

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

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.

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

Zygentoma	527
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).

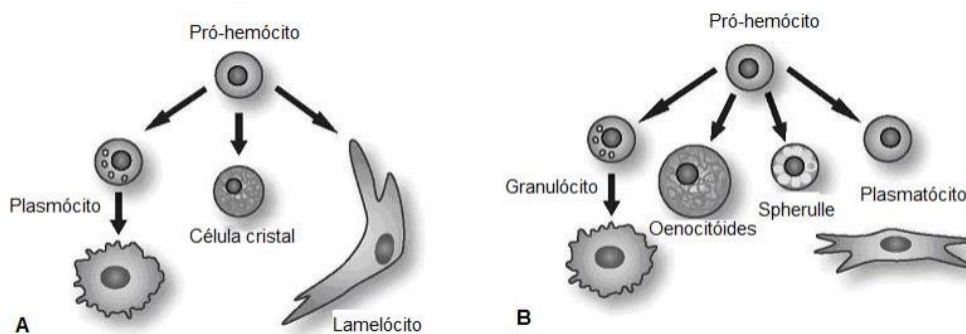
Curiosamente ainda não se tem dados exatos sobre o sistema adaptativo desses animais. Sabe-se que não apresentam um sistema imune adaptativo com células que promovem a memória imunológica propriamente dita, mas já foram descritas moléculas da superfamília das Imunoglobulinas Gs produzidas por esses animais (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).

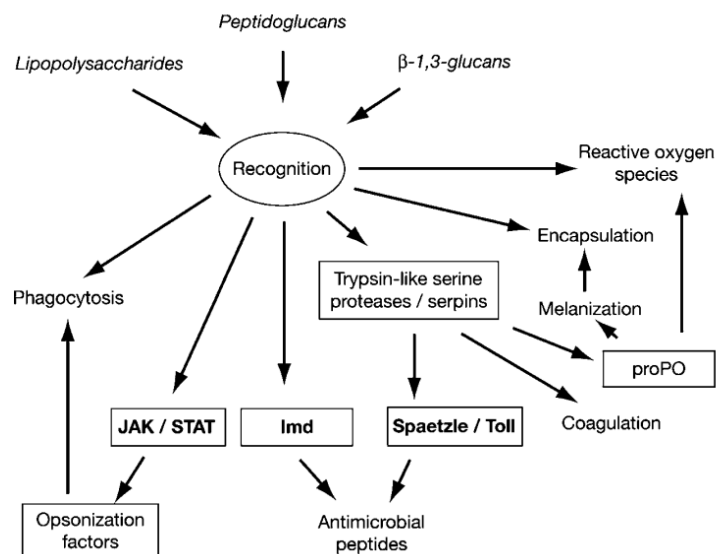
Em um primeiro contato com o organismo invasor, ocorre um aumento do número dessas populações celulares na hemolinfa através de estímulos para liberação de células de acumulação temporária, aumento da liberação de massas de células não proliferativas ou de órgãos fagocíticos, ou aumento na taxa de mitose 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-kB, 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 -helice- 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 -helices 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 contem de 14 a 22% de resíduos de glicina em sua constituição, o que afeta diretamente sua conformação terciária e o seu modo de ação conseqüentemente (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 seqüências 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.

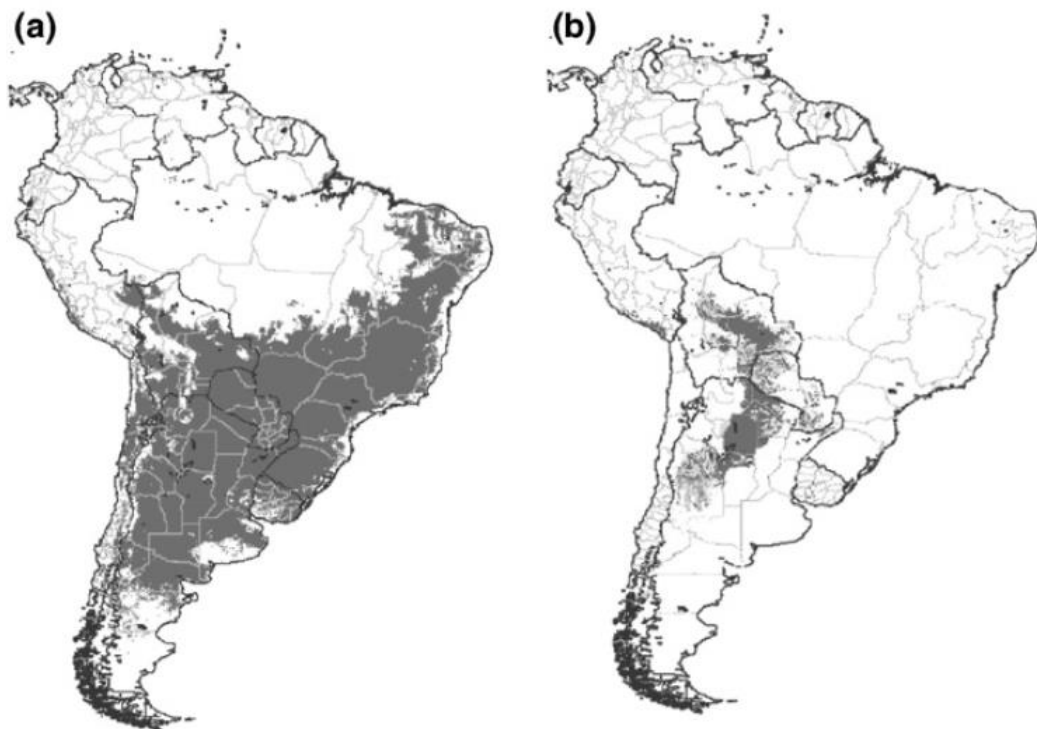
Essa estratégia básica, aplicada em toda a América do Sul, era dividida basicamente em três diferentes procedimentos: Controle direto do vetor (aplicação maciça de inseticidas); Melhoria habitacional (incentivo à construção de casas de alvenaria); e Ações de educação e organização social (Dias, Coura,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

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 de 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*, *Cladosporium sp.* e *Paecilomyces farinosus*. Seu análogo apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* 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 *Penicillium 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 *Penicillium 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* produz 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, Lönnerdal 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.

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

*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 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, Christe 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.* 1^a 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.* 1^a 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. 1ª 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.

Sadd BM, 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 tachyplesin 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 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 defensin encoding 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.