conformação em hélice 3_{10} quando analisado por dicroísmo circular, e apresentou duas ações em vesícula, sendo capaz de formar poros que levam a perda de conteúdo intravesicular e podendo também levar à lise de membrana.

Os peptídeos 5 e 7 apresentaram-se compatíveis com peptídeos relacionados à taquicinina presentes em insetos, e portanto foram nomeados Tin-TK-I e Tin-TK-II.

Ambos os peptídeos, depois de sintetizados, foram submetidos ao teste hemolítico e a novos testes antimicrobianos. Ambos não causaram hemólise e apresentaram um maior espectro de atividades. O Tin-TK-I se mostrou ativo contra as bactérias *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e contra os fungos *Cryptococcus neoformans*, *Cladosporium sp.* e *Aspergillus Niger*. O Tin-TK-II apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, e frente os fungos *Candida tropicalis* e *Cladosporium sp* e *Penicilium expansum*.

Quando analisados em presença de plasma, o Tin-TK-I apresentou degradação da sequência a partir de sua porção N-terminal, indicando que estão sob ação de uma aminopeptidase. Já o Tin-TK-II apresentou um padrão de degradação por uma carboxipeptidase.

Eles também apresentaram diferenças de conformação quando analisados através do dicroísmo circular, onde o primeiro apresentou conformação randômica, e o segundo apresentou conformação de hélice 3_{10} . No teste de interação com membrana, ambos se mostraram capazes de lisar a membrana vesicular.

Todos os dados encontrados até o momento são dados novos, pois ainda não há descrição de absorção e utilização de fragmentos do Fibrinogênio pelo *T. infestans*, (nomeado Triatomina). Outros fatores que demonstram relevância desse trabalho são a

descrição mais aprofundada de uma proteína pouco conhecida do próprio inseto (Inestina), e identificação de duas moléculas pertencentes à família de proteínas relacionadas à Taquicinina (Tin-TK-I e II), todas encontradas na hemolinfa do *T. infestans*. Além disso, não há registros na literatura sobre atividade antimicrobiana relativas às moléculas descritas neste trabalho.

Este fato vem reforçar a importância da realização desse trabalho no estudo da fisiologia do *T. infestans*, sendo ele um inseto de grande importância médica e sócio-econômica por seu papel na transmissão da doença de chagas.

Concluindo, os nossos resultados mostram que *T. infestans* produzem e secretam e possivelmente absorvem uma diversidade de PAMs na sua hemolinfa com atividade demonstrada contra bactérias e fungos. Esses resultados nos permitem concluir que esses artrópodes hematófagos utilizam essas moléculas de diferentes origens na tentativa de se defender contra agentes agressores diversos. Esses resultados também nos mostram uma compreensão mais ampla do sistema imunológico de diferentes grupos de animais, bem como a origem dos seus mecanismos na história evolutiva e gera informações necessárias para a descoberta de novas moléculas que tenham modo de ação alternativo aos antibióticos convencionais.

REFERÊNCIAS*

- Adams MD, *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 2000 Mar 24;287(5461):2185-95.
- Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Aug 5;94(16):8691-6.
- Anderson RS e Cook ML. Induction of lysozyme-like activity in the hemolymph and hemocytes of an insect, *Spodoptera eridania*. *J. Invertebr. Path.* 1979;33:197-203.
- Angelova MI, Dimitrov DS. Liposome Electroformation. *Faraday Disc Chem Soc*. 1986;81:303-11.
- Arillo A. Engel MS. Rock Crawlers in Baltic Amber (Notoptera: Mantophasmatodea). *American Museum Novitates*. 2006; 3539:1 – 10.
- Ashida K, Sasaki H, Suzuki YA, Lönnnerdal B. Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *Biometals*. 2004 Jun;17(3): 311-5.
- Assumpção TC, Francischetti IM, Andersen JF, Schwarz A, Santana JM, Ribeiro JM. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas disease. *Insect Biochem Mol Biol*. 2008;38(2):213-32.
- Barlow DJ, Thornton JM. Helix geometry in proteins. *J Mol Biol*. 1988.Jun 5;201(3):601–19.
- Beckage NE. *Insect and Vertebrate Immunity: Key Similarities Versus Differences in: Insect Immunology*. Elsevier. 2008. vol. 1, p. 1-23. ISBN: 978-0-12-373976-6.
- Barber AK, Fisher JR. A Mechanism of Action for Carboxypeptidase A. *Proc Ant Acad Sci USA*. 1972 Oct;69(10):2970-4.
- Berger A, Tran AH, Dedier H, Gardam MA, Paige CJ. Antimicrobial properties of hemokinin-1 against strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Life Sci*. 2009 Nov 4;85(19-20):700-3.
- Berti Filho, E. *Morfologia dos Insetos*. ESALQ: Apostila de Pós-Graduação, 1978.
- Blandin S, Levashina EA. Thioester-containing proteins and insect immunity. *Molecular Immunology*. 2004;40(12):903-8.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals.references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Boman H G. Antibacterial Peptides:Key Components Needed in Immunity. Cell. 1991;65:205-7.

Boman HG, Nilsson-Faye I, Paul K, Rasmuson T. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. Insect immunity. 1974;10(1):136-45.

Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat Rev Microbiol. 2005 Mar;3(3):238-50.

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

Chadwick JS. Relation of lysozyme concentration to acquired immunity against *Pseudomonas aeruginosa* in *Galleria mellonella*. Invertebr. Pathot. 1970;15:455-5.

Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi*, agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1:159-218.

Chai YM, Zhu Q, Yu SS, Zhao XF, Wang JX. A novel protein with a fibrinogen-like domain involved in the innate immune response of *Marsupenaeus japonicus*. Fish Shellfish Immunol. 2012;32:307-15.

Chan WC, White PD. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis – A Practical Approach. 1^a ed. UK: Oxford University Press, 2000. 376 p.

Chapuisat M, Oppliger A, Magliano P, Christie P. Wood ants use resin to protect themselves against pathogens. Proc Biol Sci. 2007 Aug 22;274(1621):2013-7.

Charroux B, Rival T, Narbonne-Reveau K, Royet J. Bacterial detection by *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins. Microbes Infect. 2009 May-Jun;11(6-7):631-6. doi: 10.1016/j.micinf.2009.03.004. Epub 2009 Apr 1.

Chinzei Y, Haruna T, Miura K, Numata H, Nakayama S. Purification and characterization of biliverdin-associated cyanoprotein from eggs and hemolymph of the bean bug, *Riptortus clavatus* (Heteroptera: Alydidae). Insect Biochemistry. 1990;20(6):545-55.

Cooley RB, Arp DJ, Karplus PA. Evolutionary origin of a secondary structure: π -helices as cryptic but widespread insertional variations of α -helices enhancing protein functionality". J Mol Biol. 2010;404(2):232–46.

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

Dias JCP, Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997:486 p. ISBN 85-85676-31-0.

Dias JCP. Os primórdios do controle da doença de Chagas (em homenagem a Emmanuel Dias, pioneiro do controle, no centenário de seu nascimento). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011;44(2):12-8. ISSN 0037-8682.

Dunn PE, Biochemical aspects of insect immunology. *Annual Review of Entomology.* 1986;31:321-39.

Duvic B, et al. Cecropins as a marker of *Spodoptera frugiperda* immunosuppression during entomopathogenic bacterial challenge. *J Insect Physiol.* 2012 Jun;58(6):881-8. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.04.001. Epub 2012 Apr 6.

El Karim IA, Linden GJ, Orr DF, Lundy FT. Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of micro-organisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites. *J Neuroimmunol.* 2008 Aug 30;200(1-2):11-6. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.05.014.

Fan C, Zhang S, Li L, Chao Y. Fibrinogen-related protein from amphioxus *Branchiostoma belcheri* is a multivalent pattern recognition receptor with a bacteriolytic activity. *Mol Immunol.* 2008;45(12):3338-46.

Faye I, Pye A, Rasmuson T, Boman HG, Buman IA Simultaneous induction of antibacterial activity and selective synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia*. *Infect. Immun.* 1975;12(6):1426-38.

Ferreira ILM, Silva TPT. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006 Oct;39(5):507-509. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822006000500018>.

Fogaça A. C., da Silva, P. I. Jr., Miranda M. T., Bianchi A. G., Miranda A., Ribolla P. E., Daffre S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem.* Sep 3;274(36):25330-4, 1999.

Footitt G, Adler PH. *Insect Biodiversity: Science and Society.* 1ª ed. UK: Wiley-Blackwell Publishing Ltd; 2009. 656 p.

Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SSL, Daher K, Lehrer RI. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation.* 1985;76(4):1427-35.

Gillespie JP, Kanost MR And Trenczek T. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology.* 1997;42:611-43.

Grimaldi D, Engel MS. *Evolution of Insects.* 1ª ed. Cambridge University Press; 2005. 733 p.

- Gokudan S, et al. Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(18):10086-91.
- Gullan PJ, Cranston PS. *The Insects An Outline of Entomology*. 5^a ed. Wiley-Blackwell; 2014. 355 p.
- Hanington PC, Zhang SM. The primary role of fibrinogen-related proteins in invertebrates is defense, not coagulation. 2011;3(1):17-27.
- Hansen CJ, Burnell KK, Brogden KA. Antimicrobial activity of Substance P and Neuropeptide Y against laboratory strains of bacteria and oral microorganisms. *J Neuroimmunol*. 2006 Aug;177(1-2):215-8. Epub 2006 Jun 30.
- Hao G, Shi YH, Tang YL, Le GW. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2. *Peptides*. 2009 Aug;30(8):1421-7. doi: 10.1016/j.peptides.2009.05.016. Epub 2009 May 23.
- Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G. Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Jul;31(7):741-6.
- Hink WF, Briggs JD. Bactericidal factors in hemolymph from normal and immune wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Insect Physiol*. 1968;14(7):1025-34.
- Hoffmann A. Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol*. 1995 Feb;7(1):4-10.
- Hwang JS, Lee J, Kim YJ, Bang HS, Yun EY, Kim SR, et al. Isolation and characterization of a defensin-like peptide (Coprinsin) from the dung beetle, *Copris tripartitus*. *Int J Pept*. 2009;1-5.
- Imamura M, et al. Multi-peptide precursor structure of acaloleptin A isoforms, antibacterial peptides from the Udo longicorn beetle, *Acalolepta luxuriosa*. *Dev Comp Immunol*. 2009 Oct;33(10):1120-7. doi: 10.1016/j.dci.2009.06.004. Epub 2009 Jun 24.
- Irving P, Ubeda J, Doucet D, Troxler L, Lagueux M, Zachary D, Hoffmann J, Hetru C, Meister M. New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol*. 2005 Mar;7(3):335-50.
- Jean-Francois F, Elezgaray J, Berson P, Vacher P, Dufourc Ej. Pore formation induced by an antimicrobial peptide: electrostatic effects. *Biophys J*. 2008 Dec 15; 95(12): 5748–5756. Published online 2008 Sep 26. doi: 10.1529/biophysj.108.136655
- Jeffers LA, Roe RM. The movement of proteins across the insect and tick digestive system. *J Insect Physiol*. 2008;54(2):319-32.
- Kelly, SM, Jess, TJ e Price, NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 2005 Aug 10;1751(2):119-39.

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

Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol*. 2001 Feb 15;230(2):243-57.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007 Nov 1;23(21):2947-8. Epub 2007 Sep 10.

Lee VS, Tu WC, Jinn TR, Peng CC, Lin LJ, Tzen JT. Molecular cloning of the precursor polypeptide of mastoparan B and its putative processing enzyme, dipeptidyl peptidase IV, from the black-bellied hornet, *Vespa basalis*. *Insect Mol Biol*. 2007 Apr;16(2):231-7. Epub 2007 Feb 6.

Leher RI, Ganz T, Selsted ME. Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell*. 1991;64(2):229-30.

Leite OF *et al.* *Triatoma infestans* em área sob vigilância entomológica para doença de Chagas, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2001;34(5):437-44.

Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*. 2012;37(2):207-15.

Liang JF, Kim SC. Not only the nature of peptide but also the characteristics of cell membrane determine the antimicrobial mechanism of a peptide. *J Pept Res*. 1999 May;53(5):518-22.

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

Liu S, *et al.* Crystal structure of mastoparan from *Polistes jadwagae* at 1.2 Å resolution. *J Struct Biol*. 2007 Oct;160(1):28-34. Epub 2007 Jun 23.

Löfgren SE. Atividades Antimicrobiana, Antiparasitária e Hemolítica De Peptídeos Antimicrobianos Isolados de Animais Aquáticos. [Dissertação (Mestrado)]. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Santa Catarina; 2012. Available: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/89841>

Maramorosch K, Shope RE. Invertebrate immunity: mechanisms of invertebrate vector-parasite relations. *Yale J Biol Med*. 1975;49(9):422-3.

Martins LPA *et al.* Estudo comparativo entre duas técnicas de xenodiagnóstico artificial aplicado em pacientes chagásicos crônicos. *Rev. patol. trop*. 2001;30(1):61-8.

Matsuyama K, Natori S. Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*. J Biol Chem. 1988;263:17112–6.

Mello CB, Garcia ES, Ratcliffe NA, Azambuja P. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. J Invertebr Pathol. 1995 May;65(3):261-8.

Mihajlovic M, Lazaridis T. Antimicrobial peptides bind more strongly to membrane pores. Biochim Biophys Acta. Biochim Biophys Acta. 2010 Aug;1798(8):1494-502. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.02.023. Epub 2010 Feb 24.

Misra S, et al. Annotation of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome: a systematic review. Genome Biol. 2002;3(12):RESEARCH0083. Epub 2002 Dec 31.

Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1336 p.

Nyholm SV, Graf J. Knowing your friends: invertebrate innate immunity fosters beneficial bacterial symbioses. Nat Rev Microbiol. 2012 Dec;10(12):815-27. doi: 10.1038/nrmicro2894. Epub 2012 Nov 13.

Ons S, Richter F, Urlaub H, Pomar RR. The neuropeptidome of *Rhodnius prolixus* brain. Proteomics. 2009 Feb;9(3):788-92. doi: 10.1002/pmic.200800499.

Påhlman LI, Mörgelin M, Kasetty G, Olin AI, Schmidtchen A, Herwald H. Antimicrobial activity of fibrinogen and fibrinogen-derived peptides—a novel link between coagulation and innate immunity. Thromb Haemost. 2013 May;109(5):930-9. doi: 10.1160/TH12-10-0739. Epub 2013 Mar 7.

Park JW, Lee BL. Insect Immunology. In: Lawrence I. Gilbert (Ed). Insect Molecular Biology and Biochemistry. 1^a ed. USA: Elsevier. 2001;480-512.

Pauling L, Corey RB, Branson HR. The Structure of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1951 Apr;37(4):205–211.

Polanowski A, Wilusz T. Serine proteinase inhibitors from insect hemolymph. Acta Biochim Pol. 1996;43(3):445-53.

Powning RF, Davidson WJ. Studies of insect bacteriolytic enzymes. I. Lysozyme in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Bombyx mori*. Comp Biochem Physiol B. 1976;55(2):221-8.

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

Rego RO, Hajdusek O, Kovár V, Kopáček P, Grubhoffer L, Hypsa V. Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros*

moubata and the hard tick *Ixodes ricinus*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2005 Sep;35(9):991-1004.

Ribeiro JM. and Garcia E. S. Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Experientia*. 1981 Apr 15;37(4):384-6.

Riciluca KCT. Purificação e caracterização de Peptídeos Antimicrobianos presentes na hemolinfa de *Acanthoscurria rondoniae* (mygalomorphae, theraphosidae). [Dissertação (Mestrado em Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Instituto Adolfo Lutz; 2011.

Riedel T, Suttner J, Brynda E, Houska M, Medved L, Dyr JE. Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation. *Blood*. 2011;117(5):1700-6.

Rohl CA, Scholtz JM, York EJ, Stewart JM, Baldwin RL. Kinetics of amide proton exchange in helical peptides of varying lengths: Interpretation by Lifson-Roig equation. *Biochemistry*. 1992 Feb 11;31(5):1263-9.

SaddBM, Schimdt-Hempel P. Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. *Current Biology*. 2006;16(12):1206-10.

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

Scheraga HA. The thrombin-fibrinogen interaction. *Biophys Chem*. 2004 Dec 20;112(2-3):117-30.

Scourfield DJ. The Oldest Known Fossil Insect. *Nature*. 1940;145:799-80.
Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev*. 2002 Jun;54(2):285-322.

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

Silva Jr PI, Daffre S, Bulet PJ. 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 tachyplexin family. *Biol. Chem*. 2000;275(43):33464-70.

Souza ALA, De Simone SG. Peptídeos microbicidas: Uma alternativa viável para a terapia antimicrobiana. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 2000;24:12-6.

Steiner H, Hultmark D, Engström A, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*. 1981;292(5820):246-8.

Sterba J, Dupejova J, Fiser M, Vancova M, Grubhoffer L. Fibrinogen-related proteins in ixodid ticks. *Parasites e Vectors*. 2011;4:127.

- Stevens JM. Bactericidal activity of the blood of actively immunized wax moth larvae. *Can. J. Microbio.* 1962;8(4):491-9.
- Strand MR, Pech LL. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology.* 1995;40:31-56.
- Strand MR. The insect cellular immune response. *Insect Science.* 2008;15:01-14.
- Stuart LM, Ezekowitz RAB. Phagocytosis:elegant complexity. *Immunity.* 2005;22(5), 539-50.
- Sung WS, Park SH, Lee DG. Antimicrobial effect and membrane-active mechanism of Urechistachykinins, neuropeptides derived from *Urechis uncinatus*. *FEBS Lett.* 2008 Jul 9;582(16):2463-6. doi: 10.1016/j.febslet.2008.06.015. Epub 2008 Jun 18.
- Tanaka H. A novel Rel protein and shortened isoform that differentially regulate antibacterial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Biochim Biophys Acta.* 2005 Jul 25;1730(1):10-21.
- Taylor A. Aminopeptidases: structure and function. *FASEB J.* 1993 Feb 1;7(2):290-8.
- Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K, Dushay MS. Coagulation in arthropods, defense, wound closure and healing. *Trends in Immunology.* Trends Immunol. 2004 Jun;25(6):289-94.
- Thevissen K, Kristensen HH, Thomma BP, Cammue BP, François IE. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discov Today.* 2007 Nov;12(21-22):966-71. Epub 2007 Sep 4. Review.
- Theopold U, Schmidt O, Soderhall K, Dushay, M. S. Coagulation in arthropods, defense, wound closure and healing. *Trends in Immunology.* 2004;25(6):289-94.
- Vanden Broeck J, Torfs H, Poels J, Van Poyer W, Swinnen E, Ferket K, De Loof A. Tachykinin-like peptides and their receptors. A review. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;897:374-87.
- Vilcinskas A, Wedde M. Insect inhibitors of metalloproteinases. *IUBMB Life.* 2002 Dec;54(6):339-43.
- Viljakainen L, Pamilo P. Selection on an antimicrobial peptide defensin in ants. *J Mol Evol.* 2008 Dec;67(6):643-52. doi: 10.1007/s00239-008-9173-6.
- Wang X, Zhao Q, Christensen BM. Identification and characterization of the fibrinogen-like domain of fibrinogen-related proteins in the mosquito, *Anopheles gambiae*, and the fruitfly, *Drosophila melanogaster*, genomes. *BMC genomics.* 2005;6:114.
- Waniek PJ, Castro HC, Sathler PC, Miceli L, Jansen AM, Araujo CAC. Two novel defensinencoding genes of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae):Gene expression and peptide-structure modeling. *Journal of Insect Physiology.* 2009;55:840-8.

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

Wigglesworth VB. The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London:Biological Sciences*. 1943;131:313–39.

Wu G, Wu H, Li L, Fan X, Ding J, Li X, Xi T, Shen Z. Membrane aggregation and perturbation induced by antimicrobial peptide of S-thanatin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Apr 23;395(1):31-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.107. Epub 2010 Mar 21

Yamada K, Natori S. Characterization of the antimicrobial peptide derived from sapecin B, and antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Biochem J*. 1994 Mar 15;298 Pt 3:623-8.

Yamaguchi Y, Ouchi Y. Antimicrobial peptide defensin: Identification of novel isoforms and the characterization of their physiological roles and their significance in the pathogenesis of diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2012;88(4):152-66.

Yi S, Wang W, Bai F, Zhu J, Li J, Li X, Xu Y, Sun T, He Y. Antimicrobial effect and membrane-active mechanism of tea polyphenols against *Serratia marcescens*. *World J Microbiol Biotechnol*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014 Feb;30(2):451-60. doi: 10.1007/s11274-013-1464-4. Epub 2013 Aug 27.

Zasloff M. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr Opin Immunol*.1992;4(1):3-7.

Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. Jan; 415: 2002 <www.nature.com> Acesso em: 03/05/2013.

Zavalova LL, Basanova AV, Baskova IP. Fibrinogen-fibrin system regulators from bloodsuckers. 2002;67(1):135-42.

ANEXOS

A – MANUSCRITO ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA