

KATIE CRISTINA TAKEUTI RICILUCA

"Peptídeos Bioativos do Plasma de *Acanthoscurria rondoniae*"

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

São Paulo
2016

KATIE CRISTINA TAKEUTI RICILUCA

"Peptídeos Bioativos do Plasma de *Acanthoscurria rondoniae*"

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. 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 não autorizada pelo autor

Riciluca, Katie Cristina Takeuti.
Peptídeos bioativos do plasma de *Acanthoscurria rondoniae* / Katie
Cristina Takeuti Riciluca. -- São Paulo, 2016.

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

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

Versão do título para o inglês: Bioactives peptides from plasma of
Acanthoscurria rondoniae.

1. Fragmento de hemocianina 2. Rondonina 3. Atividade antiviral 4.
Ligação com DNA 5. cryo-EM 6. Transcriptoma I. Silva Júnior, Prof.
Dr. Pedro Ismael II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB046/2016

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

Candidato(a): Katie Cristina Takeuti Riciluca.

Título da Tese: Peptídeos bioativos do plasma de *Acanthoscurria rondoniae*.

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

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Comitê de ética



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN

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

São Paulo, 17 de abril de 2012.

Protocolo: I-900/12

Dr. Pedro Ismael da Silva Júnior
Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada
Instituto Butantan

**Referente Projeto: "Peptídeos Bioativos do Plasma de
Acanthoscurria rondoniae".**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) informa que o projeto acima referido é isento de análise por parte desta Comissão, pois não faz uso de animais vertebrados em sua execução.

Cordialmente,

Dr. Marcelo Larami Santoro
Coordenador da CEUAIB

***Dedico este trabalho aos meus pais,
Riciluca e Suemi, que sempre
me incentivaram a correr
atrás do meu sonho.***

*Ao meu namorado Danilo
que sempre esteve ao meu lado.*

TE AMO!!!!

Agradecimentos

Estou cumprindo mais uma etapa em minha vida, com momentos fáceis e outros muito difíceis, mas nenhum menos importante;

Durante essa fase muitas pessoas estiveram presentes, me apoiando, ajudando e até criticando e acredito que serviu muito para o aprendizado e no crescimento profissional, intelectual e pessoal.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma direta ou indiretamente, doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível:

A Deus, por acreditar que nossa existência pressupõe uma outra infinitamente superior;

Ao meu orientador, Dr. Pedro Ismael da Silva Júnior, que teve um papel muito importante no meu aprendizado por todos esses anos, por acreditar que sou capaz, pela confiança, pelo auxílio, pelas broncas, paciência, disponibilidade de tempo e material, sempre com uma simpatia contagiante;

Aos meus pais, Riciluca e Suemi, que mesmo de longe estão sempre por perto, incentivando, compreendendo a ausência e acima de tudo o amor;

As minhas irmãs, Thamie e Silie, que sempre estiveram do meu lado;

Ao meu namorado, companheiro e confidente, Danilo Agostinelli, que sempre esteve ao meu lado com muita paciência, compreensão, inclusive quando tive que ficar no laboratório até tarde ou em pleno feriado ou final de semana e que me ajudou a superar as horas mais difíceis;

Ao Dr. Rodrigo Portugal, do Laboratório Nacional de Nanotecnologia, LNNano, CNPEM, Campinas, pela confiança e a oportunidade de realizar o estágio

sanduíche na Holanda e seu técnico Alexandre Cassago pelo preparo das grades de microscopia;

Ao meu orientador no exterior Dr. Marin van Heel, que me acolheu muito bem, sua ajuda foi imprescindível para obtenção dos dados, ao Pavel Afanasyev, seu aluno de doutorado, que teve muita paciência e disponibilidade de me ajudar e ensinar com o processamento de dados de imagem de partícula única em crio microscopia;

Aos meus amigos do Laboratório Química de Proteínas, o qual nos tornamos uma grande família, Andrea Grespan, Andrea Roa, Carol Nisa, Débora Figueiredo, Elisa Chaparro, Laura Diniz, Sandra Santos, Soraia Nascimento, Thiago Oliveira, e a técnica Rosa Carmo, pela amizade, conversas, desabafos, risadas, compreensão, paciência, e principalmente na ajuda na obtenção e interpretação dos dados;

Aos meus amigos da disciplina de Imunologia, Aline Teixeira, Andrews Krupinsky, Luís Guilherme, Bruno Yamamoto, Marcela Bordenalli, Ivana Campos, Giovana Salustiano, Thalita Araújo, pelas conversas no coffee-break, risadas, encontros, foi muito bom conhecer vocês;

Ao Dr. Ronaldo Zucatelli com a ajuda nos experimentos antivirais;

Ao Dr. José Carlos e a Dra Shirlei Schrer, do laboratório do Instituto de Química pela ajuda nos experimentos de interação com membranas artificiais lipídicas;

Ao Dr. Rogério Bertani, Carol e Roberto pela cumplicidade, amizade, disponibilidade, ajuda na identificação e análise sistemática dos animais;

A minhas primas e primos, tias e tios, minha madrinha Kazue que mesmo de longe acreditaram na minha capacidade e sempre estiveram do meu lado;

A minha outra família, Solange, Vilma, Juliana, Lucas e Henrique pelo apoio, paciência, conversas, risadas e por acreditarem em mim;

Aos amigos, Juliana Fontes que teve uma participação importante como amiga e confidente e ao Vítor Serrao, pela ajuda e paciência durante os seis meses de estágio sanduíche;

A Dra. Mônica Lopes, a Dra. Solange Serrano e ao Dr. Hugo Armelin pela permissão de desenvolver meu trabalho no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) CeTICS-Cepid;

A Dra. Úrsula Oliveira, pela amizade e paciência, Dr. Milton Yutaka e o Dr. Inácio Junqueira, as técnicas Nancy e Mariana, pela disponibilização de material e equipamentos para análises de interação com material genético e análise do transcriptoma;

Aos pesquisadores e alunos da facility Espectrometria de massas do LETA pela ajuda e apoio nas análises;

Aos pesquisadores e alunos da facility Imunoregulação do LETA pela ajuda no protocolo de hemólise;

Aos pesquisadores e alunos, Ana Karina, Débora, Eduardo, Milene e Ana Helena da facility Proteômica do LETA pela ajuda com os géis 2D, disponibilidade de material e equipamentos;

Aos pesquisadores e alunos da facility Biologia Molecular do LETA e LECC pela disponibilidade de material e equipamentos e ao técnico Ivan Novaski pela ajuda e ensinamento com os experimentos de manutenção celular e citotoxicidade;

A todos os funcionários da secretaria, técnicos e o pessoal da limpeza do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada que sempre estavam dispostos a ajudar;

A Capes, pela concessão de bolsa de doutorado, CNPq pela bolsa sanduíche, e a Fapesp e CNPq pelo investimento no laboratório;

Aos membros da secretaria da Pós-Graduação em Biotecnologia – ICB - USP;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação da USP e Instituto Butantan, pelo aprendizado adquirido nesse período;

A todos os membros que participaram da minha banca de qualificação e defesa contribuindo com suas críticas e sugestões para a melhoria do trabalho;

Enfim, agradeço a todos que estiveram presentes durante mais essa etapa da vida concluída.

Obrigada por tudo!

***“Eu tentei 99 vezes e falhei,
mas na centésima tentativa
eu consegui, nunca desista
de seus objetivos mesmo
que esses pareçam
impossíveis, a próxima
tentativa pode ser a
vitoriosa”.***

Albert Einstein

RESUMO

Riciluca KCT. Peptídeos Bioativos do Plasma de *Acanthoscurria rondoniae*. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Na hemolinfa dos artrópodes encontramos os peptídeos antimicrobianos (AMP) que são importantes componentes do sistema imune de todos os organismos vivos. Na hemolinfa também encontramos a hemocianina, que é uma proteína constituída de múltiplos hexâmeros, onde cada um é constituído por monômeros de aproximadamente de 72 kDa. Além do seu papel de carregadora de oxigênio também pode atuar na osmorregulação e algumas reações imunes. Em quelicerados também foi sugerido que esta proteína pode apresentar atividade de fenoloxidase, após clivagem proteolítica. Purificamos do plasma de *Acanthoscurria rondoniae* um peptídeo, rondonina, com atividade antifúngica, massa molecular de 1.236 Da e sequência primária IIIQYEGHKH. Mostrou identidade com o C-terminal da subunidade “D” da hemocianina da aranha *Aphonopelma hentzi*. Este resultado nos levou a propor uma nova via do sistema imune de aracnídeos, atribuindo assim uma nova função para a hemocianina: produção de peptídeos antimicrobianos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi continuar a identificação dos peptídeos antimicrobianos do plasma da aranha *Acanthoscurria rondoniae*, obter a sequência das subunidades da hemocianina e sua estrutura tridimensional, avaliar as atividades da rondonina: antifúngico pH dependente, associação com gomesina (um peptídeo presente nos hemócitos), avaliação da citotoxicidade contra células de mamíferos, mecanismo de ação utilizando membranas artificiais lipídicas e material genético e atividade contra vírus humanos. Através de técnicas cromatográficas identificamos 15 frações com atividade antimicrobiana no plasma. Encontramos duas frações contra *E.coli*, e outras treze contra *C.albicans* (incluindo a rondonina). A maioria das frações ativas (dez) mostraram similaridade com subunidades da hemocianina. As sequências das subunidades se mostraram muito conservadas e o primeiro modelo estrutural de hemocianina de aranha foi obtido por criomicroscopia. A produção de rondonina ocorre em condições ácidas, provavelmente pelo processamento da hemocianina a partir de uma enzima presente no plasma. Sua atividade antifúngica foi ampliada para *C. neoformans*. Apresentou melhor atividade em pH ácido para *C. albicans* e sinergismo com gomesina. Quando avaliada em células de mamífero, tumoral e não tumoral, não alterou a viabilidade celular. O peptídeo não foi capaz de interagir com membranas artificiais lipídicas. Apresentou proteção às células da infecção por vírus humanos de RNA, Sarampo, H1N1 e EMC, e a primeira vez demonstrado um fragmento de hemocianina com atividade antiviral e seu mecanismo de ação quando avaliado demonstrou estar relacionado com material genético de levedura. Neste contexto, nossos resultados nos ajudam a entender porque aracnídeos sobreviveram por um longo tempo na escala evolutiva. E como as doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana torna-se vital investir na busca de substâncias naturais ou sintéticas que exibam atividades antimicrobianas específicas e, acima de tudo, que as exerçam através de mecanismos de ação alternativos daqueles dos antibióticos disponíveis.

Palavras-chave: Fragmentos de Hemocianina. Rondonina. Atividade Antiviral. Ligação com DNA. cryo-EM. Transcriptoma.

ABSTRACT

Riciluca KCT. Bioactives Peptides from Plasma of *Acanthoscurria rondoniae*. [Thesis Ph. D (Biotecnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

In the hemolymph of arthropods we found the antimicrobial peptides (AMP) which are important components of the immune system of all living organisms. We also found in the hemolymph, the hemocyanin, a protein which is composed of multiple hexamers, wherein each monomer consists of approximately 72 kDa. In addition to its oxygen carrier function can also act in osmoregulation and some immune reactions. In quelicerados it was also suggested that this protein may exhibit phenoloxidase activity after proteolytic cleavage. We purify in the *Acanthoscurria rondoniae* plasma a peptide, rondonin, with antifungal activity, molecular weight of 1,236 Da and primary sequence IIIQYEGHKK. It showed identity with the C-terminus of subunit "D" of the hemocyanin of *Aphonopelma hentzi* spider. This result led us to propose a new pathway of the immune system of arachnids, thus giving a new function to hemocyanin: production of antimicrobial peptides. Thus, the objective was to continue the identification of antimicrobial peptides from plasma of the *Acanthoscurria rondoniae* spider, obtain the sequence of subunits of hemocyanin and its three-dimensional structure, evaluate the activities of rondonin: antifungal pH dependent, association with gomesin (a peptide from hemocytes), evaluation of cytotoxicity against mammalian cells, mechanism of action using artificial lipid membranes and genetic material and activity against human viruses. By chromatographic techniques we identified 15 fractions with antimicrobial activity in plasma. We found two fractions against *E. coli*, and other thirteen against *C. albicans* (including rondonin). The most active fractions (ten) showed similarity to the subunits of hemocyanin. The sequences of the subunits were very conserved and the first structural model of spider hemocyanin was obtained by cryomicroscopy. The production of rondonin occurs under acidic conditions, probably by the processing of hemocyanin from an enzyme present in the plasma. Its antifungal activity was expanded to *C. neoformans*. It showed better activity in acid pH to *C. albicans* and synergism with gomesin. When available in mammalian cells, tumor and non-tumor, it did not alter cell viability. The peptide was not able to interact with artificial lipid membranes. It presented protection to infection of cells by human RNA viruses, measles, H1N1 and EMC, and the first time demonstrated a fragment of hemocyanin with antiviral activity and its mechanism of action when evaluated showed to be related to genetic material of yeast. In this context, our results help us understand why arachnids have survived for a long time on the evolutionary scale. And how infectious diseases are among the leading causes of death in human population becomes vital to invest in the search for natural or synthetic substances that exhibit antimicrobial activity specific and, above all, that carry through alternative mechanisms of action of these antibiotics available.

Key-words: Hemocyanin's fragments. Rondonin. Antiviral Activity. cryo-EM. Transcriptome.

Lista de Figuras

- Figura 1 – Esquema representativo do sistema imune de artrópodes. Uma vez que patógenos entram na hemocele do hospedeiro, eles devem encontrar um mecanismo complexo de defesa do sistema imune inato (modificado de Jiravanichpaisal et al., 2006).....33
- Figura 2 – Estrutura básica da hemocianina dos Chelicerata. Hemocianina construída hierarquicamente $2n$ ($n = 0, 1, 2, 3$) em hexâmeros.36
- Figura 3 - Estrutura 24-mer da Hemocianina da tarântula *A. hentzi*. As diferentes cores se referem as diferentes subunidades: a -verde; b - cinza; c - marron; d - amarelo; e - rosa; f - azul; g – vermelho (Voit et al, 2000).....38
- Figura 4 - Mecanismos propostos de peptídeos antimicrobianos mediados pela ruptura da membrana. a) Modelo “Barrel-stave”, b) Modelo “Carpet”, c) Formação Poro Toroidal, d) Formação Poro Toroidal desordenado (Melo et al.,2009).40
- Figura 5 – Esquema das possíveis vias de interação de peptídeos antimicrobianos com lipídios. Monômeros e pequenas agregações de peptídeos, em contato com a membrana, que acabam se ligando na interface (adsorção). Eventualmente os peptídeos distribuem-se equitativamente entre as duas camadas lipídicas. Isto pode ocorrer por duas vias de translocação diferentes. Na translocação sem “leakage”(vazamento), os peptídeos são capazes de cruzar a membrana sem a formação de poros. Em alguns casos, o estado intermediário transmembranar é termodinamicamente estável (por exemplo, peptídeos hidrofóbicos que adotam uma orientação transmembranar). A principal caracterisitca dos peptídeos antimicrobianos é a permeabilização da membrana seguindo a via translocação com “leakage”. Acima de certa eazao peptídeo/lipídio, os peptídeos inserem na membrana formando poros. Uma variedade de estrutura de poros diferentes pode ser formada, incluindo os estados: “barril”; toroidal e toroidal desordenado. Estes estados separados devem ser interpretados em casos extremos, podendo ocorrer uma mistura de variedades desses modelos. O poro pode ser uma estrutura estável, mas também pode ser uma estrutura transiente. Neste caso, uma vez que os peptídeos distruibuidos nas monocamadas opostas, a formação do poro é reduzida, desativando o processo. Por outro lado, o acumulo de certos peptídeos podem levar

a desintegração da membrana como um detergente, resultando na formação de micelas (via solubilização). Observa-se que a estrutura secundária do peptídeo pode variar ao longo das várias vias. A configuração em random ou em hélice são meramente ilustrativas desses processos e não devem ser interpretadas literalmente (esquema adaptado de Sengupta et al, 2008).	41
Figura 6 - Esquema simplificado do modo de ação intracelular de peptídeos antimicrobianos (modificado de Brogden, 2005)	42
Figura 7 – Esquema do sistema imune das aranhas. Processo de injúria e infecção por microrganismos. O processo de injúria e infecção das aranhas ainda não é bem conhecido e somente os componentes nas caixas tem sido detectado nos hemócitos ou hemolinfa, enquanto a via da cascata de coagulação e formação da melanina são adaptações de xiphosura (Kuhn-Nentwig , Nentwig, 2013).....	45
Figura 8 - Aranha caranguejeira <i>Acanthoscurria rondoniae</i> (Theraphosidae, Mygalomorphae).	50
Figura 9 – Detalhes da região dorsal do abdome da aranha. Punção cardíaca do vaso dorsal com a utilização de seringa apirogênica para remoção de hemolinfa....	51
Figura 10 – Relatório de síntese do Peptídeo Rondonina. Perfil cromatográfico para purificação da rondonina sintética. <i>Inset</i> : Espectrometria de massa do peptídeo	57
Figura 11 - Esquema de ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido em microplaca.	59
Figura 12 - Esquema de ensaio hemolítico em microplaca.	60
Figura 13 – Estrutura dos fosfolipídeos utilizados para a preparação das vesículas artificiais. Em POPC a região polar é zwitteriônica e em POPG a parte polar é aniônica.	62
Figura 14 – Obtenção da imagem por técnicas de Cristalografia e “cryo-EM”. Diferenças entre obtenção da imagem pelas técnicas de Cristalografia (esquerda), refração do cristal e “cryo-EM” (direita), projeção da imagem (Callaway, 2015).	70
Figura 15 - Easy Glow. A – Equipamento usado para preparar as grades negativamente; B – Ausência de corrente nas grades; C – Presença de corrente nas grades.	71

Figura 16 - Esquema de uma grade de microscopia: A grade de aproximadamente 3 mm possui cerca de 400 quadrados (square) de aproximadamente 60 μm onde cada um possui inúmeros buracos de 1 μm onde é formado um filme fino de solução contendo a amostra de interesse. Abaixo, o esquema de como foram realizadas as coletas de dados, onde em um único buraco são coletadas 5 diferentes imagens de 7 frames cada uma. As imagens coletadas nas regiões em roxo foram em baixo valores de defocus (\sim - 1.0 μm), ou seja, coleta de alta resolução. Enquanto que a região representada em verde foi coletada tanto em baixo quanto em alto defocus (\sim - 3.0 μm), o que não leva a altas resoluções mas favorece o processamento de dados (Serrao, 2015)	73
Figura 17 – Esquema geral do processamento de dados utilizado neste projeto: (modificado de www.imagescience.de/manuals/smi_2014_brazil_school.pdf)	75
Figura 18 - Fracionamento de peptídeos antimicrobianos do plasma de <i>Acanthoscurria rondoniae</i> . Frações antimicrobianas obtidas do plasma eluídas com ACN 5% analisadas numa coluna semi-preparativa Júpiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 0 a 20% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min.....	83
Figura 19 – Perfil cromatográfico da Fracção P5-1 obtido pelo espectrômetro de massas LTQ-ESI. Deconvolução do perfil de íons obtidos para determinação da possível massa molecular do peptídeo.	84
Figura 20 – Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo que mostrou similaridade com o perfil de íons.....	85
Figura 21 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. Os fragmentos assinalados em vermelho correspondem aos peptídeos encontrados na busca.....	85
Figura 22 - Perfil cromatográfico da Fracção P5-3 obtido pelo espectrômetro de massas LTQ-ESI. Deconvolução do perfil de íons obtidos para determinação da possível massa molecular do peptídeo.	86
Figura 23 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.	87

Figura 24 – Comparação da sequência de aminoácidos de “Scorpine” com peptídeos antimicrobianos cecropinas e defensinas. As sequências foram alinhadas com espaços em branco, por causa da diferença do tamanho dos peptídeos. Os segmentos com alguma sequência consensus são mostradas com espaços artificiais brancos (pontos para aumentar a similaridade) e os * representam correspondem a aminoácidos idênticos. As sequências comparadas foram: 1-cecropina B de *Antheraea pernyi* (mariposa), 2- sarcotoxina Ic de *Sarcophaga peregrina* (mosca), 3-cecropina de *Sus scrofa* (javali), 4-scorpine *Pandinus imperator*, 5- defensina de *Aeschna cyanea* (libélula), 6-defensina de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (escorpião) (Conde et al,2000).....87

Figura 25 – Alinhamento de sequência de aminoácidos de Scorpine e Scorpine-like. Peptídeos antimicrobianos isolados de veneno de escorpião. A região assinalada em vermelho corresponde ao peptídeo identificado por espectrometria de massas em nossos dados.88

Figura 26 - Fracionamento de peptídeos antimicrobianos do plasma de *Acanthoscurria rondoniae*. Frações antimicrobianas obtidas do plasma eluídas com ACN 40% analisadas numa coluna semi-preparativa Júpiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 2 a 60% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min.....89

Figura 27 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca. Resultado obtido após comparação em banco de dados da fração P40-2 esquerda e fração P40-3 a direita.90

Figura 28 - Perfil cromatográfico da Rondonina obtido pelo espectrômetro de massas LTQ-ESI. Deconvolução do perfil de íons obtidos para determinação da massa molecular do peptídeo.....90

Figura 29 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.91

Figura 30 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.92

Figura 31- Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.	93
Figura 32 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.	94
Figura 33 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.	95
Figura 34 - Fracionamento de peptídeos antimicrobianos do plasma de <i>Acanthoscurria rondoniae</i> . Frações antimicrobianas obtidas do plasma eluídas com ACN 80% analisadas numa coluna semi-preparativa Júpiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 20 a 80% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min.....	96
Figura 35 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.	97
Figura 36 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.	98
Figura 37 – Ensaio de citotoxicidade contra eritrócitos humanos. Avaliação dos peptídeos antimicrobianos contra eritrócitos humanos.	100
Figura 38 – Ensaio de citotoxicidade em linhagem celular HeLa. A fração P5-3 foi avaliada em linhagem celular HeLa. A- somente células, B-células com cristal de formazan (MTT), C- células com a fração P5-3, D- células com a fração P5-3 após MTT.....	101
Figura 39 – Ensaio de citotoxicidade em linhagem celular Y1. A fração P5-3 foi avaliada em linhagem celular Y1. A- somente células, B-células com cristal de formazan (MTT), C- células com a fração P5-3, D- células com a fração P5-3 após MTT.....	102
Figura 40 – Microscopia Eletrônica de Transmissão. A) Presença de estruturas 4X6 mer da hemocianina de <i>Acanthoscurria rondoniae</i> (aumento de 150k) coradas por	

“negative stain” com 2% de acetato de uranila . B) Estrutura 4x6 mer vista superior (Markl, Decker, 1992) C) Estrutura 4x6 mer vista a 45° (Markl, Decker, 1992) D) As diferentes cores se referem às diferentes subunidades: a - verde; b - cinza; c - marron; d - amarelo; e - rosa; f - azul; g – vermelho (Voit et al, 2000). A seta preta indica a vista lateral.....	104
Figura 41 – Micrografia obtida pela técnica de crio microscopia. Os retângulos representam algumas partículas distribuídas no gelo.	106
Figura 42 – Obtenção automática das partículas baseado na variância. A figura da esquerda corresponde a micrografia obtida diretamente do microscópio já a da esquerda representada com os pontos vermelhos as partículas recortadas.	107
Figura 43 – Classes obtidas pela classificação automática das partículas	107
Figura 44 – O primeiro 3D baseado no conjunto de dados obtidos no LNNano mostra alto nível de ruído de alta frequência.	108
Figura 45 – O primeiro 3D após aplicar um filtro de baixa frequência para eliminar o ruído de alta frequência.....	108
Figura 46 – Histogramas utilizados para seleção dos filmes. A região rosa representa os filmes selecionados pela média da densidade (esquerda) e sigma (direita).....	109
Figura 47 – Correção da câmera a posteriori. Utilizando normalização através dos valores de média de densidade (esquerda) e sigma (direita) , foi possível corrigir as imperfeições da câmera. A soma total da média de densidade mostra pontos que são decorrentes de pixels danificados com o passar do tempo. A soma total de sigma das imagens revela algumas faixas com variação nos valores esperados. Abaixo, é apresentada a estatística média de densidade e de sigma para esse conjunto de dados. O retângulo vermelho refere-se a área selecionada.	110
Figura 48 - Comparativo de bons e maus ajustes de CTF. As duas imagens superiores mostram que as curvas teóricas se ajustam com as amplitudes encontradas no conjunto de dados, sendo esse o padrão de imagens selecionadas para o processamento do conjunto de dados. Por outro lado, os dados representados na parte inferior da figura mostram que não há ajuste entre a predição teórica e determinada experimentalmente, correspondendo ao um mau ajuste de CTF.	111

Figura 49 - Obtenção automática das partículas baseado na variância. Os pontos vermelhos representam as partículas recortadas das micrografias.	112
Figura 50 – Histograma utilizado para seleção de partículas. A região marcada em rosa representa as partículas selecionada para próxima etapa do processamento.	113
Figura 51 – Algumas partículas obtidas pelo “particle picking.....	113
Figura 52 – Primeiras 30 Eigenimages que representam o conjunto de dados.	114
Figura 53 – Classes geradas pelo primeiro ciclo de classificação (MSA). Classes usadas como referencia para outro ciclo de obtenção de partículas.....	114
Figura 54 - Obtenção automática das partículas baseado na variância por CCF. Os pontos vermelhos representam as partículas recortadas das micrografias.....	115
Figura 55 – Histograma para seleção de partículas. Os histogramas foram utilizando para selecionar as partículas, a região rosa (esquerda) corresponde as partículas selecionadas e a região amarela (direita) corresponde as partículas inativas.	116
Figura 56 – Primeiras 30 eigenimages do novo ciclo de MSA.	117
Figura 57 – Primeiras classes obtidas após seleção por qualidade.	117
Figura 58 – Classes usadas para primeira reconstituição angular.	118
Figura 59 – Reprojeções usadas como referências para todas as classes.....	118
Figura 60 – Primeiro 3D obtido com todas as classes.	119
Figura 61 – O último 3D obtido com as classes de alto defocus (-3 μ m). Modelo 3D da hemocianina visualizado pelo programa Chimera. Vista superior (esquerda) e vista lateral (direita).	119
Figura 62 – Reprojeções do ultimo 3D usado para novo ciclo de obtenção de partículas.....	120
Figura 63 – Obtenção de Partículas automatizada com os pares de defocus para validação. O filme da esquerda corresponde ao alto defocus -3 μ m e a da direita corresponde a de alta resolução -1 μ m. Os pontos vermelhos correspondem as partículas recortadas. Como podemos ver as mesmas partículas foram recortadas nos dois filmes.....	120

Figura 64 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Amostras de Hemocianina reduzidas ou não reduzidas após tratamento com tampão de dissociação.	123
Figura 65 – Eletroforese bidimensional da hemocianina pH 3 a pH 10.	124
Figura 66 – Eletroforese bidimensional da hemocianina pH 4 a pH 7.	126
Figura 67 - Alinhamento das subunidades da hemocianina da aranha caranguejeira <i>Acanthoscurria rondoniae</i> com as subunidades da aranha <i>Aphonopelma hentzi</i> . As análises foram realizadas utilizando a ferramenta ClustalX no programa jalview. As regiões em azul representam as regiões conservadas entre elas (Hc* – <i>A. rondoniae</i> , HCY* – <i>A. hentzi</i>).	128
Figura 68 – Alinhamento das sete subunidades da hemocianina da aranha caranguejeira <i>Acanthoscurria rondoniae</i> . As análises foram realizadas utilizando a ferramenta ClustalX no programa jalview. As regiões coloridas representam as regiões conservadas entre elas.	129
Figura 69 – Nível de expressão da hemocianina em relação ao transcriptoma obtido a partir dos hemócitos de <i>Acanthoscurria rondoniae</i>	130
Figura 70 – Nível de expressão das subunidades da hemocianina de <i>Acanthoscurria rondoniae</i>	131
Figura 71 – “Acid-Urea” PAGE 20% – Processamento da Hemocianina para formação de peptídeos antimicrobianos em diferentes intervalos de tempo.	136
Figura 72 – Peptídeo Rondonina nativo – isolado a partir de cromatografia líquida de alta eficiência.	137
Figura 73 - Peptídeo Rondonina sintético.	137
Figura 74 – Perfil cromatográfico do processamento da rondonina.	138
Figura 75 – Atividade enzimática de hemócitos. Avaliação da presença de enzimas nos hemócitos utilizando a hemocianina como substrato. SDS- PAGE 12% na presença de agentes redutores.	139
Figura 76 – Zimografia em gel de poliacrilamida 12%. Os géis foram copolimerizado com gelatina (A) e caseína (B). LMW – marcador de peso molecular. ARH – Hemócitos VJ – veneno de jararaca.	140

Figura 77 - Perfil cromatográfico Plasma. Cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna Júpiter semi-preparativa C18 em gradiente linear de 10 a 40% de acetonitrila em água acidificada em 30 minutos num fluxo de 1,5 ml por minuto...	141
Figura 78 - Perfil cromatográfico Plasma incubado com coquetel de inibidores enzimáticos. Cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna Júpiter semi-preparativa C18 em gradiente linear de 10 a 40% de acetonitrila em água acidificada em 30 minutos num fluxo de 1,5 ml por minuto.....	142
Figura 79 - Perfil cromatográfico Plasma incubado com inibidor enzimático E64. Cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna Júpiter semi-preparativa C18 em gradiente linear de 10 a 40% de acetonitrila em água acidificada em 30 minutos num fluxo de 1,5 ml por minuto.....	143
Figura 80 – Perfil cromatográfico do peptídeo Rondonina sintético. Cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna Júpiter semi-preparativa C18 em gradiente linear de 10 a 40% de acetonitrila em água acidificada em 30 minutos num fluxo de 1,5 ml por minuto.	143
Figura 81 - Perfil cromatográfico Plasma incubado com hemócitos. Cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna Júpiter semi-preparativa C18 em gradiente linear de 10 a 40% de acetonitrila em água acidificada em 30 minutos num fluxo de 1,5 ml por minuto.	144
Figura 82 - Perfil cromatográfico Plasma incubado com hemócitos e coquetel de inibidores enzimáticos. Cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna Júpiter semi-preparativa C18 em gradiente linear de 10 a 40% de acetonitrila em água acidificada em 30 minutos num fluxo de 1,5 ml por minuto.	145
Figura 83 - Perfil cromatográfico Plasma incubado com hemócitos e o inibidor enzimático E64. Cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna Júpiter semi-preparativa C18 em gradiente linear de 10 a 40% de acetonitrila em água acidificada em 30 minutos num fluxo de 1,5 ml por minuto.	146
Figura 84 – Sequência da glutamyl aminopeptidase presente no transcriptoma de hemócitos de <i>A. rondoniae</i>	147
Figura 85 – Interação do peptídeo rondonina com membranas artificiais lipídicas POPC em diferentes pH.....	150

Figura 86 – Interação do peptídeo rondonina com membranas artificiais lipídicas POPC: POPG 7:3 em diferentes pH (diferenças entre 0 e 1 é considerado como sem interação).	151
Figura 87 – Gel de agarose 0.8% de DNA genômico de <i>C. albicans</i> . 1 –LMW, 2 – Controle, 3 – 12 µg 4- 6,2 µg, 5 – 4,9 µg, 6 – 3,7 µg, 7- 2,4 µg, 8 – 1,2 µg.....	152
Figura 88 - Gel de agarose 0.8% de DNA genômico de <i>E. coli</i> e <i>M. luteus</i> . 1 – Controle <i>E. coli</i> , 2- 6,2 µg, 3- 4,9 µg, 4 - 3,7 µg, 5- 2,4 µg, 6 - 1,2 µg, 7- controle <i>M. luteus</i> , 8 - 6,2 µg, 9 - 4,9 µg, 10 - 3,7 µg, 11 - 2,4 µg, 12 - 1,2 µg.	152
Figura 89 - Gel de agarose 0.8% de RNA total de <i>C. albicans</i> . 1 - Controle, 2 - 6,2 µg, 3 – 4,9 µg, 4 - 3,7 µg, 5 - 2,4 µg, 6 - 1,2 µg.	153
Figura 90 – Eletroforese capilar para avaliação do mRNA de <i>C. albicans</i>	153
Figura 91 – Células MDCK infectadas com vírus do sarampo. As placas foram observadas diariamente para verificar o aparecimento do efeito citopático. As placas foram observadas em microscópio óptico invertido e fotografadas antes da coloração por cristal de violeta.	156
Figura 92 – Células VERO infectadas com vírus da influenza. As placas foram observadas diariamente para verificar o aparecimento do efeito citopático. As placas foram observadas em microscópio óptico invertido e fotografadas antes da coloração por cristal de violeta.	156
Figura 93 – Células L929 infectadas com vírus EMC. As placas foram observadas diariamente para verificar o aparecimento do efeito citopático. As placas foram observadas em microscópio óptico invertido e fotografadas antes da coloração por cristal de violeta.....	157

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Tabela de atividade antimicrobiana do 5%, concentração e busca em banco de dados das frações obtidas após purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. (nd – não detectado).....	84
Tabela 2 - Tabela de atividade antimicrobiana do 40%, concentração e busca em banco de dados das frações obtidas após purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. (nd – não detectado; * íons duplicados).....	88
Tabela 3 – Tabela de atividade antimicrobiana do 80%, concentração e busca em banco de dados das frações obtidas após purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	95
Tabela 4 – Análise das frações antimicrobianas em banco de dados.....	99
Tabela 5 – Análise de bioinformática - Busca em banco de dados das bandas recortadas e tratadas (ND não detectado)	123
Tabela 6 - Análise de bioinformática - Busca em banco de dados dos spots recortados e tratados.	125
Tabela 7 – Análise das subunidades com a ferramenta expasy.	126
Tabela 8 – Identificação dos contigs. <i>Contigs</i> montados referentes as subunidades de hemocianina	127
Tabela 9 – Atividade antifúngica do peptídeo rondonina. Avaliação da concentração mínima inibitória do peptídeo rondonina com concentração inicial de 200µM. (ND – não detectada na concentração testada)	132
Tabela 10 – Atividade antifúngica da rondonina pH dependente. Avaliação da concentração mínima inibitória do peptídeo rondonina em diferentes pH.....	135
Tabela 11 – Concentração Mínima Inibitória (CIM) da rondonina, gomesina e a combinação entre eles.	148
Tabela 12 – Teste de viabilidade celular. Diluição seriada do peptídeo rondonina avaliado contra duas linhagens celulares tumorais.....	155

Lista de abreviaturas

Sigla	Descrição
3D	Tridimensional
ACN	Acetonitrila
AF	Ácido Fórmico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Soro albumina bovina
CCF	<i>Cross-correlation function</i>
CID	<i>collision induced dissociation</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração mínima inibitória
cryo-EM	Microscopia eletrônica criogênica
CTF	<i>Contrast Transfer Function</i>
Cu	cobre
DDA	<i>Data dependent acquisition</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxiribonucleico
DTT	Ditiotreitol
E64	<i>([N-(trans-Epoxy succinyl)-leucine 4-guanidinobutylamide]</i>
EBV	<i>Epstein Barr virus</i>
ECV	Efeito citopático viral
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESI-Q-ToF/MS	<i>Eletrospray ionization-quadrupole-time of flight/mass spectrometry</i>
FEG	<i>Field-Emission Gun</i>
FPKM	<i>Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped</i>
FR-CLAE	Fase Reversa- Cromatografia Líquida de alta eficiência
Hc	Hemocianina

HeLA	Henrietta Lacks
IAA	Iodoacetamida
IFI	Índice de fração inibitória
KCL	Cloreto de potássio
kDa	kilodalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
LB	Lúria-Bertani
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
LTQ	<i>Linear Ion Trap Mass Spectrometer</i>
LUV	Vesículas Unilamelares Grandes
M	molar
m/z	massa/carga
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>
mM	milimolar
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MRA	<i>Multireference alignment</i>
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
MSA	<i>Multivariate Statistical Analysis</i>
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NK	<i>Natural Killer</i>
NaOAc	Acetato de Sódio
nm	nanomêtro
ORF	<i>open reading frame</i>
PAM	Peptídeos Antimicrobianos
PB	<i>Poor Broth</i>
PBS	Tampão Fosfato Salina
PBSA	Solução tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio.
PDB	<i>Potato Dextrose Broth</i>

POPC	fosfolipídios 1-palmitoil-2oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoclina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero3-[fosfo- <i>rac</i> -(1-glicerol)]
RNA	ácido ribonucleico
RSEM	<i>RNA-Seq Expectation Maximization</i>
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SFB	soro fetal bovino
TAE	Tampão Ácido Ácético EDTA
TFA	ácido trifluoacético
TSV	<i>Taura syndrome virus</i>
VERO	Células epiteliais de rins de macaco <i>Cercopithecus aethiops</i>
WSSV	<i>white spot syndrome virus</i>
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar

Lista de Símbolos
Aminoácidos

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	32
2 OBJETIVOS	49
2.1 Objetivo Geral	49
2.2 Objetivos específicos	49
3 MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1 Animais e Coleta de Hemolinfa	50
3.2 Extração e Purificação de Peptídeos Antimicrobianos do Plasma	51
3.3 Caracterização Estrutural	52
3.3.1 Espectrometria de Massas	52
3.3.2 Digestões enzimáticas	54
3.3.2.1 Digestão “in solução”	54
3.3.2.2 Digestão in gel.....	54
3.3.2.3 Análise Bioinformática	56
3.3.2.4 Síntese do Peptídeo Rondonina.....	56
3.4 Bioensaios	57
3.4.1 Microrganismos	57
3.4.2 Atividade Antimicrobiana	58
3.4.5 Ensaio Hemolítico	59
3.4.6 Atividade Biológica de Rondonina	60
3.4.6.1 Avaliação da Atividade antifúngica da Rondonina em combinação com Gomesina	60
3.4.6.2 Atividade Antifúngica pH dependente.....	61
3.4.6.3 Interação com Membranas Artificiais Lipídicas	61
3.4.6.3.1 <i>Preparação das membranas modelos – Vesículas Unilamelares Grandes</i> (LUV).....	62
3.4.6.3.2 <i>Titulação da Rondonina com LUVs</i>	62
3.4.6.4 Mecanismo de Ação do Peptídeo Rondonina	63
3.4.6.4.1 <i>Extração de DNA</i>	63
3.4.6.4.2 <i>Extração de RNA total da levedura Candida albicans MDM8</i>	64
3.4.6.4.3 <i>Extração de mRNA da levedura Candida albicans MDM8</i>	64
3.4.6.4.4 <i>Ensaio de retardo de migração DNA/RNA em gel agarose</i>	65
3.4.6.4.5 <i>Ensaio de retardo de migração mRNA em eletroforese capilar</i>	65

3.4.7 Avaliação da Atividade Citotóxica da Rondonina	65
3.4.7.1 Citotoxicidade	65
3.4.7.2 Atividade Antitumoral.....	65
3.4.7.2.1 <i>Linhagens celulares</i>	66
3.4.7.2.2 <i>Manutenção das linhagens celulares</i>	66
3.4.7.2.3 <i>Ensaio colorimétrico MTT para avaliação de citotoxicidade</i>	67
3.4.7.3 Atividade Antiviral	67
3.5 Hemocianina	68
3.5.1 Transcriptoma	68
3.5.1.1 Extração de RNA, construção da biblioteca e sequenciamento	68
3.5.1.2 Bioinformática: montagem e anotação dos contigs	68
3.5.1.3 Sequenciamento das subunidades da Hemocianina.....	69
3.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	70
3.5.2.1 Análise por contraste negativo (negative stain)	70
3.5.2.2 Análise por microscopia criogênica	71
3.5.2.2.1 <i>Preparo de amostra da Hemocianina</i>	71
3.5.2.2.2 <i>Preparo de Amostra no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano – CNPEM – Campinas SP)</i>	72
3.5.2.2.3 <i>Aquisição de dados LNNano</i>	72
3.5.2.2.4 <i>Aquisição de dados NeCEN</i>	72
3.5.2.2.5 <i>Processamento de dados</i>	74
3.5.3 Purificação da Hemocianina	76
3.5.3.1 Quantificação da Hemocianina.....	76
3.5.3.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	76
3.5.3.3 Eletroforese Bidimensional da Hemocianina	77
3.4.7 – Processamento da Rondonina	78
3.4.7.1 Processamento da Rondonina a partir do Plasma	78
3.4.7.2 Extração do conteúdo dos hemócitos.....	78
3.4.7.3 Atividade enzimática dos Hemócitos na Hemocianina	79
3.4.7.4 Zimografia em gel de poliacrilamida copolimerizado com gelatina.....	79
3.4.7.5 Zimografia em gel de poliacrilamida copolimerizado com caseína.....	80
3.4.7.6 Produção da rondonina e envolvimento dos hemócitos	80
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.1 Peptídeos Antimicrobianos do Plasma	82

4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão da Hemocianina.....	103
4.3 Hemocianina	121
4.4 Rondonina.....	131
4.4.1 Atividade Antifúngica.....	131
4.4.2 Atividade Antifúngica pH Dependente	133
4.4.3 Processamento da Hemocianina	135
4.4.4 Avaliação da atividade antifúngica – Rondonina x Gomesina	147
4.4.5 Interação com membranas artificiais lipídicas	148
4.4.6 Interação com material genético.....	151
4.4.7 Citotoxicidade.....	154
4.4.8 Atividade Antiviral	155
5 CONCLUSÕES	159
REFERÊNCIAS*	160

1 INTRODUÇÃO

Todos os organismos multicelulares dependem de um sistema de defesa para sua sobrevivência. Historicamente, o sistema imunológico está dividido em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata representa uma resposta rápida e apresenta um grande número, porém limitado, de estímulos. Está representada por barreiras físico-químicas e biológicas, ativação de células especializadas, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* – NK e moléculas solúveis que podem estar relacionadas com ativação enzimáticas, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, assim como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (Boehm, 2012; Medzhitov et al., 1997; Medzhitov, Janeway, 2000).

Por outro lado, a imunidade adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos e células apresentadoras de antígenos, e das moléculas por eles produzidas. As principais características da resposta imune adquirida são especificidade, que é caracterizada pela variabilidade de seus receptores e memória imunológica e diversidade de reconhecimento, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo (Cruse, Lewis, 2009; Delves, Roitt, 2000).

Nos vertebrados encontramos tanto a resposta imune inata quanto à adaptativa, Mamíferos, pássaros, reptéis, anfíbios, peixes ósseos e cartilagosos possuem células do sistema adaptativo de dois tipos: células T e células B. Ambas as células expressam receptores da família de imunoglobulinas (Litman et al., 1999). Essa memória imunológica de células antígeno-específicas disponibiliza em vertebrados uma resposta imune mais rápida e mais efetiva depois de repetidos estímulos do sistema imune pelo mesmo e/ou patógeno relacionado (Bulet et al., 2004; Franco et al., 2006; Lie, Heyneman 1979; Pelegrini, Franco, 2005).

Nos invertebrados, a defesa é muito semelhante à imunidade inata dos vertebrados, reconhecida como um mecanismo mais primitivo e foi conservada ao longo da evolução, sendo que atualmente é encontrada em todos os representantes do reino animal (Hancock et al., 2006) (Figura 1). Os insetos são considerados o grupo mais bem estudado. Após o rompimento da barreira físico-química constituída pela cutícula e invasão dos microrganismos, o sistema é ativado. A ativação desse sistema é mediada por fatores presentes na hemolinfa, que é composta por células

(os hemócitos) e pelo plasma (fluido rico em proteínas, aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, hormônios e íons). Desta forma, a resposta imune dos invertebrados consiste em reações celulares como a fagocitose, encapsulação e/ou formação de nódulos, e de reações humorais incluindo as cascatas de serina proteinases que participam da coagulação e da melanização, além da produção de intermediários reativos de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e peptídeos antimicrobianos (PAMs) (Ratcliffe, Whitten, 2004).

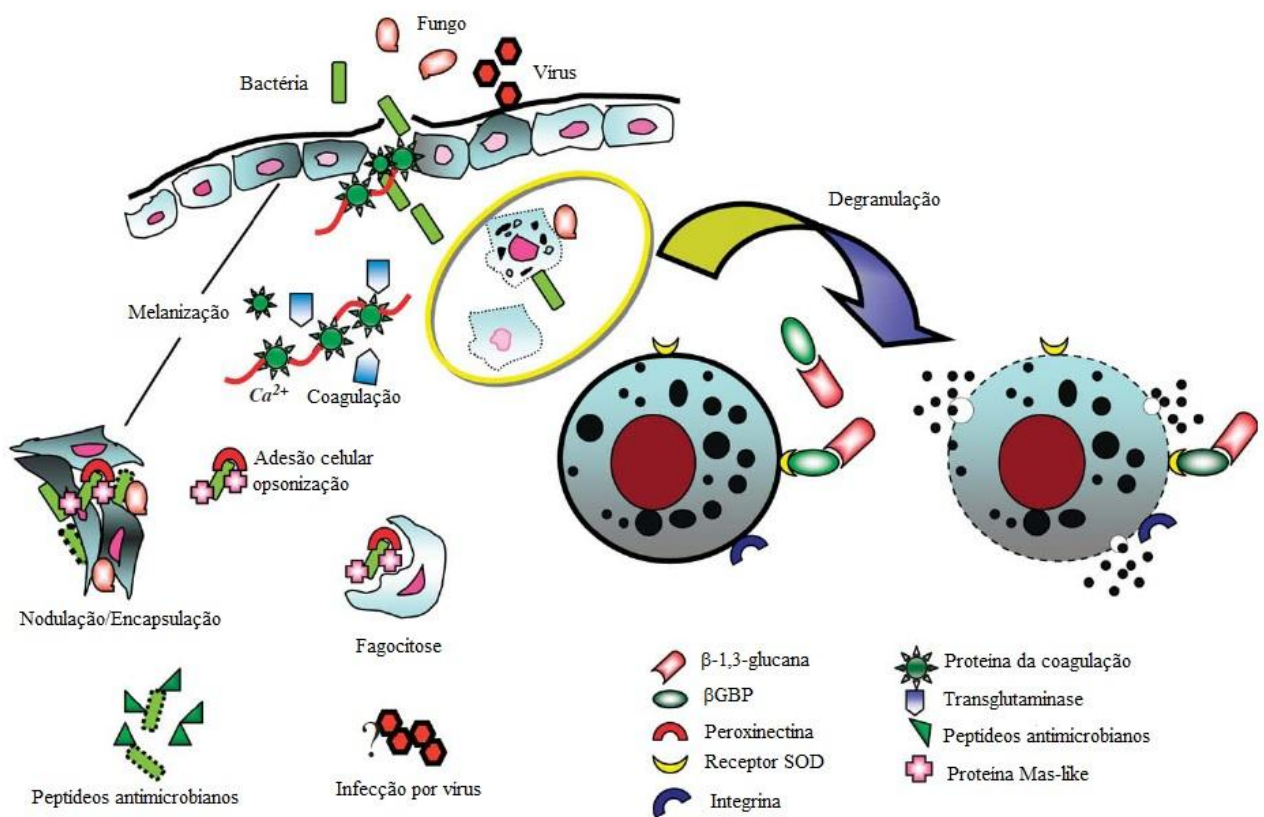


Figura 1 – Esquema representativo do sistema imune de artrópodes. Uma vez que patógenos entram na hemocele do hospedeiro, eles devem encontrar um mecanismo complexo de defesa do sistema imune inato (modificado de Jiravanichpaisal et al., 2006).

Entretanto, a imunidade natural é muito mais comum, e entre suas respostas, incluem-se componentes cruciais como fenóis, substâncias secundárias e peptídeos antimicrobianos (PAMs) (Frecher et al., 2006; Thomma et al., 2002).

Em insetos uma memória imunológica patógeno-específico foi demonstrado, em abelhas *Bombus terrestris* (Sadd, Schmid-Hempel, 2006), moscas *Drosophila melanogaster* (Pham et al., 2007) e no besouro *Tribolium castaneum* (Roth et

al.,2009). Além disso, outros estudos também indicaram que algum tipo de memória imunológica pode persistir através de sucessivas metamorfoses presentes no ciclo de vida dos insetos (Thomas, Rudolf, 2010). No molusco, *Biomphalaria glabrata*, foi verificado que este caramujo pode se tornar resistente a infecção por trematódeos através de sua sensibilização por trematódeos homólogos atenuados (Hanington et al.,2010).

Os artrópodes são animais com ampla distribuição e adaptados a sobreviver em quase todos os ambientes. Sua sobrevivência e a enorme diversidade devem-se à adaptação a diferentes ambientes, às vantagens na competição com outras espécies, à excepcional capacidade reprodutora, à eficiência na execução de suas funções e à resistência a substâncias tóxicas. A conquista de diferentes hábitat provavelmente esta relacionada também à capacidade de se defenderem contra diversos tipos de microrganismos e parasitas, pois muitos artrópodes vivem em ambientes onde esses microrganismos são abundantes. É, portanto, evidente que esses invertebrados devam possuir um sistema imunológico eficiente para combater esses microrganismos perigosamente potentes (Barraviera, 1994).

O sistema imune inato dos invertebrados é separado em reações celulares e humorais. Nas reações celulares os microrganismos, células apoptóticas, a remoção de debris celulares e a remodelagem de tecidos danificados são importantes papéis da fagocitose, os microrganismos também podem ser aprisionados pela formação do nódulo ou encapsulação pelos hemócitos. No processo de defesa humoral três reações são desencadeadas: melanização, coagulação da hemolinfa e a síntese e/ou liberação de peptídeos antimicrobianos (Fukuzawa et al.,2008; Vilmos, Kurucz, 1998).

Em aranhas, como em outros artrópodes, os animais precisam reagir a injúrias de maneiras combinadas para evitar a perda de fluídos e se defender de patógenos invasores. Sendo assim, os hemócitos circulantes na hemolinfa, que pode ser considerada como um órgão multifuncional, responsável pela locomoção (Kropf, 2013), respiração (Burmester, 2013) e nutrição, após uma injúria, migram para o local da infecção. Chegando ao local podem fagocitar, formar nódulos para aprisionar microrganismos (nodulação) e formar cápsulas para aprisionar patógenos maiores (encapsulação). Os hemócitos também liberam componentes da cascata de

coagulação e peptídeos antimicrobianos para eliminar os microrganismos invasores (Fukuzawa et al.,2008).

A cascata de coagulação é desencadeada por padrões moleculares associados ao patógeno resultando numa cascata proteolítica e a coagulação da hemolinfa (Iwanaga, Lee, 2005). Componentes da parede fúngica ou parede celular bacteriana (β -1,3-glucana e lipopolissacarídeo, respectivamente) iniciam a cascata em limulídeos, onde todos os componentes são liberados pela degranulação dos hemócitos. Esse processo se caracteriza pela conversão do coagulogênio em homopolímeros não-covalentes de coagulina (Osaki, Kawabata, 2004). Alguns componentes da cascata de coagulação também foram identificados em aranhas (Iwanaga, Lee, 2005; Kuhn-Nentwig, Nentwig, 2013; Lorenzini et al.,2006).

Nos artrópodes em geral, a atividade de fenoloxidase segue o mesmo padrão de reconhecimento para a cascata de coagulação. Poucos minutos após a infecção, a melanina, formada pela ativação da fenoloxidase através da profenoloxidase por serino proteases que é tóxica para microrganismos, é depositada tanto na superfície do patógeno ou dentro da cápsula formada, sendo esse processo chamado melanização (Iwanaga, Lee, 2005; Sördehäll, Cerenius, 1998).

Em algumas reações de defesa, uma série de substâncias que estão presentes em pequenas quantidades na hemolinfa ou que aparecem somente no curso de uma infecção, tem sua síntese estimulada. Essas substâncias estão envolvidas no reconhecimento, na mediação da resposta imune-celular ou na ação direta antimicrobiana. Entre estas substâncias, as mais estudadas são as lectinas, hemolina e os peptídeos e as proteínas antimicrobianas (Andreu, Rivas, 1998; Daffre, Faye, 1997; Kawabata, Imanaga, 1999; Mendonza, Faye, 1999; Sun et al., 1990; Wilson et al., 1999).

As lectinas são proteínas com afinidades por carboidratos estão relacionadas a vários fenômenos de reconhecimento celular, incluindo adesão a hemócitos e microrganismos. Desempenham assim, um importante papel na imunidade dos artrópodes, funcionando como aderirem aos organismos invasores (Borneman, Lowrie, 1998).

A hemolina está presente na hemolinfa de *Hyalophora cecropia* e *Manduca sexta* também está relacionada com o reconhecimento dos LPS pelo lipídio A (Daffre, Faye, 1997), ligando-se à superfície das bactérias e, também, dos

hemócitos, constituindo um fator de opsonização que participa na formação de um complexo proteico que, ao tudo indica, iniciador da fagocitose. (Andersson, Steiner, 1987; Sun et al., 1990; Su et al., 1998; Wang et al., 1995; Zao, Kanost, 1996). Esta proteína não apresenta atividade antimicrobiana e foi verificada que pertence a superfamília das imunoglobulinas. A esta família também pertencem às moléculas que funcionam como anticorpos em vertebrados e várias proteínas envolvidas em adesão celular (Faye, Hultmark, 1993).

Na hemolinfa dos artrópodes também encontramos livremente dissolvidas as hemocianinas que são grandes proteínas respiratória alostéricas que são constituídas de múltiplos hexâmeros onde cada hexâmero é feito por monômeros de aproximadamente 75 kDa (Figura 2) (van Holde et al., 2001).

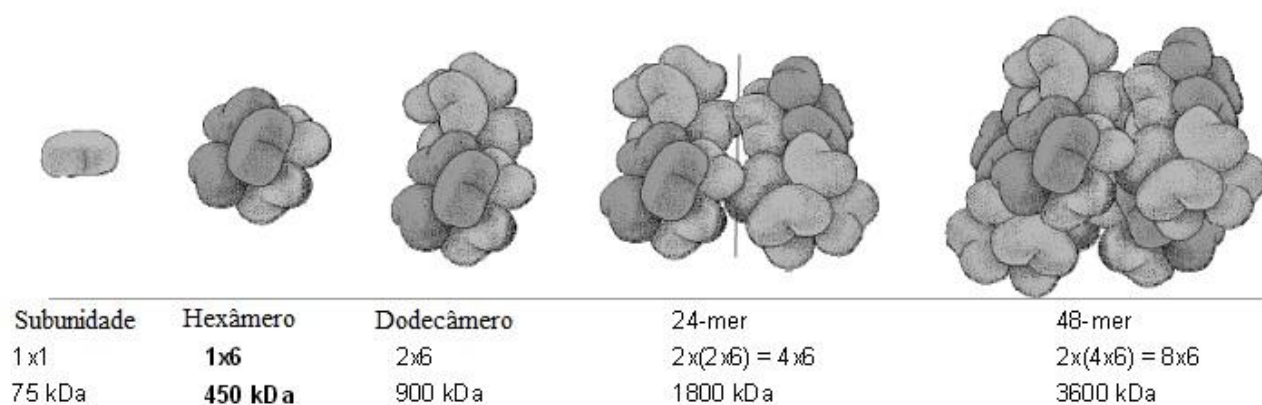


Figura 2 – Estrutura básica da hemocianina dos Chelicerata. Hemocianina construída hierarquicamente $2n$ ($n = 0, 1, 2, 3$) em hexâmeros.

O sítio de transporte de oxigênio envolve um par de átomos de cobre, no qual o estado Cu (I) está na forma desoxigenada, mas torna-se Cu (II) após oxigenação. Isso explica a mudança para a cor azul após a oxigenação (Cuff et al., 1998; Magnus et al., 1994). Essas ligações com oxigênio são coordenadas pelo cobre através de seis resíduos de histidina (Cuff et al., 1998; van Holde, et al., 1995).

A hemocianina da tarântula norte americana *Aphonopelma hentzi* (Figura 3) é um complexo de proteínas nativas de 24-mer constituindo de dois dodecameros idênticos com uma massa molecular total estimada em cerca de 1.800 kDa (Markl et al, 1979, 1980, 1986; Shneider et al, 1977). A formação do complexo 24 mer exige a agregação de sete tipos diferentes de subunidades na mesma quantidade com quatro cópias de cada uma das subunidades a, d, e, f, g, e duas cópias da subunidade b, c (a estequiometria do 24-mer é 4a, 2b, 2c, 4d, 4e, 4f e 4g). As sete

subunidades são necessárias para a formação de um 4 x 6 mer completo e estável. Este é formado por 2 x 6 mer idênticos com estequiometria 2a,1b, 1c, 2d, 2e, 2f e 2g. Os dois hexâmeros constituintes do 2 x 6 mer são diferentes, pois um deles possui a subunidade b enquanto o outro possui a subunidade c. Estas duas subunidades possuem uma forte associação, formando um heterodímero que exerce um importante papel na estabilização do complexo. Esta ligação não só estabiliza a associação entre os dois hexâmeros de cada 2 x 6 mer, como também é responsável pela formação de uma ligação central entre os 2 x 6 mer que formam o 4 x 6 mer. As diferentes subunidades são necessárias não só para a estabilização do complexo, como também para o seu correto funcionamento (Markl, 1981, 1986).

Além do seu papel como carregadora de oxigênio, a hemocianina aparece como uma proteína multifuncional, pois também está envolvida na osmorregulação, estoque de proteínas e algumas reações imunes (Decker, Jeanicke, 2004). Em chelicerados, ao contrário de outros artrópodes, não apresentam uma fenoloxidase verdadeira, neste caso, a região N-terminal da hemocianina foi sugerida por ter atividade de fenoloxidase após clivagem proteolítica (Decker, Rimke, 1998; Nagai, Kawabata, 2000). O sistema profenoloxidase (ou sistema proPO) envolve uma cascata complexa na qual compostos fenólicos são oxidados e muitas moléculas tóxicas (quinonas e espécies reativas de oxigênio) são geradas em resposta a infecção microbiana (Cerenius et al, 2008; Cerenius, Soderhall, 2004).

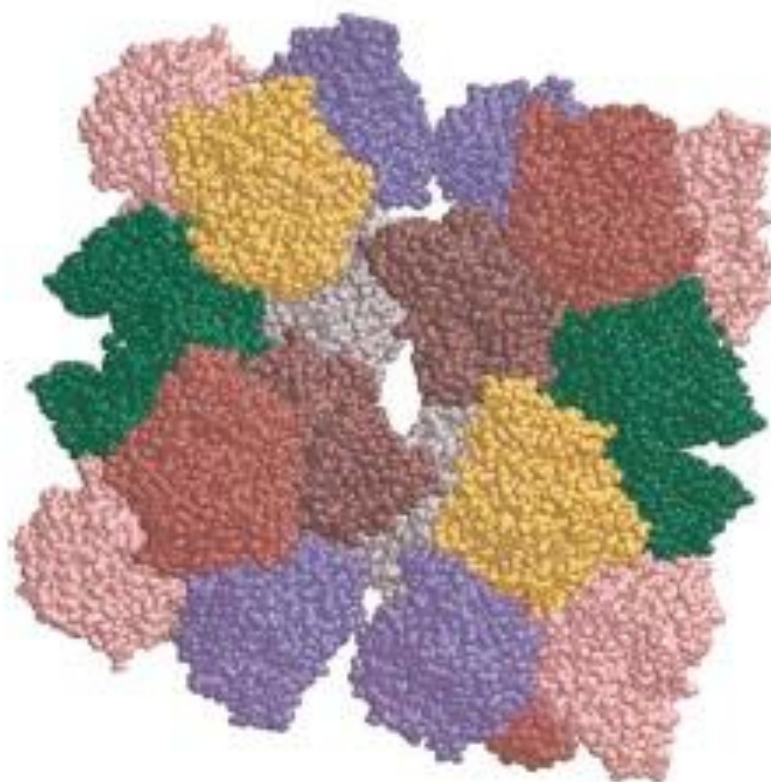


Figura 3 - Estrutura 24-mer da Hemocianina da tarântula *A. hentzi*. As diferentes cores se referem as diferentes subunidades: a -verde; b - cinza; c - marron; d - amarelo; e - rosa; f - azul; g – vermelho (Voit et al, 2000).

Os PAMs são convencionalmente descritos como moléculas anfipáticas e catiônicas, compostas de 12 a 45 resíduos de aminoácidos e codificadas por genes, diferentemente dos anticorpos, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) por serem simples produtos da transcrição e tradução gênica podem ser rapidamente sintetizados após a infecção, com um gasto limitado de energia e biomassa (Bulet et al., 2004; Boman et al., 2003; Pelegrini, Franco, 2005; Thomma et al., 2002), mais já há evidências de que outros PAMs ou polipeptídios possam se originar de várias outras fontes, tais como de hidrólises de proteínas inativas (Bachère et al., 2004).

A geração de peptídeos biologicamente ativos e polipeptídeos (criptídeos) ou proteínas (cripteínas) pela clivagem de uma proteína precursora é um fenômeno comum que ocorre em toda a natureza, de vírus até humanos (Ng, Ilag, 2006). Há muitos exemplos ilustrando que um ou mais fragmento(s) peptídico(s) clivado(s) proteoliticamente pode ser derivado de uma única proteína precursora, e esses peptídeos geralmente mostram atividades que são diferentes da molécula precursora. Em muitos casos, essa atividade biológica divergente são crípticas e não

podem ser previstas a partir de qualquer sequência de amino ácidos ou a atividade da proteína precursora. Esses peptídeos e/ou polipeptídeos são classificados como cripteínas e a proposta que muitas classes de cripteínas existem, tanto como fragmentos processados naturalmente ou, alternadamente, como o resultado de uma clivagem proteolítica artificial. Eles são divididos em três classes: Tipo 1: são produzidos quando uma proteína precursora é naturalmente clivada por uma ou mais proteases para gerar um peptídeo ou um grupo de peptídeos com novas bioatividades que são distintas da proteína precursora; Tipo 2: são fragmentos naturalmente liberados da proteína precursora que ou mantém a original ou a bioatividade relacionada com a molécula precursora; Tipo 3: fragmentos de proteínas-peptídeos gerados *in vitro* com novas bioatividades. Fragmentos idênticos ou similares podem não ser necessariamente gerados naturalmente (Autelitano et al., 2006).

O principal modo de ação dessas moléculas é por meio do aumento da permeabilidade da membrana plasmática. Inicialmente há uma interseção eletrostática entre o PAM positivamente carregado e os componentes da membrana dos microrganismos, carregados negativamente. Posteriormente, as interações entre a porção apolar da membrana das células e os resíduos hidrofóbicos dos PAMs culminam na permeabilização das membranas (Silva Jr, 2000).

Com relação à ruptura da membrana plasmática foram propostos quatro modos de ação (Figura 4): 1 - Modelo “barrel-stave” – Neste, os PAMs anfipáticos, α -hélice, após interação eletrostática com a face externa da membrana bacteriana, formam poros do tipo barril, aonde a porção apolar do peptídeo interage com a porção hidrofóbica dos fosfolipídios da membrana e a região hidrofílica do peptídeo fica voltada para dentro do poro. O vazamento do conteúdo intracelular através destes poros pode levar a morte celular. A alameticina é um exemplo de PAM que induz este tipo de poro 2 - Modelo “carpet” – a membrana da bactéria é totalmente coberta pelo peptídeo. Quando uma concentração crítica é atingida, os peptídeos danificam a membrana de modo semelhante ao dos detergentes, com a desintegração e formação de micelas, o que leva a morte da bactéria. A ovispirina é um exemplo de PAM com este tipo de ação; 3 - Formação de poro toroidal – Após a interação com fosfolipídios da membrana, várias moléculas de peptídeo se agregam e formam um complexo com moléculas de água associadas. Este complexo induz a

formação de canais transmembrânicos temporários que podem permitir a passagem de íons, moléculas de grande massa molecular e inclusive, do próprio peptídeo, sem que haja grandes alterações na estrutura da membrana. A diferença entre este modelo e o modelo barril é que os peptídeos estão sempre associados com as cabeças polares dos fosfolipídeos, mesmo quando inseridos perpendicularmente a bicamada lipídica. Este tipo de poro transmembrânico é induzido pelas magaininas, protegrinas e melitinas (Brogden, 2005); 4 - Formação de poro toroidal desordenado – uma modificação recente do poro toroidal propõe que são formadas conformações menos rígidas da orientação do peptídeo (Melo et al., 2009); na simulação por dinâmica molecular realizada com o peptídeo Melitina em presença da bicamada lipídica de dipalmitoilfosfatidilcolina, mostrou a formação espontânea de poros transmembrânicos acima da concentração crítica de peptídeo/lipídio (P/L). Porém, diferente do modelo tradicional, eles mostraram que um ou dois peptídeos era suficientes para forrar o poro toroidal (Figura 5) (Sengupta, 2008).

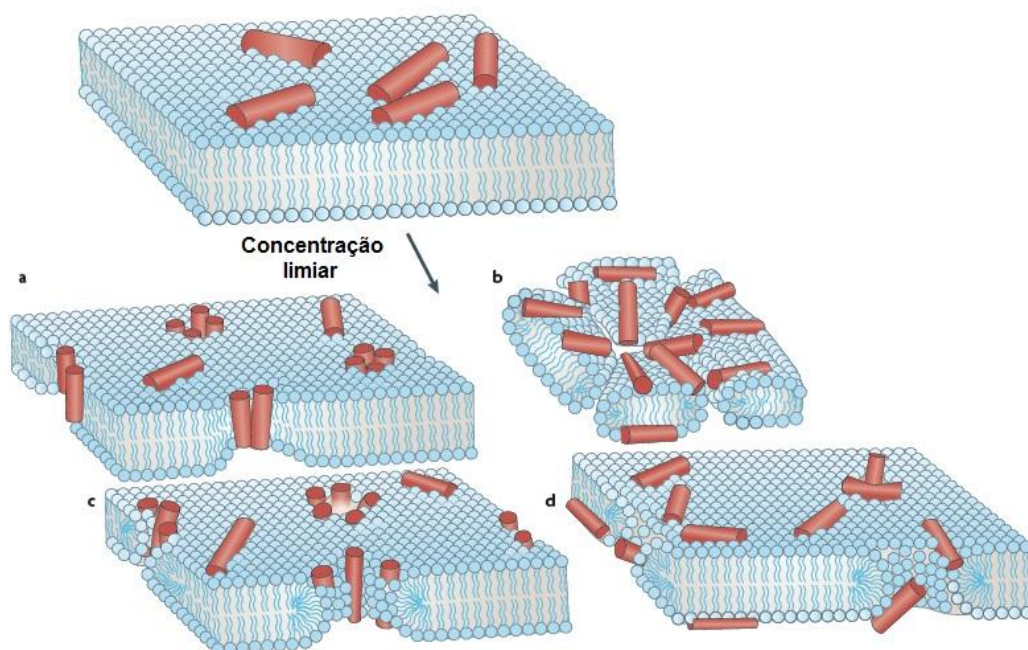


Figura 4 - Mecanismos propostos de peptídeos antimicrobianos mediados pela ruptura da membrana. a) Modelo “Barrel-stave”, b) Modelo “Carpet”, c) Formação Poro Toroidal, d) Formação Poro Toroidal desordenado (Melo et al., 2009).

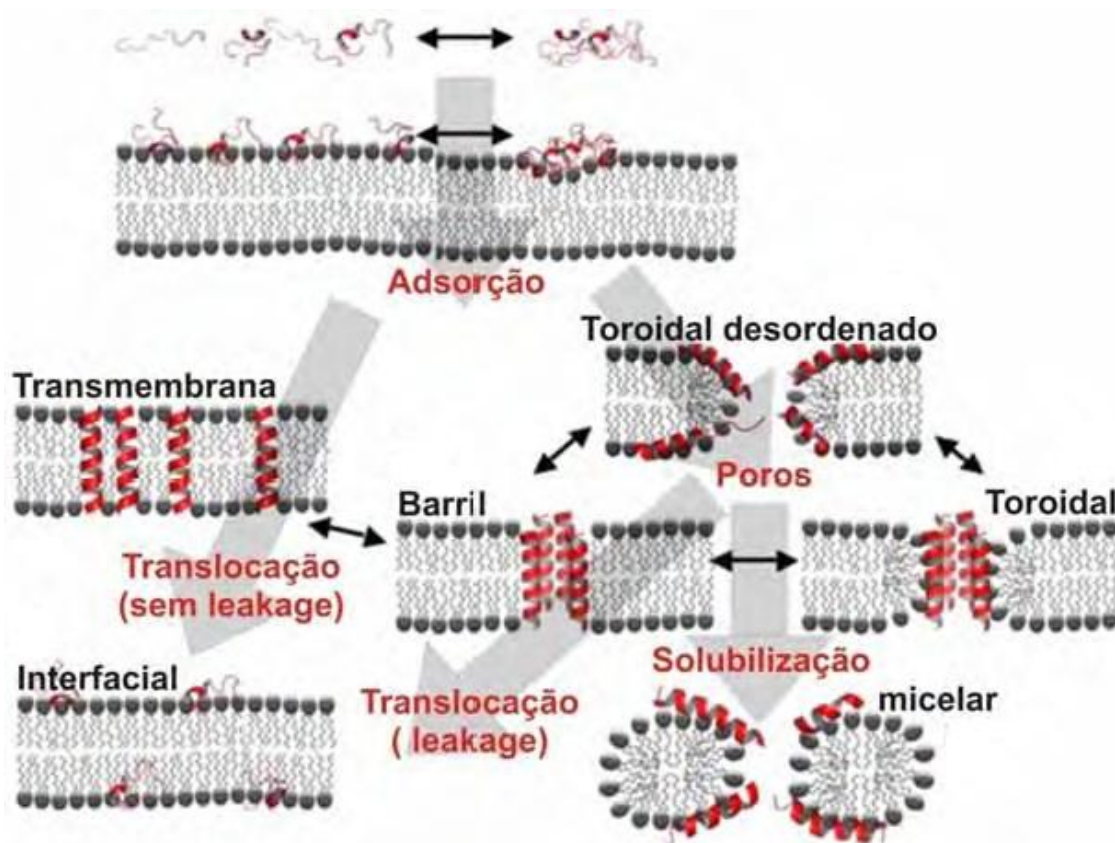


Figura 5 – Esquema das possíveis vias de interação de peptídeos antimicrobianos com lipídios. Monômeros e pequenas agregações de peptídeos, em contato com a membrana, que acabam se ligando na interface (adsorção). Eventualmente os peptídeos distribuem-se equitativamente entre as duas camadas lipídicas. Isto pode ocorrer por duas vias de translocação diferentes. Na translocação sem “leakage”(vazamento), os peptídeos são capazes de cruzar a membrana sem a formação de poros. Em alguns casos, o estado intermediário transmembranar é termodinamicamente estável (por exemplo, peptídeos hidrofóbicos que adotam uma orientação transmembranar). A principal característica dos peptídeos antimicrobianos é a permeabilização da membrana seguindo a via translocação com “leakage”. Acima de certa razão peptídeo/lipídio, os peptídeos inserem na membrana formando poros. Uma variedade de estrutura de poros diferentes pode ser formada, incluindo os estados: “barril”; toroidal e toroidal desordenado. Estes estados separados devem ser interpretados em casos extremos, podendo ocorrer uma mistura de variedades desses modelos. O poro pode ser uma estrutura estável, mas também pode ser uma estrutura transitória. Neste caso, uma vez que os peptídeos distribuídos nas monocamadas opostas, a formação do poro é reduzida, desativando o processo. Por outro lado, o acúmulo de certos peptídeos podem levar a desintegração da membrana como um detergente, resultando na formação de micelas (via solubilização). Observa-se que a estrutura secundária do peptídeo pode variar ao longo das várias vias. A configuração em random ou em hélice são meramente ilustrativas desses processos e não devem ser interpretadas literalmente (esquema adaptado de Sengupta et al, 2008).

Alguns peptídeos catiônicos têm como alvo constituinte interno celular como DNA, RNA, ou paredes celulares enquanto outros parecem indiretamente modular a atividade antimicrobiana por interação com outros componentes do sistema imune inato (Figura 6) (Finlay, Hancock, 2004, Hammil et al.,2008; Zaio, 2007).

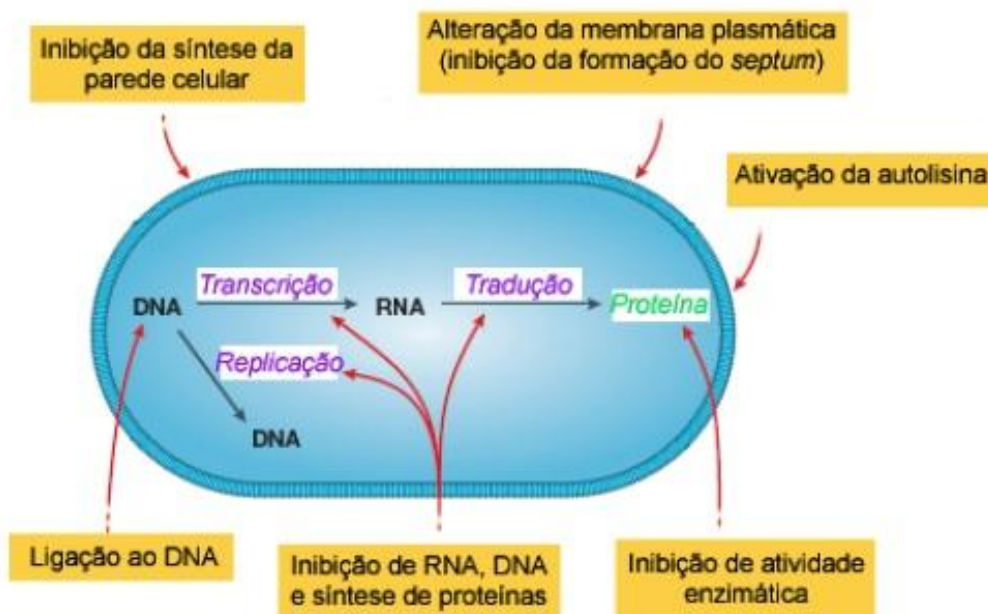


Figura 6 - Esquema simplificado do modo de ação intracelular de peptídeos antimicrobianos (modificado de Brogden, 2005)

Os PAMs apresentam grande diversidade em termos de características estruturais, propriedades e funções biológicas, e também em sua distribuição no tecido e nível de expressão (Bachère, 2000).

Peptídeos antimicrobianos estão amplamente distribuídos nos organismos. A ampla ocorrência dessas substâncias sugere que elas desempenham um papel importante na imunidade inata contra microrganismos e outros patógenos (Boman, 1995; Ganz, Lehrer, 1999; Hoffmann et al., 1999). PAMs são particularmente potentes e apresentam um amplo espectro de ação. Normalmente sua atividade não se restringe a um único tipo de patógeno como bactérias Gram positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários. Alguns PAMs também apresentam uma tendência a ser hemolíticos, enquanto outros podem ser usados como inseticidas (Hancock et al., 2006). Recentemente, tem sido evidenciado que alguns AMPs podem exercer funções na modulação da imunidade, as quais têm impacto em infecções e inflamações (Brown, Hancock, 2006).

Nos quelicerados, PAMs têm sido caracterizados dos hemócitos dos limulídeos (“horseshoecrabs”) (Iwanaga et al., 1998), em escorpiões não desafiados *Androctonus australis* foram isolados três PAMs da hemolinfa, a androctonina, a

buthinina e um peptídeo similar a defensinas de insetos (Ehret-Sabatier et al.,1996), a CLL-dlp, uma defensina-like isolada do escorpião *Centruroides limpidus limpidus* (Vega et al.,2004), no opilião *Acutisoma longipes*, o peptídeo longipina do plasma foi caracterizado com 2,1 kDa (Sayegh, 2011), em crustáceos um peptídeo de 6,5 kDa (Schnapp et al.,1996) e “callinectin” de 3,7 kDa (Khoo et al.,1999) parcialmente caracterizados de *Carcinus maenas* e *Callinectes sapidus*, respectivamente. Além disso, em camarões, dois tipos de PAMs tem sido inteiramente caracterizados, nomeados “penaeidins” dos hemócitos (Destoumieux et al.,1997) e três tipos de PAMs derivados da hemocianina presente no plasma com massa molecular de 2.7 kDa (PvHCt), 7.9 kDa (PsHCt1) e 8.3 kDa (PsHCT2) (Destoumieux-Garzon et al.,2001). Peptídeos semelhantes derivados da hemocianina têm sido recentemente purificados da hemolinfa de lagostins (Lee et al.,2003).

Em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, um fragmento da hemoglobina bovina (segmento do amino ácido 33 ao 61) com atividade antimicrobiana foi isolado do conteúdo do tubo digestivo (Fogaça et al.,1999). Esse fragmento de hemoglobina apresentou atividade contra bactéria Gram positiva e fungo. Dois outros fragmentos de hemoglobina, correspondentes aos segmentos de amino ácidos 1 a 32 and 3 a 32 de hemoglobina de coelho, foram recentemente isolados do conteúdo do tubo digestivo de *Ornithodoros moubata* (Nakajima et al.,2003). Também foi purificada uma lisozima do tubo digestivo de *O. moubata* se alimentando, sendo mostrado que sua atividade aumentava fortemente após o repasto sanguíneo (Kopáček 1999). Recentemente, quatro defensinas de *O. moubata* (Nakajima et al.,2001, 2002) e uma de *Dermacentor variabilis* (Johns et al, 2001) foram isoladas e caracterizadas. A defensina de *D. variabilis* foi detectada na hemolinfa de carrapatos inoculados experimentalmente com *Borrelia burgdorferi* ou *Bacillus subtilis* (Johns et al.,2001).

Na hemolinfa da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*, uma aranha pertencente à família Theraphosidae, foram identificados três peptídeos com atividade antimicrobiana: a “theraphosinina” (4.052Da) que foi purificada a partir do plasma (Silva Jr., 2000) e, a “gomesina” (2.270Da) e a “acanthoscurrina”, ambas purificadas a partir dos hemócitos (Lorenzini et al.,2003; Silva Jr et al.,2000). Theraphosinina é um peptídeo com atividade contra a bactéria Gram positiva *Micrococcus luteus* e que ainda não teve sua sequência de amino ácidos completamente elucidada (Silva Jr et al.,2000). Gomesina, um peptídeo com 18 resíduos de amino ácidos, duas pontes dissulfeto, com amplo espectro de atividade

antimicrobiana e antiparasítica e grande similaridade em sequências e estrutura com taquiplesina e polifemusina dos limulídeos (Silva Jr et al.,2000). Acanthoscurrina, um peptídeo antimicrobiano constitutivo, rico em glicina, com atividade contra bactéria Gram negativa e contra levedura *Candida albicans* (Silva Jr et al.,2000; Lorenzini et al.,2003). Recentemente, nos hemócitos da aranha *Cupienius salei* foi encontrado um peptídeo antimicrobiano rico em glicina, “Ctenidin” muito semelhante à Acanthoscurrina (Baumann et al.,2010). Também foi encontrado nos hemócitos da aranha caranguejeira *A. gomesina* uma molécula de baixo peso (417 Da), a migalina, uma acil poliamina com atividade contra bactérias Gram negativas e cuja atividade é inibida em presença de catalase, indicando um possível modo de ação através da produção de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) (Silva Jr. et al.,2000; Pereira et al.,2007).

Na hemolinfa da aranha *A. rondoniae* foram encontradas três moléculas com atividade antimicrobiana nos hemócitos, que apresentaram massa molecular de 2.272,0Da, 418,2Da e 10.168,0Da respectivamente. Quando comparada as massas e as atividades antimicrobianas mostraram muito semelhantes com as moléculas que já foram caracterizadas em *A. gomesiana*. (Riciluca, 2011). No plasma foram encontradas seis frações com atividade antimicrobiana, uma dessas revelou um peptídeo que foi completamente caracterizado. Esse peptídeo foi denominado rondonina e apresenta massa molecular de 1.236 Da e seqüência primária: IIIQYEGHKH. Esse peptídeo mostra identidade com a região C-terminal da subunidade “D” da hemocianina das aranhas *Aphonopelma hentzi* (*Eurypelma californicum*), *A. gomesiana*. A rondonina não é hemolítica e tem atividade fungicida e sugere uma nova via do sistema imune em aranhas (Figura 7) (Kuhn-Nentwig , Nentwig, 2013; Riciluca, 2012).

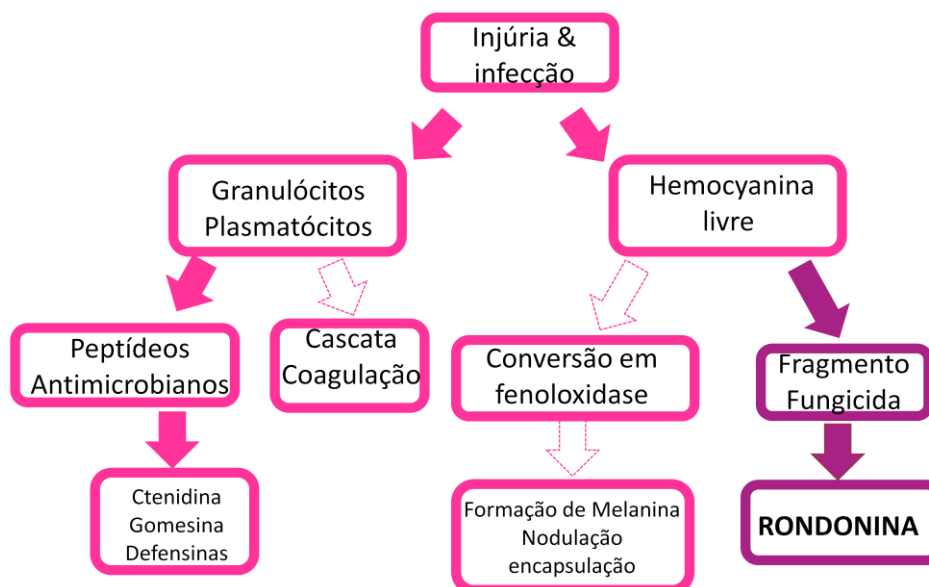


Figura 7 – Esquema do sistema imune das aranhas. Processo de injúria e infecção por microrganismos. O processo de injúria e infecção das aranhas ainda não é bem conhecido e somente os componentes nas caixas tem sido detectado nos hemócitos ou hemolinfa, enquanto a via da cascata de coagulação e formação da melanina são adaptações de xiphosura (Kuhn-Nentwig, Nentwig, 2013).

Na análise de transcriptoma de coágulo da aranha *Acanthoscurria geniculata*, foi identificado no peptidoma após coagulação um peptídeo homólogo a acanthoscurrina 1 e acanthoscurrina 2 de *A. gomesiana*. O peptidoma portanto suporta a hipótese que aranhas também usam os PAMs como parte do sistema imune. A sequência de rondonina foi encontrada na subunidade D dessa aranha também e poderia potencialmente ser liberada a partir da clivagem da hemocianina uma vez que está subunidade estava presente no coágulo e expressar sua atividade no local (Sanggaard et al., 2016).

Estudos sobre a biodiversidade de moléculas antimicrobianas nos vários grupos de artrópodes podem ser importantes para se entender o processo imunológico de uma maneira mais ampla, possibilitando compreender as relações existentes entre os vários sistemas bem como sua origem (Silva Jr., 2000).

Os produtos naturais representam uma rica fonte de compostos a serem explorados na seleção de novos defensivos agrícolas para plantas e como suas principais características podem-se citar a baixa toxicidade para humanos e para a vida selvagem, o baixo impacto ambiental, a presença de baixa quantidade de resíduos em alimentos e a compatibilidade com o manejo integrado de pragas. Estima-se que perdas causadas por ação de fitopatógenos em todo mundo alcance

20% da produção de alimentos e dos lucros econômicos dos agricultores (Rommens, Kishore, 2000).

Enfim, todos os organismos vivos, abrangendo desde microrganismos até plantas e animais, evoluíram de forma a desenvolver mecanismos para ativamente defender-se contra o ataque de patógenos (Bulet et al.,2004; Franco et al.,2006; Pelegrini , Franco, 2005).

Os fungicidas são, hoje em dia, essenciais para o efetivo controle de doenças de plantas, seja na cobertura de sementes, visando aumentar a sobrevivência das plantas recém - geminadas (Broekaert, et al.,1995) ou em fase mais adiantada de cultivo. Há uma longa tradição no uso de fungicidas e inseticidas para o controle de pragas. Entretanto, a alta frequência de aplicação desses defensivos tem frequentemente, resultado na emergência de pragas resistentes ao princípio ativo. O único caminho para prevenir ou retardar o aparecimento de resistência é desenvolver compostos com outros modos de ação e usar estratégia de controle de pragas que incluam a proteção de organismos benéficos (Oerke, 2006).

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana. A candidíase, principal infecção fúngica oportunista do ser humano, é provocada por leveduras do gênero *Candida*, que fazem parte da microbiota normal da cavidade oral e dos tratos gastrointestinal e urogenital de seres humanos. Geralmente não ocasionam processos infecciosos em indivíduos saudáveis, mas podem acometer pacientes imunocomprometidos e/ou sob terapia antimicrobiana por um período prolongado (Matos et al.,2009; Suzuki, 2009). Essa infecção expressa muito bem a variedade de relações que ocorrem entre o hospedeiro e a microbiota autóctone, podendo ir do comensalismo à doença sistêmica fatal (Fisher, Cook, 2001). *Candida albicans* é a principal espécie do gênero associada à candidíase, mas outras também são relatadas, como por exemplo: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefir* e *Candida guilliermondii*.

Uma vez rompido o equilíbrio biológico entre a microbiota e o organismo hospedeiro, as espécies de *Candida* têm a capacidade de provocar infecções ocasionando quadros agudos, subagudos ou crônicos, superficiais ou profundos (Eggimann et al, 2003; Menezes, Neufeld, 2006; Neufeld, 1999). *C. albicans* é reconhecida por sua maior patogenicidade, secretam proteinases e fosfolipases capazes de degradar, destruir ou transformar constituintes da membrana celular do

hospedeiro induzindo a uma disfunção e/ou destruição física. O papel das enzimas proteolíticas pode ser digerir proteínas do hospedeiro promovendo uma fonte de nitrogênio para a célula e contribuir para a adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro (Hube, Naglik, 2001).

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana. Esse fato é devido, em grande parte, ao surgimento de microrganismos multi-resistentes aos antibióticos, tornando-se vital investir na busca de substâncias naturais ou sintéticas que exibam atividades antimicrobianas específicas e, acima de tudo, que as exerçam através de mecanismos de ação alternativos daqueles dos antibióticos disponíveis. A pesquisa, a purificação, e a caracterização química, biológica e estrutural provenientes da fauna e da flora brasileira podem ser valiosas, uma vez que a própria evolução tratou de selecionar um vastíssimo espectro de substâncias eficientes que defendem contra infecções, podendo atuar em diferentes compartimentos celulares, sendo então candidatos promissores para o desenvolvimento de drogas importantes no combate a patógenos resistentes aos antibióticos convencionais.

Os organismos com uma vida longa pode ser encontrado em todos os taxa principais dos animais incluindo os invertebrados. Alguns invertebrados de vários grupos filogenéticos (incluindo moluscos, artrópodes e equinodermatas) vivem mais que muitas décadas ou atualmente mais que cem anos (Abele et al.,2009; Bodnar, 2009). Esses organismos podem ser equipados com um sistema imune altamente funcional capaz de reagir a mudanças de pressão de agentes patogênicos (Little, Kraaijeveld, 2004).

As aranhas estão distribuídas por todo o planeta e conquistaram praticamente em quase todos os ecossistemas. Todos os indivíduos são carnívoros, sendo o grupo dos insetos a maior fonte de presas, embora outros artrópodes também possam ser consumidos. A maioria das aranhas mede de 0,2 a 1 cm de comprimento, mas os espécimes pertencentes ao grupo das caranguejeiras podem medir até 9 cm (Foelix, 1996). As evidências mostram que sua origem foi no Siluriano ou início do Devoniano, com a maior irradiação de Araneomorphae no fim do Paleozóico e começo do Mesozóico (Coddington, Levi, 1991).

As aranhas pertencem à Ordem Araneae e são subdivididas em três subordens: Mesothelae, que são consideradas as mais primitivas; Mygalomorphae,

que abrange todo o grupo das caranguejeiras e Araneomorphae, que inclui cerca de 90% das espécies (Foelix, 1996).

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

Vivem em buracos suficientes profundos, os quais, em regra, cavadas por elas mesmas. A média do tamanho do corpo é cerca de 6-8 cm, e pode alcançar 23 cm com as patas.

Neste contexto, se torna interessante estudar os PAMs e as moléculas presentes na hemolinfa de *A. rondoniae* para um melhor entendimento de seu sistema imune, já que esses animais estão a milhões de anos na Terra e ao longo da evolução sofreram pequenas mudanças, o que nos indica a presença de um sistema imune bem eficaz.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Foi estudar a importância das moléculas bioativas da hemolinfa da aranha migalomorfa *Acanthoscurria rondoniae* bem como seu papel e a sua importância no sistema imune do organismo.

2.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar a citotoxicidade de rondonina contra linhagens celulares;
- Ampliar o espectro de atividade antimicrobiana da rondonina bem como atividade antitumoral e antiviral;
- Avaliar mecanismo de ação do peptídeo rondonina;
- Caracterizar outras moléculas antimicrobianas presentes no plasma;
- Avaliar o espectro de atividade dessas moléculas;
- Sequenciar as subunidades da hemocianina por transcriptoma;
- Resolver a estrutura tridimensional por “cryo-EM” (microscopia eletrônica criogênica).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e Coleta de Hemolinfa

Para os experimentos, foram utilizadas aranhas da espécie *A. rondoniae* (**Error! Reference source not found.**), mantidas no biotério do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan (São Paulo). Todas as aranhas utilizadas nos experimentos foram coletadas sob Licença Permanente para coleta de material zoológico nº 11024-3 – IBAMA e Autorização Especial de Acesso ao Patrimônio Genético nº 001/2008 e 010345/2014-0.



Figura 8 - Aranha caranguejeira *Acanthoscurria rondoniae* (Theraphosidae, Mygalomorphae).

Foram coletados 0,5 mL de hemolinfa de cada animal, anestesiados por aproximadamente 10 minutos no freezer, por punção do vaso dorsal (**Error! Reference source not found.**), utilizando seringa apirogênica. Para evitar a degranulação dos hemócitos e conseqüente coagulação da hemolinfa, foi coletada na presença de tampão citrato de sódio (NaCl 0,45 M; glicose 0,1 M; citrato trissódico 30 mM; ácido cítrico 26 mM; EDTA 10 mM), ph 4,6 (2 volumes de hemolinfa:1 volume de tampão) (Söderhäll, Smith, 1983).



Figura 9 – Detalhes da região dorsal do abdome da aranha. Punção cardíaca do vaso dorsal com a utilização de seringa apirogênica para remoção de hemolinfa.

Os hemócitos foram separados do plasma por centrifugação a 800 g durante 15 minutos a 4 °C. O plasma foi retirado e acondicionado. Aos hemócitos foi adicionado 1 mL de tampão anticoagulante e feita uma nova centrifugação a 800 g durante 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet acondicionado a -80 °C até o uso.

3.2 Extração e Purificação de Peptídeos Antimicrobianos do Plasma

O plasma, após ser coletado foi adicionado água ultrapura acidificada (ácido trifluoracético -TFA 0,05%) diluindo 20 vezes o volume da hemolinfa coletada. A solução foi mantida sob agitação constante num banho de gelo por 30 minutos. O material foi centrifugado a 16.000 g, a 4 °C, por 10 minutos, o sobrenadante obtido foi submetido à extração em fase sólida, em coluna descartável SEP-PAK C18 (5g), equilibradas com água acidificada, com o objetivo de pré-purificar os peptídeos antimicrobianos. Três estágios de eluição foram realizados utilizando-se sucessivamente diferentes concentrações de acetonitrila (5%, 40% e 80%) em água acidificada (TFA 0,05%).

As eluições obtidas na etapa anterior (5%, 40% e 80%) foram secas em um concentrador a vácuo (Savant Instrument, Inc), ressuspendidas em água ultrapura acidificada (TFA 0,05%) e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (FR-CLAE). A purificação por FR-CLAE foi realizada a uma temperatura ambiente, utilizando o sistema Shimadzu LC-20A Prominence. A absorbância foi monitorada a 225 nm e 280 nm. Estas frações foram aplicadas em uma coluna de fase reversa semi-preparativa Júpiter C18 300A (Phenomenex, 250 mm x 10 mm x 10 µ) e as

eluições foram realizadas por gradientes de acetonitrila em água acidificada de 0 a 20%, 2 a 60% e 20 a 80%, respectivamente, por 60 minutos, sob um fluxo de 1,5 mL/min.

As frações correspondentes aos picos foram coletadas manualmente, secas em um concentrador a vácuo (Savant Instrument Inc) e reconstituídas em água ultrapura. A presença de atividade antimicrobiana nessas frações foi determinada por ensaio de inibição em meio líquido.

3.3 Caracterização Estrutural

3.3.1 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massa foi utilizada para controlar a homogeneidade das frações com atividade antimicrobiana durante as etapas de purificação. Os dados obtidos também foram utilizados para avaliar as moléculas por bioinformática.

As análises foram realizadas por:

- 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 (m/z 1022, 1122, 1222, 1322, 1422, 1522, 1622, 1722, 1822 e 1922). 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 água ultrapura acidificada (Ácido Fórmico - AF 0,1%). Para análise foi utilizada uma coluna C18 (Waters) e um gradiente linear de acetonitrila de 0 a 80% em água acidificada (AF 0,1%) em 60 minutos e 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 no software MassAnalyzer 1.03 (Amgen, Thousand Oaks, CA, EUA).

- Q-TOF Ultima API (Micromass) – os espectros de fragmentação obtidos por ESI-Q-ToF/MS (eletrospray ionization-quadrupole-time of flight/mass spectrometry) em um equipamento Q-ToF Ultima API (Micromass) acoplado a uma

fonte de cromatografia líquida em nanoescala nanoACQUITY UltraPerformance LC® (Waters). Os peptídeos foram ressuspensos em 20 µL em água ultrapura acidificada (AF 0,1%) e submetidos à análise sob fluxo de 0,5 µL/min em uma seringa de 50 µL (Hamilton, Reno, NV, EUA). A fragmentação dos íons mono ou duplamente carregados foi realizada sob diferentes energias de colisão (E_{col}) contra gás inerte (argônio) para que os melhores espectros de MS/MS pudessem ser utilizados. Os espectros foram adquiridos a cada 0,5 segundo e a composição final de espectros foram obtidos após 1,5 min de aquisição.

- Orbitrap-ESI - As amostras de peptídeos foram dissolvidas em 20 µL de água ultrapura acidificada (AF 0,1%) e analisadas por LC-MS/MS (*Liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) utilizando espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Bremen, GA, USA) acoplado ao sistema de nano-cromatografia líquida Easy-nLCII (Thermo Scientific, Bremen, GA, USA). 5µL de cada amostra foram automaticamente injetados em pré-coluna C-18 (100 µm I.D. x 50 mm; Júpiter 10 µm, Phenomenex Inc, Torrance, CA, USA) acoplada a uma coluna analítica C-18 (75 µm I.D. x 100 mm; ACQUA 5 µm, Phenomenex Inc, Torrance, CA, USA). Os peptídeos foram eluídos em gradiente linear de 0% a 80% de solvente B (0,1% ácido fórmico em acetonitrila) por 45 minutos, sob fluxo de 200 nL/min. A fonte de ionização por electrospray (*ESI source*) foi operada em modo positivo, com a voltagem e temperatura ajustadas para 2,0 kV e 200°C, respectivamente. O intervalo de varredura de massas considerado para o *full scan* (MS1) foi de 200 - 2000 m/z (resolução de 60.000 em 400 m/z), operando no modo DDA (*Data Dependent Acquisition*), onde os cinco íons mais intensos por *scan* foram selecionados para o evento de fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID, *collision induced dissociation*). O sinal mínimo requerido para disparar eventos de fragmentação (MS2) de determinado íon foi ajustado para 5.000 cps, e o tempo de exclusão dinâmica utilizado foi 15 segundos. A deconvolução dos valores de m/z para a obtenção das massas moleculares dos peptídeos foi realizada no software MassAnalyzer 1.03 (Amgen, Thousand Oaks, CA, EUA).

3.3.2 Digestões enzimáticas

3.3.2.1 Digestão “in solução”

As digestões em solução foram realizadas seguindo o protocolo de redução e alquilação da literatura (Villén, Gygi, 2008) e digeridas com a enzima tripsina (Sigma). Uma alíquota de 10 μL da fração seca foi dissolvida em 20 μL de 0,4 M de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_2) e 8M Ureia. A essa solução adicionou-se 5 μL ditionitrotol (DTT) 45 mM. A amostra foi mantida a 50 °C por 15 minutos. Após resfriada em temperatura ambiente, foi adicionado 5 μL de iodocetamida 100 mM na solução e mantida em temperatura ambiente por 15 minutos protegida da luz. Adicionou-se 130 μL de água ultrapura para diluição da Ureia e 2 μL de tripsina, incubada a 37 °C por 12 horas. Para interromper a reação acrescentou-se 160 μL de água acidificada (TFA) 0,1%. O produto foi seco em concentrador a vácuo, dessalinizado em colunas Zip Tip ® C18. A amostra foi analisada no ESI-MS utilizando uma coluna C18 num gradiente linear de 5% a 80% de acetonitrila em água acidificada, por 40 minutos sob um fluxo de 250 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.3.2.2 Digestão in gel

Proteínas de interesse, presente nos géis SDS-PAGE ou nos *spots* do gel bidimensional, foram recortadas e submetidas ao processo de digestão *in gel* segundo protocolo descrito por Hanna et al. (2000), com algumas modificações. Todos os reagentes foram preparados no momento do uso.

Inicialmente os fragmentos do gel recortados foram incubados em 500 μL de uma solução de metanol 50% em água ultrapura contendo ácido acético 5% por 2h. Em seguida, essa solução foi removida por aspiração com pipeta e 500 μL foram adicionados aos fragmentos de gel, que permaneceram por mais uma hora nesta solução. Os fragmentos de gel foram então desidratados pela incubação por 10 min (2 vezes por 5 min) em 200 μL de acetonitrila (100%). A solução de acetonitrila foi aspirada com pipeta e o restante foi evaporado em um sistema de concentração a vácuo (*speed vac*). Após esta etapa, os pedaços de gel foram reidratados por 30 min em 30 μL (por fragmento de gel) da solução redutora (ditiotretol 10mM em bicabornato de amônio 100mM). Decorrido o tempo de reidratação com DTT, a solução foi aspirada com pipeta e os fragmentos de gel foram incubados por 30 min,

protegidos da luz, em 30 μL (por fragmento de gel) da solução alquilante (iodoacetamida 50 mM em bicarbonato de amônio 100 mM). Em seguida, a solução alquilante foi removida por aspiração com pipeta e, os fragmentos de gel foram submetidos a incubação, por 10 min, em 100 μL (por fragmento de gel) de bicarbonato de amônio 100 mM. Após esta etapa, a solução de bicarbonato de amônio foi retirada e 200 μL (por fragmento de gel) de acetonitrila (100%) foram adicionados e os fragmentos de gel incubados nesta solução por 5 min. A solução de acetonitrila foi retirada e, novamente os fragmentos de gel foram incubados, por 10 min, em 200 μL da solução de bicarbonato de amônio 100 m. Na última etapa de desidratação, a solução de bicarbonato de amônio foi retirada e os fragmentos de gel foram incubados por 10 min (duas vezes por 5 min) em 200 μL de acetonitrila 100%. A solução de acetonitrila foi retirada por aspiração com pipeta e o restante foi evaporado num sistema *speed vac*. Os fragmentos de gel foram reidratados em 16 μL de uma solução fresca de tripsina (Sigma) (50ng/ μL em bicarbonato de amônio 50 mM), em banho de gelo, por 30 min. Em seguida a solução de tripsina foi retirada, uma solução de bicarbonato de amônio 50mM foi adicionada (em um volume suficiente para cobrir os fragmentos de gel) e os tubos contendo os fragmentos de gel foram incubados em estufa a 37° C por 18h.

A extração dos peptídeos do gel se deu com a adição de 30 μL (por fragmento de gel) da **solução 1** – ácido fórmico 5% (em água ultrapura) – e incubação dos pedaços de gel por 10 min. nesta solução, a temperatura ambiente. Em seguida, a solução contendo os peptídeos foi transferida para um novo tubo e, ao pedaço de gel do tubo anterior, foi adicionado 12 μL (por fragmento de gel) da **solução 2** – ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. Os fragmentos de gel foram incubados por 20 min (duas vezes por 10 min) nesta solução, e a solução transferida para o tubo que continha os peptídeos extraídos com a **solução 1**. A solução foi concentrada em *speed vac* e os peptídeos resultantes foram ressuspensos em 15 μL (por amostra) de ácido fórmico 0,1% nas análises com o espectrômetro LTQ-XL ou Q-ToF.

3.3.2.3 Análise Bioinformática

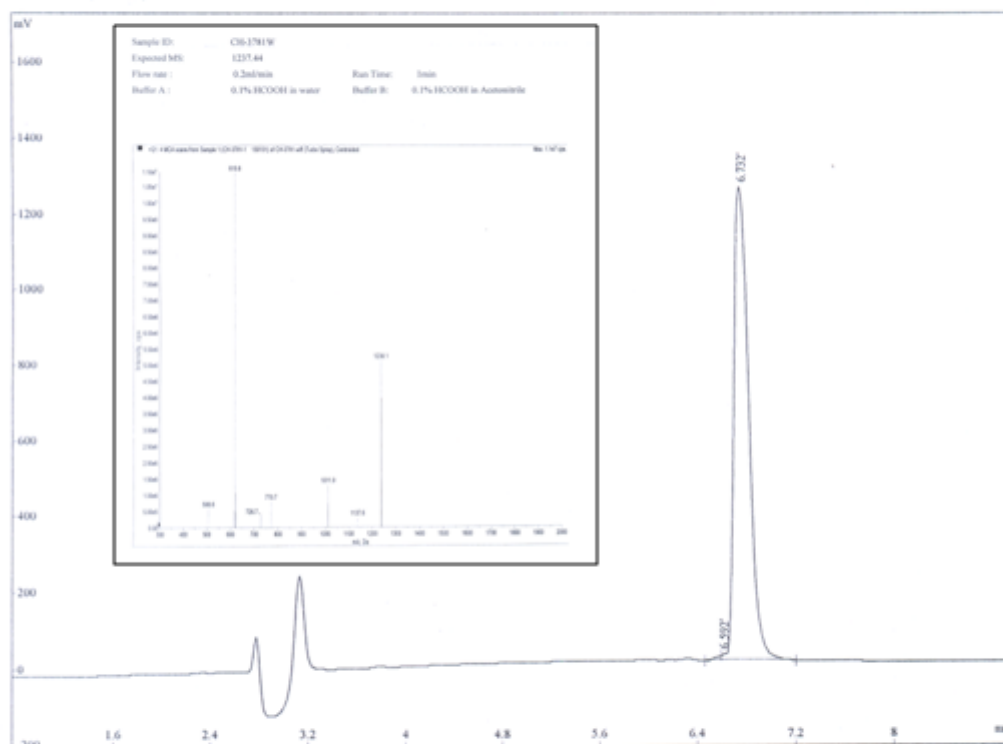
Os dados brutos (*Raw files*) referentes às análises de MS/MS utilizando o espectrômetro LTQ XL e Orbitrap-ESI foram processados utilizando o software *Trans-Proteomics Pipeline* (Keller et al., 2005) para converter os arquivos brutos no formato **.mgf* e para os espectros obtidos com o espectrômetro Q-ToF Ultima, foi utilizado o programa ProteinLynx™ versão 2.3 (Waters) para converter os arquivos brutos em **.pkl*.

Os arquivos resultantes foram utilizados para buscas em banco de dados inseridos no programa Mascot (Matrix Science), acessado através de um servidor instalado no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada. Os parâmetros para busca foram modificações fixas como carbamidometilação e oxidação das metioninas como modificação variável utilizando o banco de dados SwissProt com filtro para Arachnida.

3.3.2.4 Síntese do Peptídeo Rondonina

O peptídeo, rondonina, foi sintetizado pela ChinaPeptides Co., Ltd, com 98% de grau de pureza, através do método clássico Fmoc, como descrito por Atherton e Sheppard (1989). O material foi caracterizado por FR-CLAE utilizando-se coluna de fase-reversa Kromasil 100-5C18 (4,6 mm X 250 mm, 5 µm num gradiente de 15% a 40% de acetonitrila (tampão A - 0,1% TFA em água e tampão B - 0,1% TFA em acetonitrila) no fluxo de 1 ml/min em 9 minutos e a identidade da molécula foi verificada por espectrometria de massas (Figura 10).

Sample ID: CH-3781W
 Sequence: IIIQYEGHKH
 Measurement: Peak Area Run Time: 9min
 Calculation Type: Percent Wavelength: 220nm
 Flow rate: 1ml/min Inj. Vol: 10uL
 Buffer A: 0.1% TFA in water Buffer B: 0.1%TFA in Acetonitrile
 Column: Kromasil 100-5C18,4.6mmX250mm,5 micron
 Gradient(linear): 15%-40% buffer B in 9min



Rank	Time	Name	Conc.	Area
1	6.592		0.4529	47719
2	6.732		99.54	10489362
Total			100	10537081

Figura 10 – Relatório de síntese do Peptídeo Rondonina. Perfil cromatográfico para purificação da rondonina sintética. *Inset:* Espectrometria de massa do peptídeo

3.4 Bioensaios

3.4.1 Microrganismos

Para realizar os testes de inibição de crescimento em meio líquido, com o intuito de identificar peptídeos do plasma e as atividades biológicas da rondonina,

utilizamos as cepas padrões de bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* SBS 363 e Gram-positiva *Micrococcus luteus* A270 e a levedura *Candida albicans* MDM8. Esses microrganismos também foram utilizados para realizar os ensaios de retardo de migração de DNA/RNA/mRNA.

Para avaliar também o espectro de atividade antimicrobiana da rondonina foram feitos testes contra os microrganismos *Cryptococcus neoformans* tipo molecular VN1, por pertencer ao filo Basidiomicetos e ser agente patogênico da criptococose, *Saccharomyces cerevisiae*, cepa industrial pertencente ao filo Ascomiceto e não patogênica, e o fungo filamentosamente entomopatogênico *Paecilomyces farinosus* IBCB-251. As cepas são mantidas na Coleção de Microrganismos do Setor de Química de Proteínas do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan.

3.4.2 Atividade Antimicrobiana

Para a atividade antimicrobiana utilizamos o ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido (Bulet et al.,1993). A 20 µL da fração ou de água (controle), aplicados em poços de uma microplaca, foram adicionados 80µL de meio de cultura PDB (*Poor Dextrose Potato Broth* - 1/2 PDB: 1.2 g Dextrose de Batata em 100 ml de H₂O, pH 5.0; 79 mOsM) para leveduras e fungos, e PB (*Poor Broth* - PB: 1.0 g Peptona em 100 ml de H₂O, 86 mM NaCl; pH 7,2; 217 mOsM) para bactérias, contendo uma suspensão de uma cultura de microrganismo em fase logarítima 10³. A medida de absorvância das culturas após 18 horas de incubação a 30° C foi realizada em um leitor de microplaca Victor³ (1420 Multilabel Counter/Victor³ – Perkin Elmer) a 595 nm (Figura 11).

Teste de Inibição em Meio Líquido

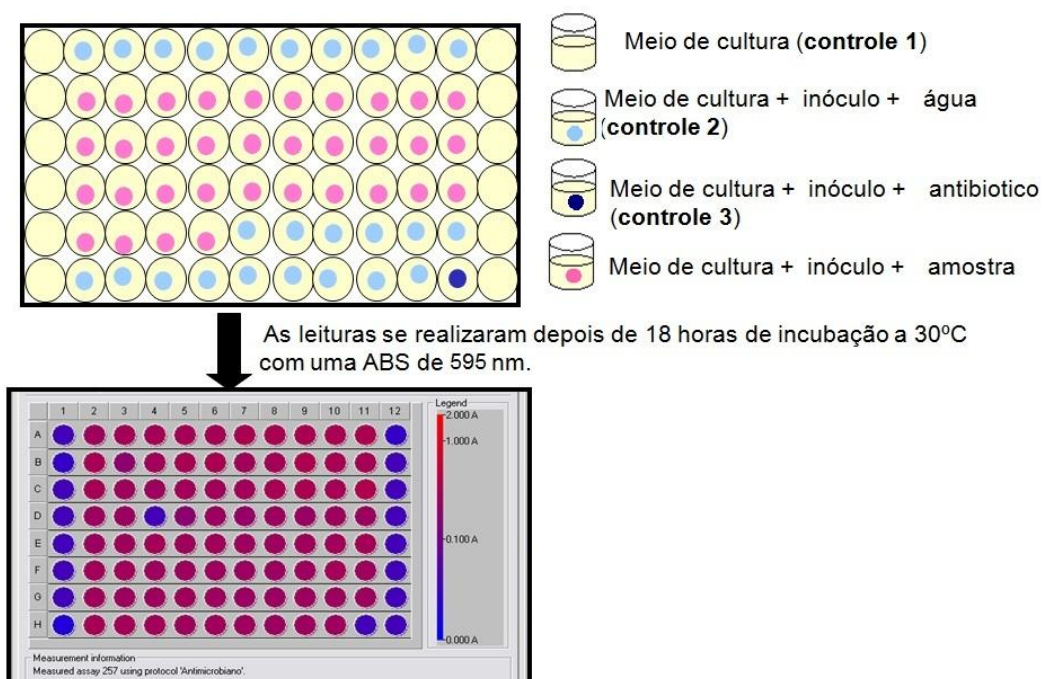


Figura 11 - Esquema de ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido em microplaca.

3.4.5 Ensaio Hemolítico

A atividade hemolítica foi testada contra eritrócitos humanos em microplaca de 96 poços com fundo em "U" (Figura 12). O sangue de um doador saudável (O+) foi coletado na presença de um tampão de citrato de sódio (150 mM; pH 7,4), centrifugado por 15 min a 700 g, lavado três vezes e ressuspendido em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM; pH 7,4). As frações purificadas foram testadas na concentração que apresentaram atividade antimicrobiana, diluídas em 50 µL de tampão PBS, adicionando-se mais 50 µL de uma solução 3% (v/v) de eritrócitos em tampão PBS. A microplaca foi centrifugada por 5 min a 700 g após ter sido incubada por uma hora a 37 °C. O sobrenadante, aproximadamente 80 µL, foi transferido para uma nova microplaca de 96 poços e usado para a medida de absorbância ($\lambda = 405 \text{ nm}$) em um leitor de microplaca Victor³ (1420 Multilabel Counter/Victor³ – Perkin Elmer). As medidas de absorbância do sobrenadante para 0 e 100% de hemólise foram obtidas com 80 µL da solução 1,5% de hemácias em 50 µL de PBS e Triton X-100 0,1%, respectivamente. O valor

da absorbância a 405 nm das hemácias em PBS e Triton X-100 0,05% foi determinado pela média da triplicada (modificado de Hao et al., 2009). A porcentagem de hemólise foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{Hemólise} = \frac{(\text{ABS}_{405\text{nm}} \text{ da solução com peptídeo} \quad -- \quad \text{ABS}_{405\text{nm}} \text{ em PBS})}{(\text{ABS}_{405\text{nm}} \text{ em Triton } 0,1\% \quad -- \quad \text{ABS}_{405\text{nm}} \text{ em PBS})} \times 100$$

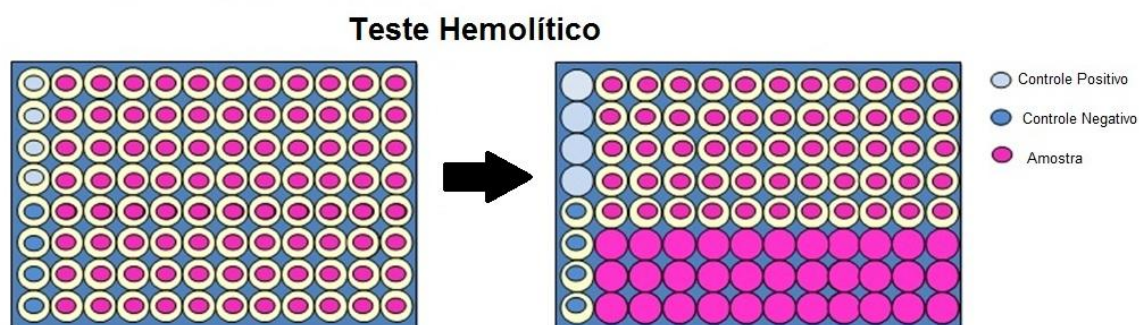


Figura 12 - Esquema de ensaio hemolítico em microplaca.

3.4.6 Atividade Biológica de Rondonina

3.4.6.1 Avaliação da Atividade antifúngica da Rondonina em combinação com Gomesina

A atividade antifúngica *in vitro* dos compostos antimicrobianos foi avaliada pelo ensaio modificado de inibição de crescimento em meio líquido M-27A, de acordo com o “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)”. Inicialmente foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) dos peptídeos separadamente, utilizando o meio PDB (1/2 PDB: 1.2 g dextrose de batata in 100 ml of H₂O, pH 5; 79 mOsM) contendo 10³ leveduras/mL de *C. albicans* MDM8 e em fase logarítmica de crescimento. Após a determinação da CMI (gomesina 0,6 µM, rondonina 25 µM), foi realizado um novo teste em microplaca de 96 poços com a combinação dos peptídeos em estudo conforme descrito anteriormente (material e Métodos 3.3.2 com modificações). A mínima concentração inibitória (CMI) foi expressa como intervalo de concentrações [a]-[b], onde [a] é a máxima concentração do peptídeo testada na qual os microorganismos estão crescendo e [b] é a menor concentração que causa 100% de inibição do crescimento.

Para determinar o índice de fração inibitória (IFI) da combinação entre rondonina e gomesina em diferentes proporções foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{IFI} = (\text{MCI droga A em combinação} / \text{MCI droga A sozinha}) + (\text{MCI droga B em combinação} / \text{MCI droga B sozinha})$$

Valores abaixo de 0,5 foram interpretados como havendo um efeito sinérgico entre os compostos, valores entre 0,5 a 4 como indiferentes e valores maiores que 4 como um efeito antagonista entre os compostos (Johnson et al., 2004).

3.4.6.2 Atividade Antifúngica pH dependente

Para avaliar se rondonina apresentava atividade antifúngica pH dependente, foi realizado o ensaio de inibição em meio líquido de acordo com Material e Métodos 3.3.2, com a concentração inicial de 100 μM do peptídeo rondonina em diluição seriada utilizando o meio de cultura PDB (1/2 PDB: 1.2 g dextrose de batata in 100 ml of H_2O ; 79 mOsM, ajustado em diferentes pH (pH=4, pH=5, pH=6, pH=7 e pH=8)) para *C.albicans* MDM8 e PB (*Poor Broth* - PB: 1.0 g Peptona em 100 ml de H_2O , 86 mM NaCl; 217 mOsM, ajustado em diferentes pH (pH=4, pH=5, pH=6, pH=7 e pH=8)) para a bactéria Gram-negativa *E.coli* SbS363 e a bactéria Gram-positiva *M. luteus* A270.

3.4.6.3 Interação com Membranas Artificiais Lipídicas

Para avaliar o possível mecanismo de ação do peptídeo rondonina em membranas artificiais lipídicas, tiramos proveito da presença do aminoácido tirosina presente na sequência primária, uma vez que esse apresenta leitura de fluorescência natural. Esses estudos foram realizados no Laboratório de Biologia Estrutural – IQ –USP.

3.4.6.3.1 Preparação das membranas modelos – Vesículas Unilamelares Grandes (LUV)

As vesículas unilamelares grandes (LUVs, *large unilamellar vesicles*) ou lipossomas, foram preparadas com diferentes porções dos fosfolipídios 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoclina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (POPG). A parte polar de POPC é zwitteriônica, enquanto a parte polar em POPG é negativamente carregada (Figura 13).

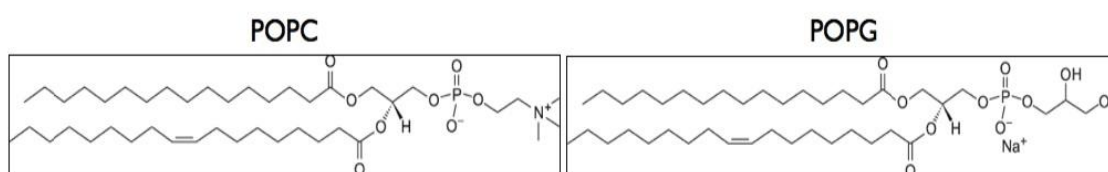


Figura 13 – Estrutura dos fosfolipídios utilizados para a preparação das vesículas artificiais. Em POPC a região polar é zwitteriônica e em POPG a parte polar é aniônica.

Os fosfolipídios foram pesados em tubos de 1,5 mL e dissolvidos em clorofórmio. A solução foi seca sob jato de nitrogênio a baixa pressão de modo que os fosfolipídios ficassem aderidos à parede interna do tubo e o material mantido “overnight” sob vácuo dentro de uma câmara. Os fosfolipídios foram então ressuspendidos, sob forte agitação e submetidos a cinco ciclos de choque térmico entre nitrogênio líquido e banho a 40 °C. O material então foi aplicado em um extrusor (Avestin) contendo duas membranas de policarbonato com poros de 100nm de diâmetro e extruído 30 vezes.

3.4.6.3.2 Titulação da Rondonina com LUVs

Espectro de fluorescência foi adquirido à temperatura ambiente em um equipamento Hitachi F-4500 ligado a um computador. O comprimento de onda de excitação foi 280 nm e de emissão escaneado de 305 a 450 nm, a 60 nm/min.

O espectro foi tirado sob as mesmas condições na ausência do peptídeo onde foi subtraído do espectro da amostra e o efeito da diluição corrigido. A concentração do peptídeo foi de 15 μM e a concentração dos lipídios variaram de 0 a 1,5 mM. Os tampões utilizados foram Fosfato 10 mM para pH=7 e Acetato 10 mM para pH=5.

3.4.6.4 Mecanismo de Ação do Peptídeo Rondonina

3.4.6.4.1 Extração de DNA

Alíquotas dos microrganismos, *E. coli* SBS363, *M. luteus* A270 e *C. albicans* MDM8 (10^7 células) foram mantidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso. Cada alíquota foi inoculada em 4 mL de meio rico Luria-Bertani (LB) e expandida por 20 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação. 500 μL contendo microrganismos foram transferidos para outro tubo contendo 20 mL de meio LB e incubados por 8 horas sob agitação. Todo o conteúdo foi submetido à centrifugação a 20.000 g. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi ressuspenso em 500 μL de tampão de Lise (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 50 μL SDS 10%). Os tubos foram colocados em um banho gelado de etanol por 5 minutos (até que ficassem completamente congelados), e então submetidos a um banho seco a 95°C para um descongelamento rápido. O processo foi repetido mais uma vez, e os tubos foram submetidos à agitação vigorosamente. Cada alíquota foi tratada com 10 μL of Proteinase K (10 mg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e mantidas por 2 horas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ em banho seco. Foi adicionado o mesmo volume de fenol equilibrado pH 7,49 – 7,79 (Invitrogen – Canadá) e misturado por inversão do tubo até que as fases estivesse completamente homogêneas. As amostras foram centrifugadas a 4.000g por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase superior aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo e 250 μL de fenol equilibrado e 250 μL clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v), novamente misturado até as fases se tornarem homogêneas e centrifugado novamente a 4.000g por 5 minutos e removida a fase aquosa. A fase aquosa foi transferida para num novo tubo contendo 500 μL clorofórmio/álcool isoamílico (24:1v/v), centrifugado a 4.000 g por 5 minutos. 250 μL de acetato de amônio gelado 7,5M e 750 μL de etanol 100% foram adicionados a fase aquosa e precipitado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. O pellet de DNA foi lavado com 1 mL de etanol gelado 70% e centrifugado novamente a 10.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. O pellet de DNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em água ultrapura. A contaminação de RNA foi removida adicionando 1 μL de RNase A (20mg/mL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e incubada por 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.6.4.2 Extração de RNA total da levedura *Candida albicans* MDM8

O mesmo protocolo foi aplicado para a expansão do microrganismo usado para a extração de RNA. O pellet celular foi mantido a -80 °C até o uso. Nós adicionamos 500 µL do Tampão A (50mM NaOAc, 10 mM EDTA, 1% SDS e 1% DEPC). Os tubos foram homogeneizados vigorosamente por 30 segundos e adicionados 600 µL de fenol equilibrado pH 25 °C 7,49 – 7,79 (Invitrogen - Canada) a 65 °C. A amostra foi mantida a 65 °C por cinco minutos e centrifugada a 14,000 g por 30 segundos. Esse procedimento foi repetido mais uma vez. A fase aquosa foi removida para outro tubo e então adicionado 300 µL de fenol equilibrado 300 µL de clorofórmio e centrifugado a 14.000 g por três minutos. A fase aquosa foi removida e adicionado 50 µL de 3 M NaOAc (pH 5.2) e 1 mL de etanol gelado 100%. O RNA foi precipitado a -20 °C por 15 minutos. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 14.000 g. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e seco por 10 minutos a temperatura ambiente. O pellet de RNA pellet foi ressuspendido em 400 µL de água ultrapura DEPC (Diethylpyrocarbonate) tratada com 40 µL de 3 M NaOAc e 1 ml de etanol gelado 100%. O RNA foi precipitado novamente a -20 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e seco a temperatura ambiente. Finalmente, o pellet de RNA foi lavado com 1 mL etanol 70% e centrifugado a 14.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e seco a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspendido em água ultrapura DEPC e aquecidos a 65 °C por 10 minutos para facilitar a solubilização do RNA. Para obter somente RNA para o ensaio de retardo em gel de agarose, nós usamos DNase I, livre de RNase, suplementada com MnCL² (1 U/µL) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

3.4.6.4.3 Extração de mRNA da levedura *Candida albicans* MDM8

Nós usamos 890 ng/µl de RNA total para a extração de mRNA. A extração foi realizada usando o kit “Dynabeads[®] mRNA DIRECT[™]” (Ambion, Life Technologies, USA).

3.4.6.4.4 Ensaio de retardo de migração DNA/RNA em gel agarose

O DNA de levedura e bactérias foram purificados de acordo com os métodos acima. O DNA genômico (aproximadamente 100 ng) or RNA total (89 ng/μL) foram misturados com quantidades crescentes do peptídeo (1.2 μg, 2.4 μg, 3.6 μg, 4.8 μg, 6,2 μg, 12 μg). As misturas foram incubadas a temperatura ambiente 10 minutos, e então submetidas a eletroforese em gel de agarose 0.8% em tampão TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, e 1 mM EDTA).

3.4.6.4.5 Ensaio de retardo de migração mRNA em eletroforese capilar

O mRNA extraído (7,5 ng) foi incubado com o peptídeo sintético (6,2 μg) a temperatura ambiente por 10 minutos, e então submetido a eletroforese capilar usando mRNA Pico Series II no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA). Somente o peptídeo sintético rondonina (6,2 μg) foi usado como controle.

3.4.7 Avaliação da Atividade Citotóxica da Rondonina

3.4.7.1 Citotoxicidade

Estes estudos foram realizados no Laboratório de Parasitologia e Malacologia do Instituto Butantan. Para avaliação da citotoxicidade, foi adicionada ao cultivo de células VERO a concentração inicial de 200 μM do peptídeo rondonina em diluição seriada. A morfologia dos cultivos foi acompanhada através de observação diária em microscópio óptico invertido em aumento de 100 x e 200 x. No final do cultivo, os poços foram corados com cristal de violeta (0,25%) e fotografados, determinando as alterações morfológicas ocorridas nas células.

3.4.7.2 Atividade Antitumoral

Estes estudos foram realizados no Laboratório Especial de Ciclo Celular localizado no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan.

3.4.7.2.1 Linhagens celulares

As células Y1 são derivadas de tumor funcional do córtex adrenal de camundongo (Yasumura et al., 1966). Foram obtidas da *American Type Culture Collection (Rockville, MD)* expandidas e mantidas no banco de células do laboratório.

A HeLA foi a primeira linhagem imortal de células humanas, extraídas do colo do útero de Henrietta Lacks, diagnosticada com câncer cervical (Caldas, 2010). Foram obtidas da *American Type Culture Collection (Rockville, MD)* expandidas e mantidas no banco de células do laboratório.

3.4.7.2.2 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas fazem parte do banco de células que o laboratório mantém sob congelamento em tanques contendo nitrogênio líquido. Sempre que necessário, uma alíquota (*vial*) de cada uma das linhagens foi descongelada rapidamente em banho-maria a 37 °C, e imediatamente após descongelar, o conteúdo de cada um dos *vials* foi colocado em uma garrafa de poliestireno, própria para cultura celular. No caso das linhagens utilizadas, Y1 e HeLA, foi adicionada a cada uma das garrafas a quantidade necessária de meio de cultura DMEM (Meio DMEM suplementado com 1,2 g/l de NaHCO₃, 25 mg/ml de ampicilina, 100mg/ml de sulfato de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB)). As células foram acondicionadas na estufa a 37 °C numa atmosfera com 5% de CO₂ e, após a adesão das células à garrafa, o meio de cultura foi substituído por meio fresco previamente aquecido para a retirada do DMSO presente no meio de congelamento. Realizado este procedimento as células voltam a estufa para o crescimento da população celular. Durante o crescimento celular o meio de cultura foi renovado a cada 2 ou 3 dias até que as células atingissem a confluência necessária para realização dos experimentos e/ou sub cultivo. Nesse ponto, após a retirada do meio de cultura, as células foram lavadas com PBSA e liberadas da garrafa por tripsinização permitindo assim o sub - cultivo e/ou plaqueamento para realização dos ensaios desejados. A quantidade de células foram contadas e

analisadas quanto ao seu tamanho utilizando o contador de partículas *Z2 Coulter Counter*[®] (Beckman).

3.4.7.2.3 Ensaio colorimétrico MTT para avaliação de citotoxicidade

Para realização dos ensaios de MTT, foram utilizadas microplacas de 96 poços onde foram plaqueadas 80 µl de 10⁴ células por poço e mantidas 24 horas em estufa a 37 °C numa atmosfera com 5% de CO₂ para adesão e confluência das células. Após foi adicionado 20 µl do peptídeo sintético rondonina (200 µM) em diluição seriada para avaliar a citotoxicidade contra as duas linhagens celulares tumorais. Também foram avaliadas todas as frações obtidas por purificação nas eluições de 5% ACN, 40% ACN e 80% ACN do plasma. Como controle negativo para citotoxicidade foi utilizado somente o PBSA e controle positivo DMSO (20 µl). Um poço foi deixado em branco para leitura do DMSO.

Após incubação por 48 horas estufa a 37 °C numa atmosfera com 5% de CO₂, todos os poços foram lavados duas vezes com PBSA e adicionados 100 µl de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e 0,5 mg/mL de MTT, após 4 horas de incubação, os poços foram fotografados e a solução de MTT foi retirada e adicionado DMSO 100% em todos os poços. A placa foi mantida sob agitação por 5 minutos. Após agitação, a placa foi mantida em repouso para estabilização da cor. A leitura foi feita a 595 nm em leitor de microplaca Victor³ (1420 Multilabel Counter/Victor³ – Perkin Elmer).

3.4.7.3 Atividade Antiviral

Células L929, VERO e MDCK foram cultivadas em placas de 96 pocos contendo meio de cultura L-15 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. As células confluentes foram inoculadas com 9 µM ou 24 µM de rondonina. Depois de uma hora, as células foram infectadas com diluições seriadas dos vírus EMC (encephalomyocarditis vírus), Sarampo (Edmonston) ou Influenza (H1N1), respectivamente. As placas foram

observadas diariamente quanto ao aparecimento do efeito citopático e após 72 horas a 120 horas foram coradas com cristal de violeta (0,25%) e fotografadas.

3.5 Hemocianina

3.5.1 Transcriptoma

3.5.1.1 Extração de RNA, construção da biblioteca e sequenciamento

A hemolinfa de 2 aranhas fêmeas (*Acanthoscurria rondoniae*) foi extraída na presença de tampão anticoagulante e os hemócitos separados por centrifugação a 800g a 4 °C por 15 minutos. O pellet dos hemócitos foi colocado em tubo eppendorf e imediatamente congelado -80 °C. O RNA total foi extraído usando o reagente TRIzol® (Ambion, Life Technologies). A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese capilar em chip RNA 6000 Nano em um equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer e quantificado pelo kit Quant-iT™ RiboGreen® RNA (Invitrogen, Life Technologies Corp.). A biblioteca de cDNA foi gerada seguindo o protocolo do kit padrão TruSeq Stranded RNA Sample Prep (Illumina, San Diego, CA). Resumidamente, o RNA mensageiro foi extraído pela cauda poli-A, posteriormente foi fragmentado e o cDNA sintetizado usando hexâmeros randômicos, finalmente foram incorporados adaptadores apropriados para amplificação e sequenciamento. A distribuição do tamanho da biblioteca de cDNA foi avaliada no 2100 Bioanalyzer com o ensaio DNA1000 (Agilent Technologies). O ABI StepOnePlus Real-Time PCR System foi usado para quantificação da biblioteca antes do sequenciamento. As bibliotecas de cDNA foram sequenciadas no Illumina HiSeq 1500 System, em 300 ciclos de 2*151bp pareados, de acordo com o protocolo padrão do fabricante (Illumina).

3.5.1.2 Bioinformática: montagem e anotação dos contigs

O arquivo de leituras gerados foi extraído utilizando o CASAVA-1.8.2 (Illumina), com filtro de qualidade Q30. A montagem dos contigs foi feita utilizando o Trinity (Grabherr et al., 2011). Os contigs foram anotados por script de Blast

(Altschul et al., 1990) utilizando banco de dados de Aracnídeos do Uniprot. A curagem da anotação foi feita manualmente, separando os contigs em duas categorias: hemocianina e outros.

Após o pré-processamento e aplicação de filtros para obtenção de sequências de alta qualidade, foram utilizados programas especializados para gerar estatísticas, novas leituras pareadas e leituras ajustadas pareadas. A montagem foi realizada utilizando o software Trinity (versão 2.1.1) com parâmetros de “paired-end”. Para a montagem foram utilizados todos os reads (paired-end e únicos) que passaram pelos filtros.

Os reads da amostra foram utilizados para a montagem *De novo*, e os transcritos obtidos foram utilizados como referência para as análises de expressão gênica. A análise de expressão condição-específica foi realizada através do alinhamento dos reads *paired-end* da amostra contra a montagem do transcriptoma de referência, seguido pela estimativa da abundância utilizando o método RSEM (RNA-Seq Expectation Maximization). O RSEM tem o objetivo de estimar o nível de expressão aproximado para cada transcrito, gerando o FPKM (*Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped*) para cada transcrito. Este método é utilizado devido à geração de isoformas, variantes de *splicing* e genes duplicados em montagens *De novo* de transcriptomas, e utiliza um processo iterativo para determinar reads fracionalmente para cada transcrito baseado na probabilidade dos reads sendo derivados de cada transcrito, levando em consideração o viés na posição gerado pelo protocolo de criação da biblioteca de RNA-seq.

3.5.1.3 Sequenciamento das subunidades da Hemocianina

As sequências das sete subunidades de hemocianina da aranha *Aphonopelma hentzi*, já conhecidas e depositadas no catálogo de informações de proteínas Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), foram armazenadas em um arquivo *.fasta e utilizadas como referência para a busca com a ferramenta Blastp nos contigs montados de *A. rondoniae*.

3.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Microscopia eletrônica representa um método direto, que significa que pode se obter imagens de macromoléculas no microscópio e não está restrito a somente padrões de difração do objeto de interesse, como no caso da cristalografia, (Figura 14) para obter informações estruturais de macromoléculas biológicas (Blundell, Johnson, 1976).

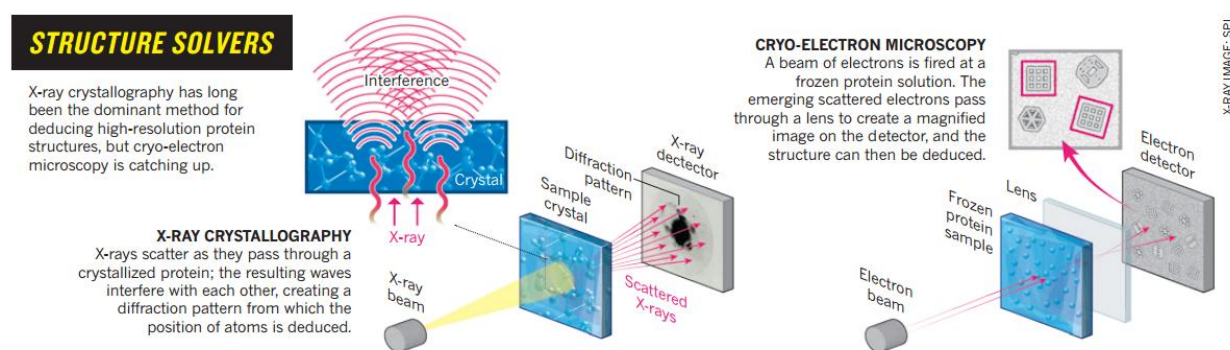


Figura 14 – Obtenção da imagem por técnicas de Cristalografia e “cryo-EM”. Diferenças entre obtenção da imagem pelas técnicas de Cristalografia (esquerda), refração do cristal e “cryo-EM” (direita), projeção da imagem (Callaway, 2015).

3.5.2.1 Análise por contraste negativo (negative stain)

Para análise em microscopia eletrônica de transmissão realizada no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), a hemolinfa, aproximadamente 300 μL , foi retirada na ausência de tampão anticoagulante, centrifugada por 10 min à 14.000 rpm. O sobrenadante foi então acondicionado em banho de gelo até o uso.

Na preparação das grades de microscopia, a amostra obtida foi diluída 1.000 vezes. Foram utilizadas grades com um filme fino de carbono, tratadas no Easy Glow (Figura 15) por 20 segundos a uma corrente de 5 mA para carregar negativamente as grades.

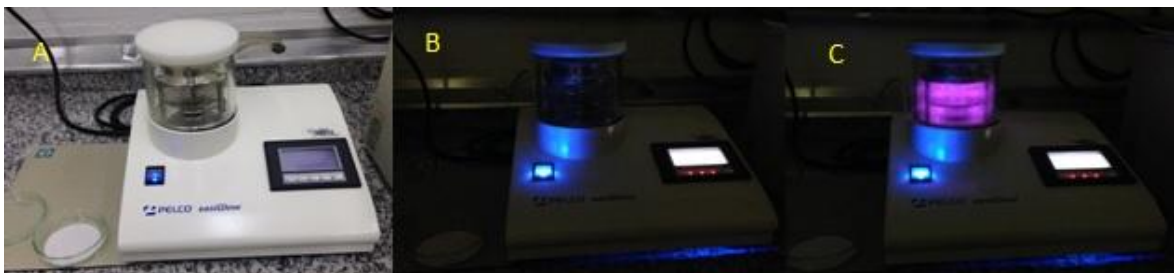


Figura 15 - Easy Glow. A – Equipamento usado para preparar as grades negativamente; B – Ausência de corrente nas grades; C – Presença de corrente nas grades.

Foi utilizado um protocolo simples para o preparo da amostra de contraste negativo (*negative stain*):

- Aplicamos 3 μL de amostra na grade por 60 segundos;
- Secamos a grade tocando na lateral com um papel filtro;
- Lavamos a grade três vezes com tampão “Tris Stabilizing Buffer” pH 7,4 (50 mM Tris, 5 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2) por 30 segundos cada lavagem;
- Secamos novamente a grade tocando na lateral com um papel filtro entre cada lavagem;
- Aplicamos 3 μL de Acetato de Uranila (2%) por 30 segundos (repetir esse passo);
- Secamos novamente a grade tocando na lateral com um papel filtro.

As grades foram analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL modelo JEM 2100 Lab6 operando à voltagem de aceleração de 200 kV e as imagens obtidas através da câmera CCD Gatan ES500W (Gatan, USA).

3.5.2.2 Análise por microscopia criogênica

3.5.2.2.1 Preparo de amostra da Hemocianina

A hemolinfa foi retirada na ausência de tampão anticoagulante com uma seringa apirogênica. Após, a Hemolinfa foi centrifugada por 3.300 g por 30 minutos a 4 °C para separar hemócitos do plasma. O sobrenadante (plasma) foi submetido à ultracentrifugação a 132.000g a 4 °C por 12 horas.

O pellet de hemocianina foi ressuspendido em tampão estabilizante Tris (50 mM TRIS, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7,4) sob agitação 4 °C por 12 horas.

3.5.2.2.2 *Preparo de Amostra no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano – CNPEM – Campinas SP)*

A quantificação da hemocianina foi realizada no Nanodrop usando 1 µL da amostra (~109 mg/mL). Nós diluímos até 1 mg/mL. A amostra foi mantida a 8°C até o uso.

As grades foram preparadas pelo Dr. Alexandre Cassago e com a supervisão do Dr. Rodrigo Villares Portugal. Cerca de 3 µL da amostra foi utilizado para o preparo das grades (C-flat R2/2 - 400mesh) utilizando o equipamento Vitrobot Mark IV (FEI) a 100% de humidade a 22 °C. As grades foram secas utilizando uma etapa de contato de 2.5 segundos com papel filtro 597 e força de contato de -10. As grades foram então usadas para uma primeira coleta de dados para avaliar a qualidade no preparo e outras estocadas em nitrogênio líquido e enviada para o NeCEN-LU (Holanda) em dewar seco para a aquisição da segunda coleta de dados.

3.5.2.2.3 *Aquisição de dados LNNano*

A aquisição de dados da hemocianina foi realizada no microscópio Jeol JEM-2100 operando a 200 kV e utilizando uma câmera F-416 CMOS (TVIPS).

Tamanho do pixel: 1.78 Å

Faixa de defocus: -1.5;-5 (µm)

Magnificação: 60 K

Tamanho do conjunto de dados: 5.12GB; 307 imagens foram consideradas usáveis

3.5.2.2.4 *Aquisição de dados NeCEN*

A aquisição de dados da hemocianina foi realizada no microscópio Titan Krios 1 (FEI) no Netherlands Centre of Electron Nanoscopy (NeCEN-LU) operando a 300 KV e utilizando uma câmera 4k x 4k (16Mp) de detecção direta Falcon-2 sem correção de aberração esférica (Cs corretor). Foram coletadas 7 frames por região de exposição sendo 5 regiões por *whole* como ilustrado na Figura 16, sendo 5 regiões expostas e coletadas com um defocus de aproximadamente -1.0 µm (roxo) e

uma mesma região com defocus de aproximadamente $-3.0 \mu\text{m}$ (verde). As imagens de baixo defocus ($\sim 1.0 \mu\text{m}$) são aquelas que maior resolução, ou seja, as que levam os conjuntos de dados ao maior detalhamento atômico, enquanto que as imagens de alto defocus ($\sim 3.0 \mu\text{m}$) são aquelas que não possuem informação de alta resolução, porém possuem melhor contraste, o que facilita a visualização das partículas e no processamento de dados inicial. As grades foram estocadas em nitrogênio líquido até o uso.

Tamanho do pixel: 1.0445476 \AA

Faixa de defocus : -1; -3 (μm)

Aberração esférica: 2.7 mm

Dose integrada ($e/\text{A}^2/\text{s}$): 50-60

Magnificação: 58 K

Tamanho do conjunto de dados: 998.3 GB; 2254 filmes foram considerados usáveis.

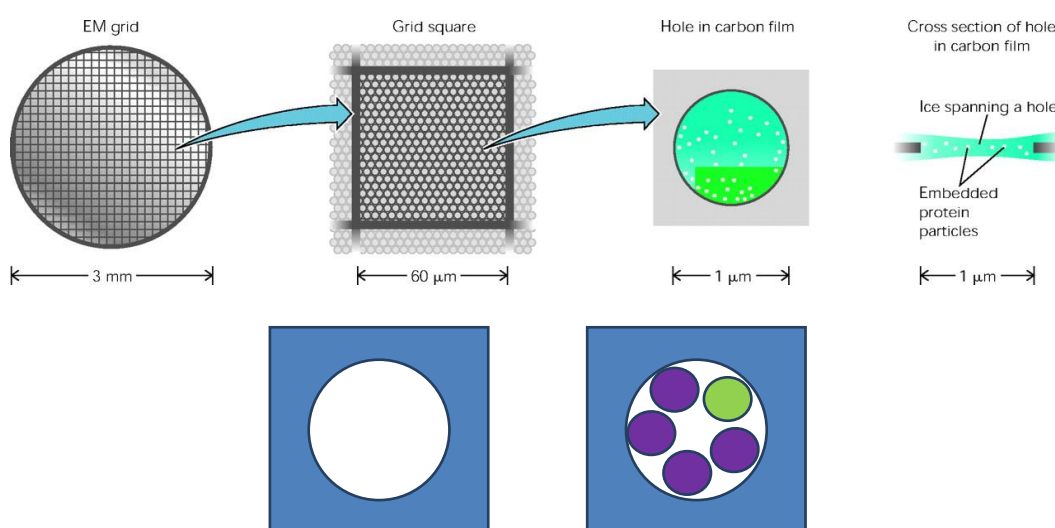


Figura 16 - Esquema de uma grade de microscopia: A grade de aproximadamente 3 mm possui cerca de 400 quadrados (square) de aproximadamente $60 \mu\text{m}$ onde cada um possui inúmeros buracos de $1 \mu\text{m}$ onde é formado um filme fino de solução contendo a amostra de interesse. Abaixo, o esquema de como foram realizadas as coletas de dados, onde em um único buraco são coletadas 5 diferentes imagens de 7 frames cada uma. As imagens coletadas nas regiões em roxo foram em baixo valores de defocus ($\sim -1.0 \mu\text{m}$), ou seja, coleta de alta resolução. Enquanto que a região representada em verde foi coletada tanto em baixo quanto em alto defocus ($\sim -3.0 \mu\text{m}$), o que não leva a altas resoluções mas favorece o processamento de dados (Serrao, 2015)

Utilizando o programa Atlas (FEI) para mapear as regiões da grade a serem coletadas, e *EPU for Life Sciences* (FEI), utilizado para aquisição automática dos

dados, os frames foram coletados com a participação do especialista Dr. Roman Koning (Leiden University Medical Center – LUMC). Os conjuntos de dados coletados (~ 1 TB) em formato .mrc (FEI_EPU) foram agrupados em um único arquivo e convertidos para arquivos IMAGIC (.img) para dar sequência ao processamento de dados.

3.5.2.2.5 *Processamento de dados*

Após a aquisição das imagens, inicia o ciclo de processamento. Como primeiro passo, deve se trabalhar nas imagens obtidas, como correção da câmera (Afanasyev et al., 2015), alinhamento dos frames e soma dos frames em filmes em seguida deve-se selecionar as imagens com partículas. É necessário fazer a correção do CTF (Função de transferência de contraste – *Contrast Transfer Function*), que é necessária para inversão das fases, aplicar filtros e normalização das imagens com o objetivo de se obter um conjunto de dados homogêneo.

O próximo passo para o processamento se dá com a seleção de partículas (van Heel, 1982), estas podem apresentar baixa relação sinal-ruído, sendo necessária a soma das imagens semelhantes para obter um aumento na relação sinal-ruído e assim apresentar um melhor contraste. As partículas devem ser divididas em pequenos grupos (classes) que apresentem a mesma orientação da molécula para serem somadas. A soma das imagens de mesma classe são chamadas *classsums*.

A primeira classificação deve ser feita sem referências para evitar a introdução de tendências no conjunto de dados. Para essa etapa é utilizado a classificação por estatística multivariada (MSA – *Multivariate Statistical Analysis*) (Borland, van Heel, 1990; van Heel et al., 2009; van Heel, Frank, 1981) onde partículas semelhantes em orientações semelhantes serão somadas. Para melhor alinhamento dessas partículas também é necessário utilizar referências criadas a partir de uma primeira classificação para uma classificação estatística multivariada (MRA – *Multireference Alignment*), que irá alinhar translacionalmente e rotacionalmente o conjunto de partículas (van Heel, Stöffler-Meilicke, 1985).

Em seguida serão realizados novos ciclos de classificação por MSA, seleção de classes para serem utilizadas como referência e MRA (Schatz et al., 1997).

Após diversos ciclos de MSA-MRA, as classes consideradas boas, com relação sinal-ruído melhorados em relação ao conjunto de dados, foram utilizadas

para a próxima etapa de reconstituição angular (Schatz et al.,1995; Serysheva et al.,1995; van Heel et al.,2000) que corresponde a atribuição dos ângulos Euler das projeções que definem sua orientação espacial, obtendo-se assim uma relação angular entre as imagens escolhidas (van Heel, 1987).

Baseando-se na relação angular, o modelo estrutural foi obtido. Esse modelo foi usado para gerar projeções bidimensionais para nova atribuição de ângulos e seleção de novas partículas do conjunto de dados para um novo ciclo de MSA-MRA para refinamento do modelo tridimensional (Cheng, 2015).

O processamento de dados foi todo realizado utilizando o pacote de programas IMAGIC 4D (van Heel et al.,2012) e sob a supervisão do Prof. Dr. Marin van Heel e seu aluno de doutorado Pavel Afanasyev. O *pipeline* do processamento de dados utilizado está representado na Figura 17.

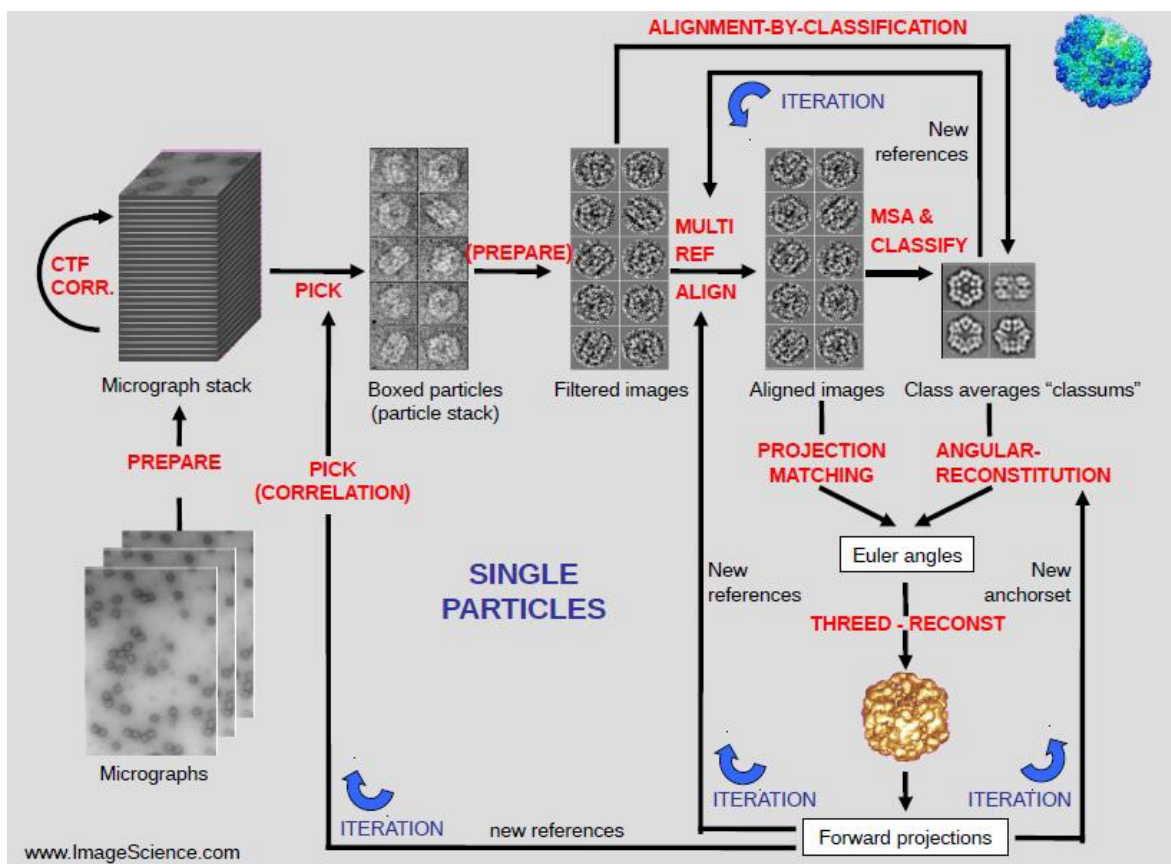


Figura 17 – Esquema geral do processamento de dados utilizado neste projeto: (modificado de www.imagescience.de/manuals/smi_2014_brazil_school.pdf)

3.5.3 Purificação da Hemocianina

A hemolinfa foi coletada na presença de tampão citrato e centrifugada por 30 minutos a 800 g à 4 °C para a remoção das células (hemócitos). O sobrenadante foi separado e submetido à ultracentrifugação a 280000 xg por 4 horas a 4 °C. O “pellet” com a hemocianina foi ressuspendido em água ultrapura e acondicionado a 8 °C até o uso para experimentos de eletroforese SDS-PAGE e eletroforese bidimensional.

Para estudos realizados em microscopia, a hemolinfa foi coletada na ausência de tampão citrato, centrifugada a 14.000 rpm e o sobrenadante obtido foi mantido em banho de gelo até o uso.

3.5.3.1 *Quantificação da Hemocianina*

A concentração da hemocianina foi determinada pelo protocolo de Bradford, 1976. Resumidamente, uma solução de BSA (Soro albumina bovina) a 0,1 mg/mL em diferentes concentrações (1µg – 30µg) foi utilizada como controle para construir a curva padrão. A absorbância a 595 nm foi utilizada para leitura em um leitor de microplacas Victor³ (1420 Multilabel Counter/Victor³ – Perkin Elmer). O mesmo procedimento foi utilizado para a proteína e a concentração proteica foi calculada a partir da equação da reta da curva padrão.

3.5.3.2 *Eletroforese em Gel de Poliacrilamida*

As proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença ou ausência de SDS (Laemmli, 1970), utilizando mini-gel de 8 cm x 8,5 cm x 1,5 mm em cuba Digel DGV-10. As amostras foram diluídas em um mesmo volume de tampão de amostra (4 vezes concentrado) (350 mM de Tris/HCl; 30% de glicerol; 1,2 mg de azul de bromofenol com ou sem β-mercaptoetanol). O material foi aplicado em um gel de empilhamento 4,5% e gel de separação de 6% de poliacrilamida e submetido à eletroforese com corrente constante de 80 volts. Os géis foram corados com azul de Coomassie R-250 e também com nitrato de prata. Foi utilizado o marcador de peso molecular Fermentas (Page RulerTM Prestained Protein Ladder).

3.5.3.3 Eletroforese Bidimensional da Hemocianina

Para o experimento de eletroforese bidimensional, foi utilizado o sistema da GE Healthcare, composto dos módulos IPGphor (1ª. Dimensão, focalização isoelétrica) e (2ª. dimensão, eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida) segundo procedimento descrito por Serrano et al.. (2005).

Focalização isoelétrica (1ª. dimensão): Para a isoeletrofocalização das proteínas foi utilizada fita de gradiente de pH imobilizados (*IPG strips*, GE Healthcare) de 7cm. A fita variando de 3 a 10 ou de 4 a 7 foi reidratada com a solução de hemocianina em água ultrapura para um volume final de 125 μL utilizando o reagente *Destreak solution*® (GE Healthcare) acrescido de 1% de solução de anfólitos (*IPG Buffer*, GE Healthcare). Após esta etapa, a solução foi incubada por 30 min a temperatura ambiente e depositada nas canaletas da cuba de reidratação. Em seguida, a fita foi coberta com óleo mineral e deixadas em repouso para reidratação a temperatura ambiente por 18 h. Após a remoção do excesso de óleo mineral, a fita foi montada na cuba de focalização isoelétrica IPGPhor (GE Healthcare), cobertas novamente com óleo mineral e submetida à focalização isoelétrica a 20 C, utilizando o programa de gradiente de voltagem constituído de três etapas: 500 V a 0,01kV/h; 4000V a 3,4 kV/h e 5000V a 4,6 kV/h.

Equilíbrio das fitas e eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (2ª. dimensão): Após a eletrofocalização, o excesso de óleo mineral foi removido da fita e esta foi colocada em tubo plástico para a etapa de equilíbrio. A seguir, as proteínas focalizadas foram reduzidas e alquiladas por meio de incubação no tampão de equilíbrio (TE: Tris-HCl 0,05M, pH 8,8, SDS 2%; glicerol 30%, ureia 6M) contendo DTT 20mg/mL (por 12 min, sob agitação) e, em seguida (por 10min, sob agitação) no TE (acrescido de azul de bromofenol 0,02%) contendo iodoacetamida 30 mg/mL. Para iniciar a 2ª. Dimensão, a fita foi colocada diretamente sobre a parte superior do gel de SDS-poliacrilamida (8%) coberta com agarose 0,5% com 0,5% de azul de bromofenol para a formação do stacking gel. A corrida ocorreu a temperatura ambiente, utilizando voltagem de 120 V.

A corrida foi interrompida quando o corante migrou aproximadamente 95% do comprimento do gel e este foi corado com Coomassie Brilliant Blue E-250 (GE Healthcare).

3.4.7 – Processamento da Rondonina

3.4.7.1 – Processamento da Rondonina a partir do Plasma

Para testar a produção de rondonina em aranha, o plasma foi separado dos hemócitos, diluído duas vezes em tampão CAC (10mM Cacodilato de Sódio, 5mM CaCl₂, pH=7) e tratado com ácido trifluoacético (TFA) para a concentração final de 0,1%. Plasma (1,4 mg) tratado com TFA em tampão CAC foi incubado por diferentes intervalos de tempo, como 24 h, 48 h, 72 h e 8 dias, a 4 °C. Como controle, o plasma foi tratado com TFA e então imediatamente centrifugado sem nenhuma incubação. Cada amostra foi centrifugada a 16.000 g por 20 minutos, e o sobrenadante resultante foi submetido a colunas descartáveis Sep-Pak C18 (0,5 g). As frações foram eluídas a 80% de acetonitrila com TFA 0,05% e concentradas em uma centrífuga à vácuo. As amostras secas foram dissolvidas em tampão de amostra e 50 µg de cada amostra foram submetidas a 20% “Acid-Urea PAGE” (Lee et al., 2003).

As amostras de 80% ACN também foram avaliadas por fase reversa em cromatografia líquida de alta eficiência (FR-CLAE) numa coluna Júpiter analítica (250mm x 4,6µm x 10 µ) com gradiente de 10% a 30% ACN (TFA 0,05%) em fluxo de 1mL/min em 30 minutos.

3.4.7.2 – Extração do conteúdo dos hemócitos

Os hemócitos obtidos através da centrifugação da hemolinfa, lavados duas vezes com tampão anticoagulante por centrifugação a 800 g por 15 minutos, foram macerados em água ultrapura com o auxílio de um pistilo e submetidos a rápido congelamento em gelo seco para ruptura dos grânulos e liberação de seu conteúdo. O sobrenadante obtido por centrifugação 16.000 g por 15 minutos foi liofilizado, ressuspendido em água ultra pura e acondicionado a -20 °C até o uso. A solução de hemócitos foi quantificada pelo equipamento Nanodrop[®] 2000.

3.4.7.3 – Atividade enzimática dos Hemócitos na Hemocianina

Para avaliar a atividade enzimática do conteúdo dos hemócitos, uma solução de hemocianina purificada por ultracentrifugação (0,125 mg/ml) foi incubada com 5 μ L da solução de hemócitos por 1 hora, 2 horas e 3 horas em banho-maria a 37 °C em tampão Tris (0,2M, pH8,8). Como controle foi utilizado somente hemocianina acrescida de tampão e hemócitos acrescido de tampão. Após o período de incubação, as amostras foram diluídas em tampão de amostra 4 x concentrado (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 300 mM SDS, 1 mM azul de bromofenol, 40% glicerol e 8% β -mercaptoetanol) e aquecidas a 90 °C durante 5 minutos.

O gel de empilhamento foi preparado na concentração de 4,5% e o de separação na concentração de 15% de poliacrilamida. Eles foram polimerizados em forma de mini-géis nas dimensões 85 mm x 80 mm x 1,5 mm, no sistema de eletroforese vertical DIGEL modelo DGV10. A corrida foi realizada em voltagem constante de 120 V e sob temperatura ambiente. O tampão de corrida utilizado era composto por 250 mM de glicina, 25 mM de Tris e 3 mM de SDS. Como referência para os valores de massa foi utilizado o marcador de peso molecular Fermentas (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder). O gel foi corado pela coloração de prata.

3.4.7.4 – Zimografia em gel de poliacrilamida copolimerizado com gelatina

A técnica de zimografia é uma técnica de eletroforese para avaliar a atividade proteolítica. A matriz em que as proteínas serão separadas, constituída de poliacrilamida, é copolimerizada com diversos substratos, nesse caso com gelatina, que é degradado pelas peptidases durante o período de incubação. A coloração azul do gel revela os locais de proteólise como faixas brancas sobre o fundo azul escuro (Leber, Balkwill, 1997). Para este ensaio, foi utilizado gel de poliacrilamida na concentração de 12%, contendo gelatina (na concentração final de 1 mg/mL). 5 μ L de hemócitos foi aplicados e 50 μ g de veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*) foi utilizado como controle diluídos em um mesmo volume de tampão de amostra (4 vezes concentrado) (350 mM de Tris/HCl; 30% de glicerol; 1,2 mg de azul de bromofenol). A eletroforese ocorreu em voltagem de 110 V, sob condições não redutoras. Após a corrida o gel foi lavado por 60 minutos em solução tampão Tris-

HCl 50 mM pH 7,4, contendo 2,5% do detergente Triton X-100, para a remoção do SDS presente no gel. Em seguida foi lavado 3 vezes por 5 minutos com água ultra pura para a remoção do Triton X-100 e incubado por 12 horas a 37 °C em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 com CaCl₂ 10 mM, NaCl 200 mM e 0,02% de IGEPAL. O gel foi submetido ao mesmo processo de revelação de bandas protéicas aplicado para SDS-PAGE, utilizando o corante Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma, St. Louis, USA). A descoloração foi feita até o aparecimento das áreas de atividade proteolítica.

3.4.7.5 – Zimografia em gel de poliacrilamida copolimerizado com caseína

Para avaliar a atividade caseinolítica dos hemócitos, foi preparado um gel de SDS-PAGE a 12% copolimerizado com caseína bovina (0,1%). Foi aplicado 5 µl de hemócitos e 50 µg de veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*) foi utilizado como controle diluídos em um mesmo volume de tampão de amostra (4 vezes concentrado) (350 mM de Tris/HCl; 30% de glicerol; 1,2 mg de azul de bromofenol). A eletroforese ocorreu em voltagem de 110 V. Após a corrida, o gel foi lavado em uma solução de Triton X-100 a 2,5% por 30 minutos para a remoção do SDS. Em seguida foi lavado 3 vezes por 5 minutos com água ultra pura para a remoção do Triton X-100 e incubado a 12 horas a 37 °C no tampão de reação (Tris-HCl 30 mM, pH 7,4, NaCl 200 mM e CaCl₂ 10 mM). O gel foi submetido ao mesmo processo de revelação de bandas protéicas aplicado para SDS-PAGE, utilizando o corante Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma, St. Louis, USA). A descoloração foi feita até o aparecimento das áreas de atividade proteolítica.

3.4.7.6 – Produção da rondonina e envolvimento dos hemócitos

Para avaliar se o peptídeo rondonina estava sendo processado a partir de enzimas, o plasma (1,325 mg) foi incubado em dois intervalos de tempo, 0 hora e 48 horas, como realizado no experimento anterior (Material e métodos 3.4.7.1 – Processamento da Rondonina a partir do Plasma). Utilizamos um coquetel de inibidores enzimáticos, contendo os inibidores específicos: *AEBSF-[4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride]* que inibe classe de serino

proteases (ex: tripsina, quimotripsina, plasmina, calicreina e trombina); Aprotinina que inibe classe de serino proteases (ex: tripsina, quimotripsina, plasmina, calicreina, elastase de leucócitos humanos, não inibe elastase pancreática); *Bestatin hydrochloride* inibe classe de aminopeptidases (ex: leucina aminopeptidase e alanina aminopeptidase), E-64 (*[N-(trans-Epoxy succinyl)-leucine 4-guanidinobutylamide]*) que inibe classe de cisteino proteinases (ex: calpaina, papaina, catepsina B e catepsina L), EDTA inibe classe de metaloproteases e *Leupeptine hemisulfate salt* inibe classe de cisteino proteinase (ex: plasmina, tripsina, papaína e catepsina B) (Sigma Aldrich), e o inibidor enzimático E64 isolado do coquetel(Sigma Aldrich), que é capaz de inibir enzimas da classe cisteíno proteinases, o mesmo utilizado no experimento feito por Lee e colaboradores (2003). Para avaliar a participação dos hemócitos, 5 µL deste foi incubado na presença de plasma, e dos inibidores. O peptídeo rondonina sintético foi avaliado sozinho para determinar o tempo de eluição. Para avaliar a produção do peptídeo, o material foi centrifugado a 12.000g por 20 minutos a temperatura ambiente e submetidos à purificação em fase sólida utilizando coluna sep-pak 0,5 g na eluição de 80%. Esta foi seca em concentrador a vácuo e ressuspensa em água ultrapura acidificada (TFA 0,05%) e avaliadas por cromatografia líquida de fase reversa de alta eficiência (FR-CLAE) utilizando uma coluna semi-preparativa Júpiter C18 (250 mm X 10 mm X 10 µ) em um gradiente linear de 10 a 40% ACN com fluxo 1,5 mL/min em 30 minutos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Peptídeos Antimicrobianos do Plasma

O plasma, após ser coletado e concentrado em um concentrador a vácuo (Savant Instrument, Inc) foi ressuscitado em água ultrapura acidificada (ácido trifluoracético - TFA 0,05%) (20 vezes o volume da hemolinfa coletada). A solução foi mantida sob agitação constante num banho de gelo por 30 minutos e centrifugado a 16.000 xg, a 4 °C, por 10 min. O sobrenadante obtido foi aplicado em uma coluna (5 g) descartável Sep-Pak C18, equilibrada com água acidificada, com o objetivo de pré-purificar as amostras. Três estágios de eluição foram realizados utilizando-se sucessivamente diferentes concentrações de acetonitrila (5%, 40% e 80%) em água acidificada.

As frações obtidas na etapa anterior foram concentradas em um concentrador a vácuo, ressuscitadas em água ultrapura acidificada e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A purificação por CLAE foi realizada a uma temperatura ambiente, utilizando o sistema UFLC-Shimadzu. A absorbância foi monitorada a 225 nm. As frações (5%, 40%, e 80% de acetonitrila) foram primeiramente aplicadas em uma coluna de fase reversa semi-preparativa Júpiter C18 (250 mm x 10 µm x 10 µ) e as eluições foram realizadas por gradientes de acetonitrila em água acidificada de 0 a 20%, 2 a 60% e 20 a 80%, respectivamente, por 60 min, sob um fluxo de 1,5 mL/min.

As frações correspondentes aos picos foram coletadas manualmente, secas em um concentrador a vácuo, e reconstituídas em água ultrapura. A presença de atividade antimicrobiana nessas frações foi determinada por ensaio de inibição em meio líquido, em cada etapa de purificação dos peptídeos utilizando-se *M. luteus*, *E. coli* e *C. albicans*, resultando em 15 frações com atividade antimicrobiana. Nenhuma das frações testadas apresentou atividade contra a bactéria Gram-negativa *M. luteus* A270.

Na eluição de 5% de acetonitrila, encontramos quatro frações com atividade antimicrobiana, sendo duas contra *C. albicans* MDM8 (P5-2 e P5-4) e duas contra *E.coli* SBS363 (P5-1 e P5-3) (Tabela 1) como mostra o perfil cromatográfico abaixo (Figura 18).

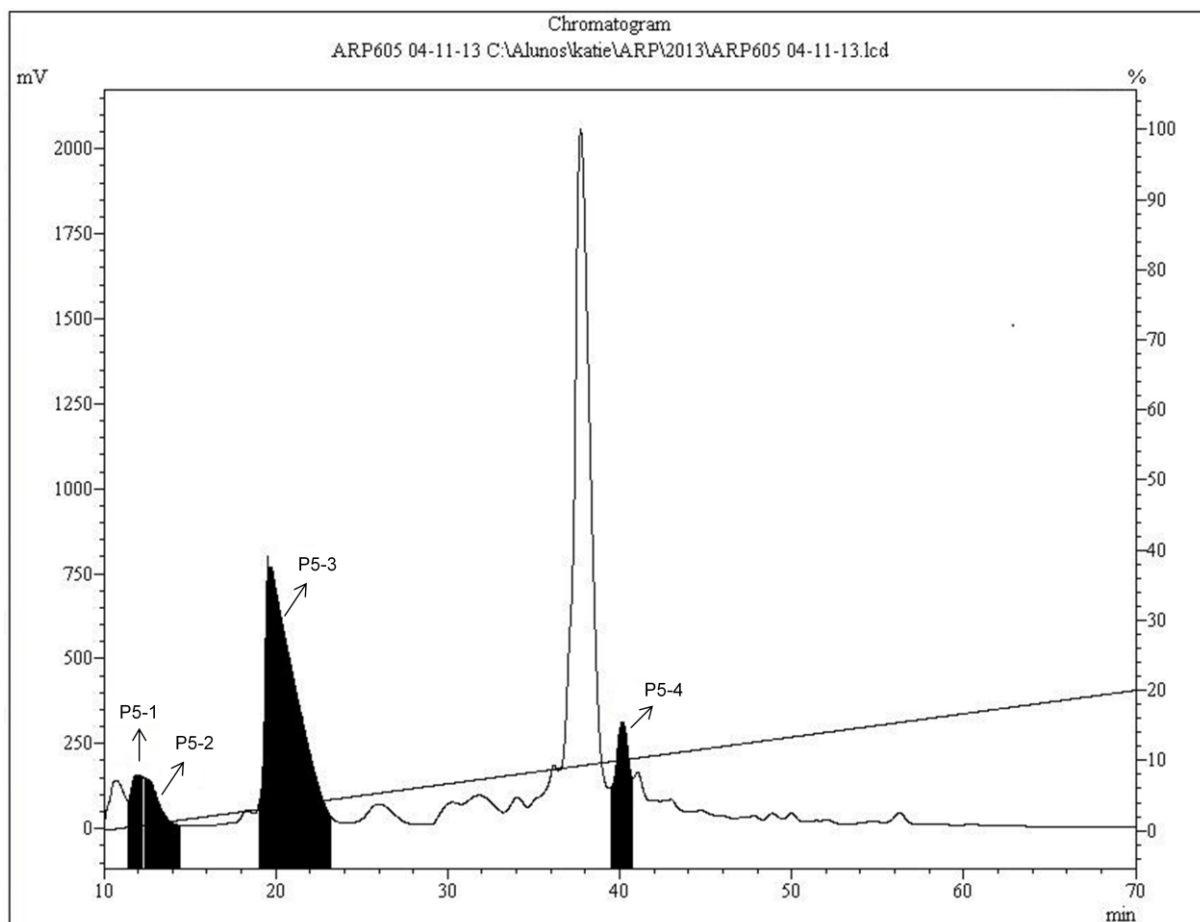


Figura 18 - Fracionamento de peptídeos antimicrobianos do plasma de *Acanthoscurria rondoniae*. Frações antimicrobianas obtidas do plasma eluídas com ACN 5% analisadas numa coluna semi-preparativa Júpiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 0 a 20% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min.

As Frações foram submetidas à digestão “in solução” (3.2.1 – Digestão “in solução”), e analisadas em um espectrômetro de massas acoplado a cromatografia líquida. Os perfis obtidos foram transformados em arquivos de extensão “mgf” e analisados no programa mascot utilizando o banco de dados Swissprot com filtro para Arachnida. Das quatro frações com atividade antimicrobiana, duas delas (P5-1, P5-2) mostram similaridade com subunidades de hemocianina (Tabela 1 e Tabela 4).

Tabela 1 – Tabela de atividade antimicrobiana do 5%, concentração e busca em banco de dados das frações obtidas após purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. (nd – não detectado)

Etapas de Purificação		Microrganismo		Concentração (µg/µL)	Banco de Dados SwissProt (Mascot)
Sep Pak	CLAE-FR	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>		
5%	P5-1	+	-	0,44	Hc D, Hc F
	P5-2	-	+	0,28	Hc E
	P5-3	+	-	0,37	Hge-scorpine
	P5-4	-	+	0,28	nd

A fração P5-1 apresentou atividade contra a levedura *C. albicans* e foi analisada por um espectrometro de massas LTQ-ESI e revelou uma massa molecular de 1.594,28 Da (Figura 19) deduzida pela deconvolução do perfil de íons utilizando o programa MassAnalyzer muito semelhante ao fragmento encontrado na subunidade D da hemocianina da aranha *A. hentzi* como mostra a Figura 20.

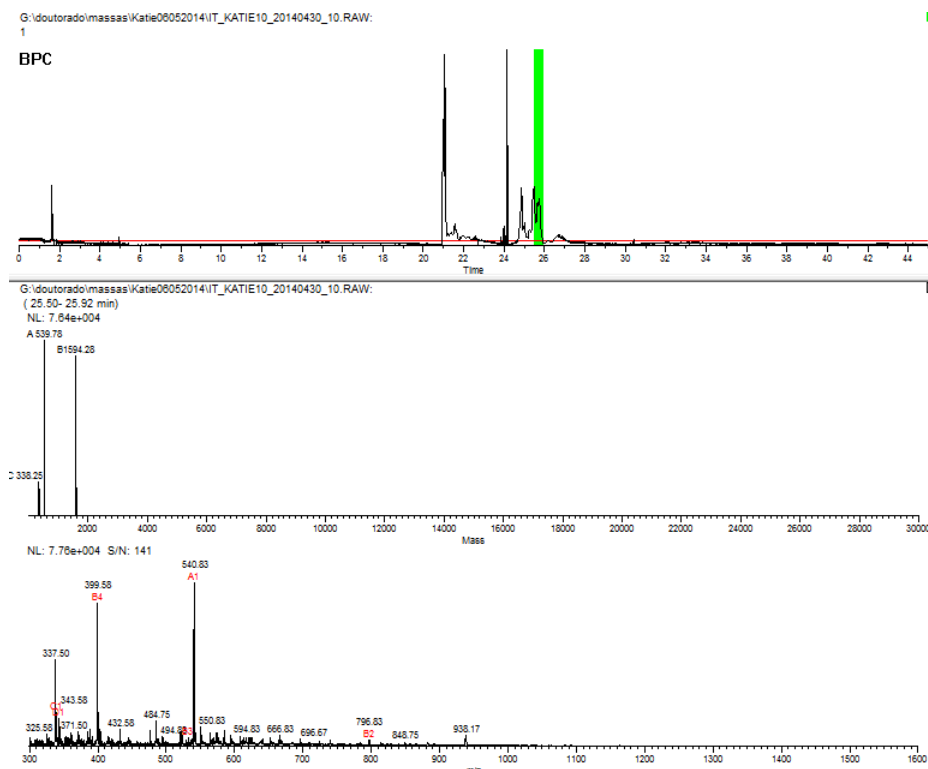


Figura 19 – Perfil cromatográfico da Fração P5-1 obtido pelo espectrômetro de massas LTQ-ESI. Deconvolução do perfil de íons obtidos para determinação da possível massa molecular do peptídeo.

Hemocyanin D chain OS=Aphonopelma californicum GN=HCD PE=1 SV=3

Database: SwissProt
 Score: 41
 Nominal mass (M_r): 72657
 Calculated pI: 5.87
 Taxonomy: [Aphonopelma sp](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of HCYD_APHCL against nr](#).

Search parameters

MS data file: IT_KATIE10_20140430_10.mgf
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Fixed modifications: [Carboxymethyl \(C\)](#)
 Variable modifications: [Dioxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 2%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MTIADHQARI LPLFKKLTSL SPDPPEAER DPRKGVGFL PRGTLFSCFH
51 EEHLAEATEL AEALVEAKNF DDFIALATNA RAVVNEGLYA FAMSVAILSR
101 DDCNGVVLFP IQEVFDRFV PAETINRALK VDKVSDPNKD TVVFIQKTGN
151 IRDFEYVAVY FREDIGINSH HHHWHLVYPA FYDADIFGKI KDRKGELFYY
201 MHQQMCARYD CERLSVGLQR MIPFQNLDEE LEGYSPLRS LVSGLSYGSR
251 FAGHHLRGIN DCSVQDMERW RERILDAIHT GLVTDSDHGKE IRLTEENGLN
301 ILGALIESSH DSVNKPFFYGT LHNWGHVMI ARIHDADGRYR TNPQVMDDTI
351 TSLRDFEYVY YHRWMDNIFQ EYKHLRPSYT HQQLDFGVR ISRVTVRSKY
401 FNLIHTYSKD SLELHSHGIN LKSHIQVKYE HLDHEFYNYE IEVDNRTGEA
451 RETCVRIPLA PKYDELGNRL ILEEQARLYI ELDKFKARLE PGKNVIVRAS
501 GDSSVILSKV FTFEELSGN ANVNFNEYCS CGWFEHMLVP RGRKGMDFY
551 LFMVLDVVEE DKVQGAGEQT ICSDAVSYCG AKDQKYPDKK AMGYPFDRPI
601 QVRIFSQFKT FNNAFQEIII QVEGHHK
  
```

Unformatted sequence string: [627 residues](#) (for pasting into other applications).

Figura 20 – Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo que mostrou similaridade com o perfil de íons.

A fração P5-2 apresentou atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-negativa *E.coli* e mostrou similaridade com a subunidade E da hemocianina da aranha *A. hentzi* (Figura 21), esses resultados mostram que essa fração ainda precisa ser novamente purificada e avaliada sem o processo de hidrólise enzimática.

Hemocyanin E chain OS=Aphonopelma californicum GN=HCE PE=1 SV=3

Database: SwissProt
 Score: 30
 Nominal mass (M_r): 72268
 Calculated pI: 5.44
 Taxonomy: [Aphonopelma sp](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of HCYE_APHCL against nr](#).

Search parameters

MS data file: IT_KATIE11_20140430_11.mgf
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Fixed modifications: [Carboxymethyl \(C\)](#)
 Variable modifications: [Dioxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 4%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MPDKQKQLRV ISLFEHMTSI NTPLPRDQID ARLHHLGRLP QGELFSCFHE
51 EDLEEATELY KILYAKDFD EVINLAKQSR TIVNEGLFVY AVSVALLHRD
101 DCRGIVVFAI QEIFPDRFV TETINLAVKE AANHPDQDIS VHVVTGNIL
151 DEEYKLAYFK EDVGTNAHHW HWHIVYPATW DPAFMGRMKD RKGELFYVMH
201 QQMCARYDCE RLSNGMRRMI PFSNFDEKLE GYSAHLTSLV SGLFYAFRPD
251 GLCLHDLFDI DLKEMFRWRE RILDAIDSGY YIDNEGHQVK LDIVDGINVL
301 GALIESSFET KNKLYYSSHL NNGHVMARL QDPDRHFNEN PGVMSDTSTI
351 LRDPFIFRYH RFIDNIFQKY IATLPHYTPE DLTCPGVHVV NVTVNAKVPN
401 VVTFMKEAE LELSYGIDFG SDHSVKVLYR HLDHEPFTYN ISVENSSGGA
451 KDVIMRIFLG PKYDELGNRL QPEQQRTLNI ELDKFKATLD PGKNVIVRDH
501 RNSTVTVEQS VPKVKKLREEG GVAGEYCSOG WPEHMLIPKG NHRGMDPELF
551 VIVTDYQDA VNGHGENAEC VDAVSYCGAK DQKYPDKKPM GFFPDRVIEG
601 LTFEELIVS MSCTDVRIKY TDIK
  
```

Unformatted sequence string: [624 residues](#) (for pasting into other applications).

Figura 21 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. Os fragmentos assinalados em vermelho correspondem aos peptídeos encontrados na busca.

A fração P5-3 apresentou atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans* e quando analisada por espectrômetro de massas tipo Orbitrap – ESI, sem o processo de digestão revelou uma massa de 8.066,5 Da (Figura 22). A amostra foi submetida ao protocolo de redução, alquilação e digestão enzimática por tripsina e submetida ao espectrômetro de massas LTQ-ESI, o perfil de íons resultante foi analisado contra um banco de dados SwissProt utilizando o filtro Arachnida pelo software Mascot e mostrou similaridade com um pedaço do peptídeo antimicrobiano Hge-scorpine (Figura 23). “Scorpine” é uma classe de peptídeos antimicrobianos, com uma cadeia longa apresentando o motif “cysteine stabilized α/β motif” (CS- $\alpha\beta$), no C-terminal (presença de três pontes dissulfeto e alta similaridade com peptídeos da família β -KTxs, cerca de 50% e compostos por um α -hélice na região N-terminal identificadas em venenos de escorpiões *Pandinus imperator* (Conde et al., 2000), *Hadrurus gertschi* e do gênero *Tityus* (Diego-García et al., 2007).

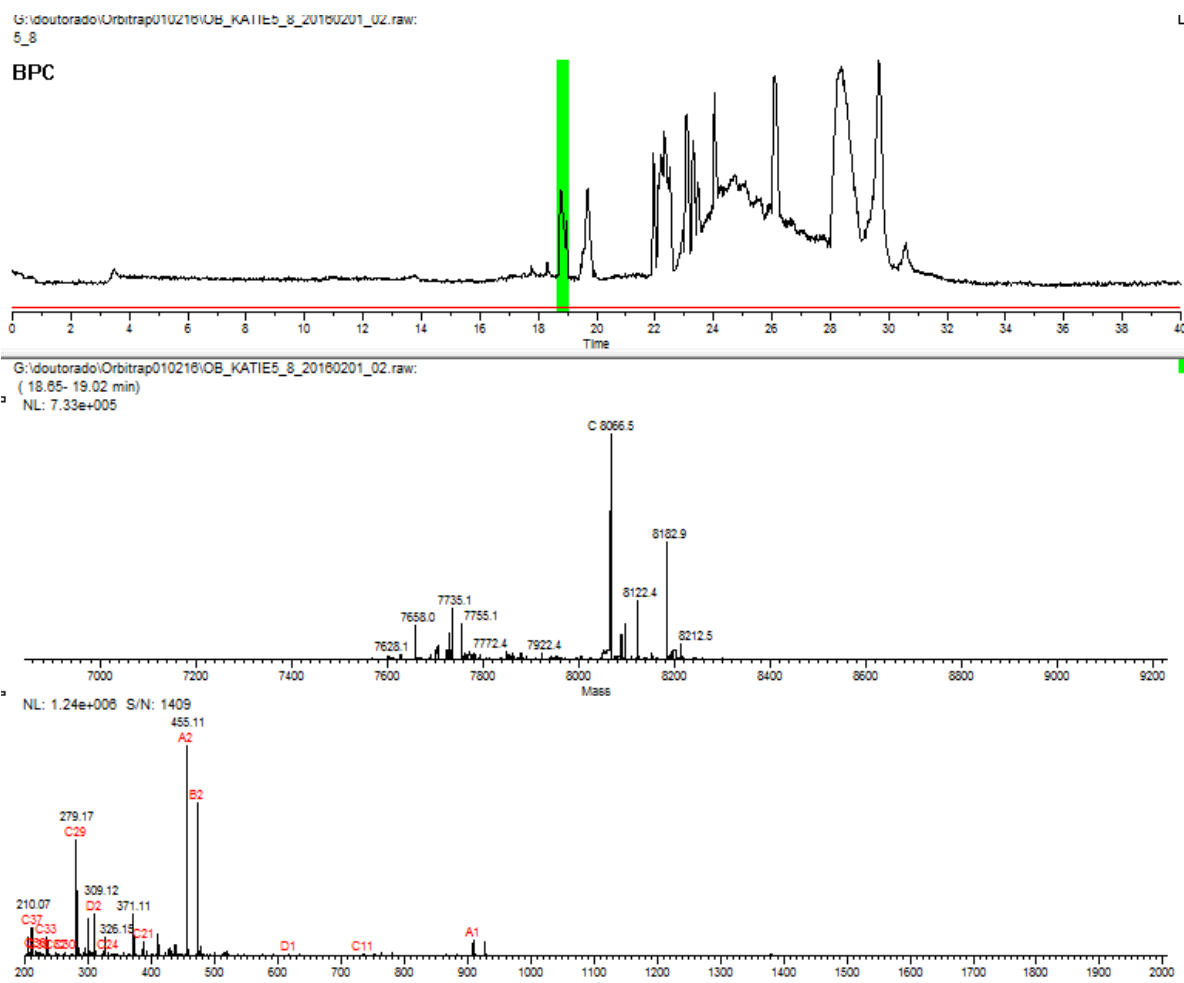


Figura 22 - Perfil cromatográfico da Fração P5-3 obtido pelo espectrômetro de massas LTQ-ESI. Deconvolução do perfil de íons obtidos para determinação da possível massa molecular do peptídeo.

scorpine-like 20 GWMSEKIVQGI LDKKLP EGI I - RNAAKAIVHKMAKNQFGCFANVDVKGDCKRHCKA 74
scorpine 1 GWINEEKIQKKIDERMGNTVLGRRMAKAIVHKMAKNEPQCMANMDMLGNCEKHCQT 56

scorpine-like 75 EDKEGI CHGTKCKCGVPI SY 94
scorpine 57 SGEKGYCHGTKCKCGTPLSY 76

Figura 25 – Alinhamento de sequência de aminoácidos de Scorpine e Scorpine-like. Peptídeos antimicrobianos isolados de veneno de escorpião. A região assinalada em vermelho corresponde ao peptídeo identificado por espectrometria de massas em nossos dados.

Na análise do transcriptoma de hemócitos de *A. rondoniae* não encontramos nenhum contig montado com similaridade para “scorpine” o que pode indicar que esse peptídeo não está sendo produzido nos hemócitos.

A fração P5-4 apresentou atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-negativa *E.coli* e quando analisada por comparação com banco de dados não apresentou nenhuma similaridade com proteínas ou peptídeos já depositados.

Na eluição de 40% de acetonitrila (Figura 26), encontramos nove frações com atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, incluindo a Rondonina. Essas frações também foram submetidas à digestão “in solução” (3.2.1 – Digestão “in solução”). Após análise no programa mascot, pudemos verificar a presença de seis frações (Rondonina, P40-5, P40-6, P40-7, P40-8 e P40-9) com alta similaridade com subunidades de hemocianina (Tabela 2 e Tabela 4), esses peptídeos precisam ser sequenciados para determinar se são outros fragmentos de hemocianina.

Tabela 2 - Tabela de atividade antimicrobiana do 40%, concentração e busca em banco de dados das frações obtidas após purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. (nd – não detectado; * íons duplicados)

Etapas de Purificação		Microrganismo		Concentração (µg/µL)	Banco de Dados SwissProt (Mascot)
Sep Pak	CLAE-FR	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>		
40%	P40-1	+	-	1,51	nd
	P40-2	+	-	1,72	Frag Hialuronidase
	P40-3	+	-	2,44	Frag Hialuronidase
	Rondonina	+	-	1,13	Rondonina
	P40-5	+	-	0,95	Hc E - Cterminal
	P40-6	+	-	0,44	Hc G, Hc F, Hc A
	P40-7	+	-	0,74	Hc G, Hc A, Hc F
	P40-8	+	-	0,34	Hc F*, Hc D*, Hc E*
	P40-9	+	-	0,29	Hc F*, Hc E*, Hc D*

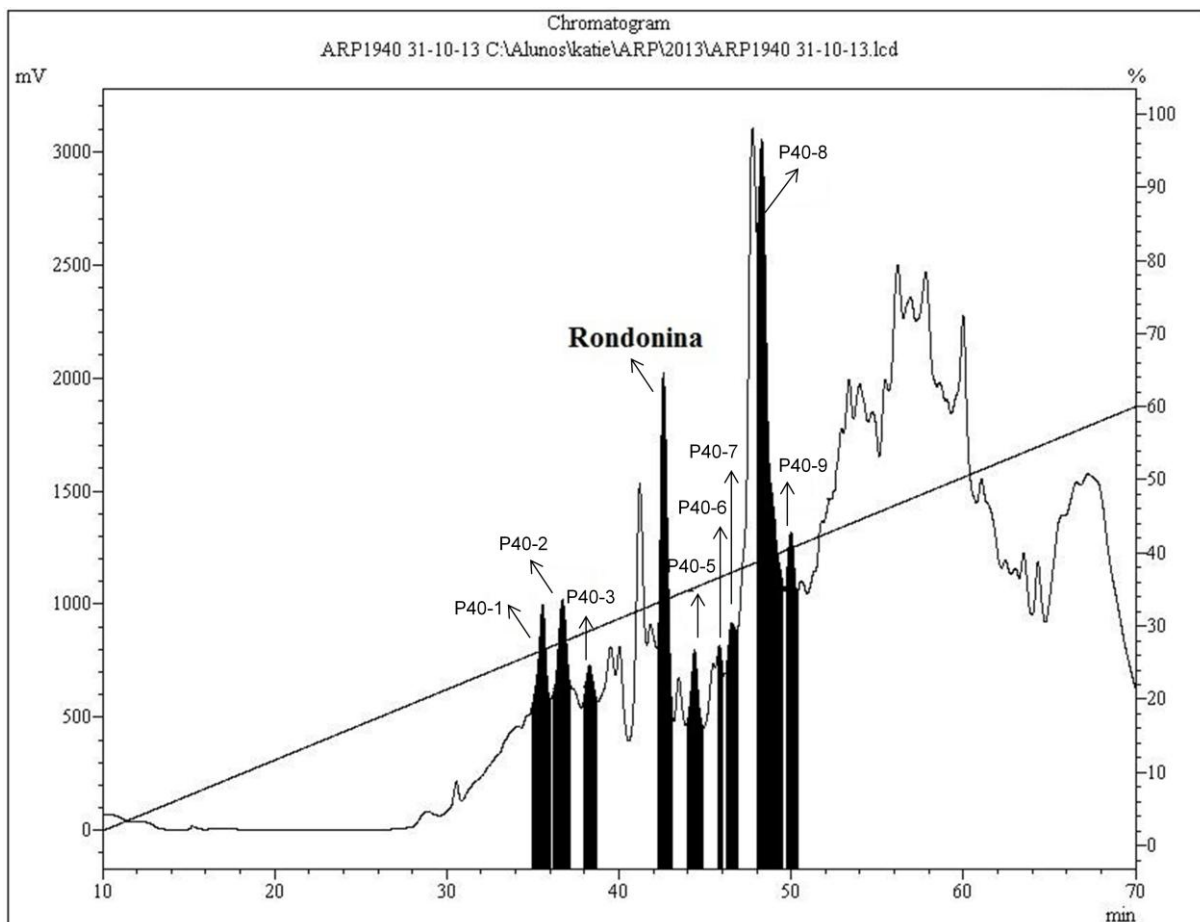


Figura 26 - Fracionamento de peptídeos antimicrobianos do plasma de *Acanthoscurria rondoniae*. Frações antimicrobianas obtidas do plasma eluídas com ACN 40% analisadas numa coluna semi-preparativa Júpiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 2 a 60% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min.

A fração P40-1 apresentou atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans* e quando analisada por comparação com banco de dados não apresentou nenhuma similaridade com proteínas ou peptídeos já depositados.

A fração P40-2 e a fração P40-3 apresentaram atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans* e mostram similaridades com um fragmento de Hialuronidase de *Phoneutria keyserlingi* (Figura 27).

Hyaluronidase (Fragment) OS=Phonetrutia keyserlingi PE=1 SV=1

Database: SwissProt
 Score: 17
 Nominal mass (M₀): 3934
 Calculated pI: 9.52
 Taxonomy: [Phonetrutia keyserlingi](#)

Sequence similarity is available as an [NCBI BLAST search of HUGA_PHOKE against nr](#).

Search parameters

MS data file: IT_KATIE2_20140430_02.mgf
 Enzyme: Trypsin; cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Fixed modifications: [Carboxymethyl \(C\)](#)
 Variable modifications: [Oxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 34%

Matched peptides shown in **bold red**.

1 FEVYVWVPTL QCRAVYPMIF **ELNRTYGIQK** NA

Unformatted sequence string: **32.residues** (for pasting into other applications).

Sort peptides by: Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

[Show predicted peptides also](#)

Query	Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta M	Score	Expect	Rank	U	Peptide
212	22 - 32	426.6200	1276.8382	1277.6364	-0.7982	1	0.16	1	U	K.LNRTYGIQNA..
211	22 - 32	429.1600	1284.4582	1285.6527	-1.1945	3	2.9	1	U	K.LNRTYGIQNA..
218	22 - 32	429.7900	1286.3482	1285.6527	0.6955	6	1.6	1	U	K.LNRTYGIQNA..
213	22 - 32	429.8700	1286.5882	1285.6527	0.9355	7	1.4	1	U	K.LNRTYGIQNA..

Hyaluronidase (Fragment) OS=Phonetrutia keyserlingi PE=1 SV=1

Database: SwissProt
 Score: 13
 Nominal mass (M₀): 3934
 Calculated pI: 9.52
 Taxonomy: [Phonetrutia keyserlingi](#)

Sequence similarity is available as an [NCBI BLAST search of HUGA_PHOKE against nr](#).

Search parameters

MS data file: IT_KATIE3_20140430_03.mgf
 Enzyme: Trypsin; cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Fixed modifications: [Carboxymethyl \(C\)](#)
 Variable modifications: [Oxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 34%

Matched peptides shown in **bold red**.

1 FEVYVWVPTL QCRAVYPMIF **ELNRTYGIQK** NA

Unformatted sequence string: **32.residues** (for pasting into other applications).

Sort peptides by: Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

[Show predicted peptides also](#)

Query	Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta M	Score	Expect	Rank	U	Peptide
212	22 - 32	429.1600	1284.4582	1285.6527	-1.1945	3	0.54	1	U	K.LNRTYGIQNA..
211	22 - 32	429.2200	1284.4382	1285.6527	-1.0145	13	0.059	1	U	K.LNRTYGIQNA..
217	22 - 32	429.5800	1285.3182	1285.6527	0.0455	1	1	2	U	K.LNRTYGIQNA..
218	22 - 32	437.3900	1309.1482	1309.6085	-0.4603	11	0.086	1	U	K.LNRTYGIQNA..

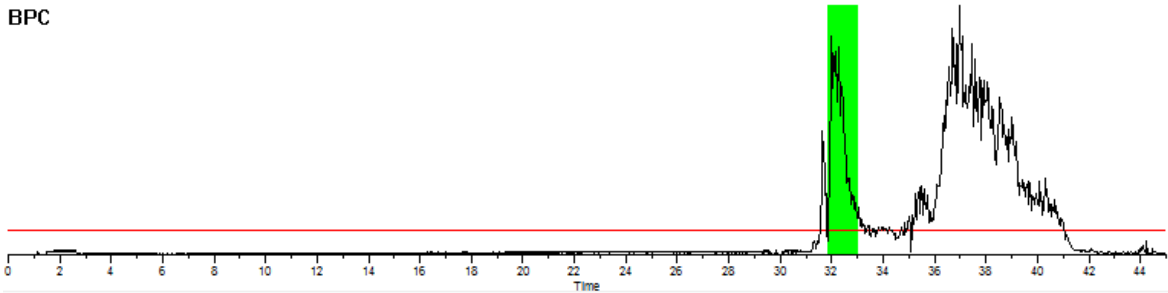
Figura 27 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca. Resultado obtido após comparação em banco de dados da fração P40-2 esquerda e fração P40-3 a direita.

A fração correspondente a Rondonina foi analisada por espectrometria de massas LTQ-ESI e teve sua massa molecular confirmada e mostrou-se homogênea (Figura 28) e foi acondicionada a -20 °C para posterior uso.

G:\doutorado\massas\Katie08052014\IT_KATIE4_20140430_04_140505095054_RAW:

1

BPC



G:\doutorado\massas\Katie08052014\IT_KATIE4_20140430_04_140505095054_RAW:

(31.86- 32.99 min)

NL: 2.84e+008

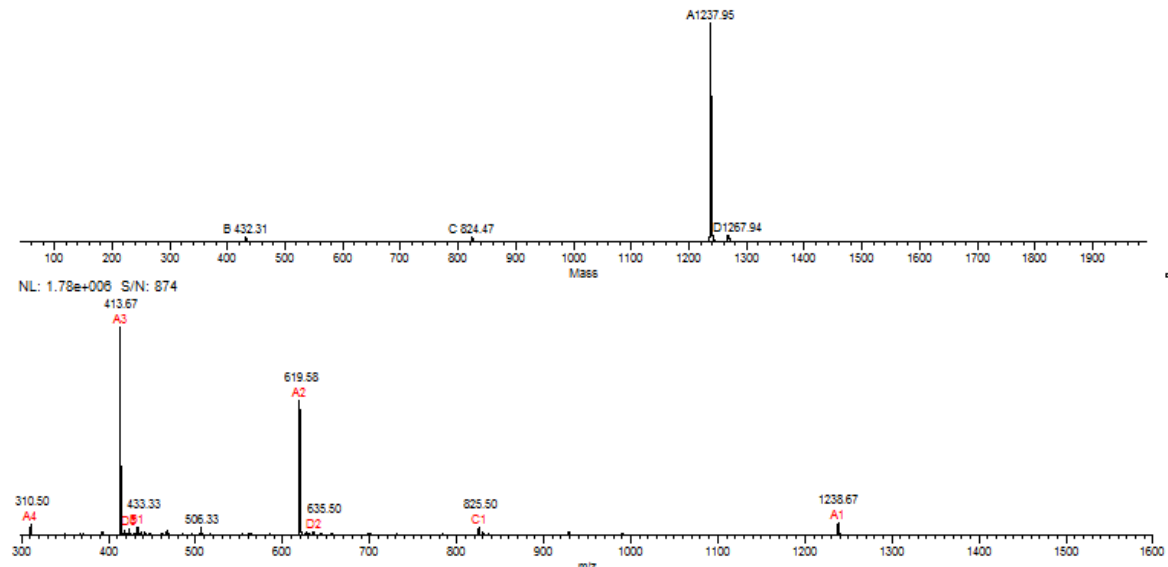


Figura 28 - Perfil cromatográfico da Rondonina obtido pelo espectrômetro de massas LTQ-ESI. Deconvolução do perfil de íons obtidos para determinação da massa molecular do peptídeo.

A fração P40-5 apresentou atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans* e quando analisada por busca em banco de dados mostrou similaridade com a subunidade E da hemocianina da aranha *A. hentzi* (**Error! Reference source not found.**), esses resultados mostram que essa fração ainda precisa ser novamente purificada e avaliada sem o processo de hidrólise enzimática para confirmar o resultado.

Hemocyanin E chain OS=Aphonopelma californicum GN=HCE PE=1 SV=3

Database: SwissProt
 Score: 32
 Nominal mass (M_r): 72268
 Calculated pI: 5.44
 Taxonomy: [Aphonopelma.sp](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of HCYE APHCL against nr.](#)

Search parameters

MS data file: IT_KATIE5_20140430_05.mgf
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Fixed modifications: [Carboxymethyl \(C\)](#)
 Variable modifications: [Dioxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 4%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MPDKQKQLRV ISLFEHMTSI NTPLPRDQID ARLHHLGRLP QGELFSCFHE
51 EDLEEATELY KILYTAKDFD EVINLAKQSR TFWNEGLFVY AVSVALLHRD
101 DCRGIVVPAI QEIFPDRFVQ TETINLAVKE AANHPDQDIS VHVWETGNIL
151 DEEYKLAYFK EDVGTNAHHW HWHIVYPATW DPAFMGRMKD RKGELFYVMH
201 QQMCARYDCE RLSNGMRRMI PFSNFDEKLE GYSAHLTSLV SGLPYAFRPD
251 GLCLHDLKDI DLKEMFRWRE RILDAIDSGY YIDNEGHOVK LDIVDGINVL
301 GALIESSFET KNKLYYGLSH NWGHVMMARL QDPDRHFNEN PGVMSDTSTS
351 LRDPIFYRYH RFDNIFQKY IATLPHYTPE DLTCQGVHVV NVTVNAKVEN
401 VVTFMKEAE LELSYGIDFG SDHSVKVLYR HLDHEPFTYN ISVENSSTGA
451 KDVTMRIFLG PKYDELGNRL QPEQRTLNI ELDKFKATLD PGKNVVTDRH
501 RNSTIVVEQS VPKKLREBG GVAGEYCSCG WPEHMLIPKG NHRGMDFELF
551 VIVTDYAQDA VNGHGENAEC VDAVSYCGAK DQKYFDKKEK GFFPDRVIEG
601 LTFEEFLTVS MSCTDVRIKY TDIK

```

Unformatted sequence string: [624 residues](#) (for pasting into other applications).

Figura 29 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.

A Fração P40-6 apresentou atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans* e mostrou maior similaridade com subunidade G da hemocianina de *A. hentzi* (Figura 30) apresentando um score de 182, essa fração também apresentou similaridade com subunidades A e F porém com scores mais baixos.

Hemocyanin G chain OS=Aphonopelma californicum GN=HCG PE=2 SV=3

Database: SwissProt
Score: 138
Nominal mass (M_r): 72404
Calculated pI: 5.76
Taxonomy: [Aphonopelma sp](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of HCYG_APHCL against nr](#).

Search parameters

MS data file: IT_KATIE6_20140430_06.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: [Carboxymethyl \(C\)](#)
Variable modifications: [Dioxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 6%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MASIQEKQAL ILPLFEKLTSLTKETPPRAQ WDPRLAGVGV LPRGTLFSCF
51 HEKHLLEATK LFKVLYSPES FNDFLQLARE ARVVVNEGFL AYAFSVAVIH
101 RDDCKGVILP PIQEVFPDRF VPSETINLAM KEAKNDPNSD IVVDVQETGN
151 ILDPEYKLAY FREDIGANAH HWVWHVYPA NWDAVFTGKT KDRKGELFYI
201 MHQQMCARYD CERLSNGLTR MIPFHNFKKK LEGYAPHLTS LVSGLHYASR
251 FAGLCLRDLS ELEVQDVERW RDRILDAYHL NHVHDRENND VVLDAEHGAD
301 ILGAIIESS DSVNRRFYGS LHNWGHVMMARMTDPPRSFE ENPGVMSDTS
351 TSLRDPIFYR WHRFVDNIFQ EYKATLPSYT ADDLNFFGLR IVSVQVNRKS
401 QNRVRIFLKQ EELVLSHGIN FGTEHTVKVH YNHLDEPPFS YIINVDNSSG
451 AVKHATVRIK LGPKCDELGN ILEFNEQRRL FIELDKFKKE LGPGLNTINR
501 NSVESNVIVA HTYTFDELRE GKLAPEDATE YCNCGWFRHM LIPKGTGRGM
551 EFQLFVMLTD YTVDNPCGGA GKIVCADAVS YCGAKDQKYP DTKPMGFPPD
601 RPTKIHTAEE ILTENMSLTD VVIQYVGH

```

Unformatted sequence string: [629 residues](#) (for pasting into other applications).

Figura 30 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.

A Fração P40-7 apresentou atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans* e mostrou maior similaridade com subunidade G da hemocianina de *A. hentzi* (Figura 31), apresentando um score de 311, essa fração também apresentou similaridade com subunidades A, C, E, F porém com scores mais baixos.

Hemocyanin G chain OS=Aphonopelma californicum GN=HCG PE=2 SV=3

Database: SwissProt
 Score: 311
 Nominal mass (M_r): 72404
 Calculated pI: 5.76
 Taxonomy: [Aphonopelma.sp](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of HCYG_APHCL against nr.](#)

Search parameters

MS data file: IT_KATIE7_20140430_07.mgf#
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Fixed modifications: [Carboxymethyl \(C\)](#)
 Variable modifications: [Dioxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 15%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1  MASIQEKQAL ILPLFEKLS LTKETPPRAQ WDPRLAGVGV LPRGILFSCF
51  HEKHLLEATK LFKVLYSPES FNDFLQLARE ARVVVNEGLF AYAFSVAVIH
101 RDDCKGVITLPIQEVFPDRF VPSETINLAM KEAKNDPNSD IVVDVQETGN
151 ILDPEYKLAY FREDIGANAH HWYWHVVYPA NWDVAVTGKT KDRKGELFYY
201 MHQQMCARYD CERLSNGLTR MIPFFHNFKEK LEGYAPHLTS LVSGLHYASR
251 PAGLCLRDLS ELEVQDVERW RDRI LDAYHL NHVHDRENND VVLDAEHGAD
301 ILGAIIESSS DSVNRRFYGS LHNWGHVMA RMTDPDRSFE ENPGVMSDTS
351 TSLRDFIFYR WHRFVDNIFQ EYKATLPSYT ADDLNFPGLR IVSVQVNAKS
401 QNRVRTFLKQ EELVLSHGIN FGTEHTVKVH YNHLDEFFS YTINVDNSSG
451 AVKHATVRIF LGPKCDELGN ILEPNEQRRL FIELDKFHKE LGPGLNTINR
501 NSVESNVIVA HTYTFDELRE GK LAPEDATE YCNCGWPRHM LIPKGTGRGM
551 EFQLFVMLTD YTVDNPCGGA GKIVCADAVS YCGAKDQKYP DTKPMGFPPFD
601 RPTKIHTAEE ILTPNMSLTD VVIQVVGHE

```

Unformatted sequence string: [629 residues](#) (for pasting into other applications).

Figura 31- Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.

A Fração P40-8 apresentou atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans* e mostrou maior similaridade com subunidade F da hemocianina de *A. hentzi* (Figura 32), apresentando um score de 462, essa fração também apresentou similaridade com subunidades B, C, D, E com similaridades em 113 peptídeos que correspondem a ambas subunidades.

Hemocyanin F chain OS=Aphonopelma californicum GN=HCF PE=2 SV=3

Database: SwissProt
Score: 462
Nominal mass (M_r): 72684
Calculated pI: 5.73
Taxonomy: [Aphonopelma sp](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of HCYF APHCL against nr](#).

Search parameters

MS data file: IT_KATIES_20140430_08.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: [Carboxymethyl \(C\)](#)
Variable modifications: [Dioxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 29%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1  MTVQDKQRQI LPLFEHLTSL TRGGDLRTES DVRLRRVGRLL PRGTLFSCFH
51  SEHLKEATEL YQILYKADSF ADFIHLAQQA RDIVNEGLFV YSVSVAILHR
101 DDRCRGVIVFP IQEIFFDRFV PAETVNVQAVK ADLKRQSSDE DVLVEIQETG
151 NILDPEHKLA YFREDIGANA HHWHWHIVYP PTWDASVMSK VKDRKGELFY
201 YMHQQMCARY DCDRLSTGLR RMIPFFHFDE KLEGYSPLHT SLVSGLVNAS
251 RPAGLHLRDL VDFVDVQDMA RWRERLLYSI DIGHVIDHEG QEIPLDAEHG
301 IDVLGALLES SHDSLNDYY GNLHNSGHVM MARIHDPDGR FRENPGVMSD
351 TSTSLRDPFP YRYHRFIDNI FQEVKATLPC YEKKDLFSG VEIVNCTVNA
401 KAPNVINTYM KESTLEMSHG ISFKGAVKVK YQHLDHDPFT YSISVENTTG
451 DVKHATVRIP LGPTQDELGN RLRLNEQRRF YIELDKFHAE LAAGKNTITR
501 KSSSSVTVS HTPTPEELQR GEGVDENTTE FCSCGWFEHL LVPRGTYKGM
551 DFQLFVMLTD YEDDHVGSNN GQILCADAVS YCGAKDSKYP DKRAMGFPFD
601 RVIKARTVAD FRTTNMSPTD VKIQFKDQV

```

Unformatted sequence string: [629 residues](#) (for pasting into other applications).

Figura 32 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.

A Fração P40-9 apresentou atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans* e mostrou maior similaridade com subunidade F da hemocianina de *A. hentzi* (Figura 33), apresentando um score de 118, essa fração também apresentou similaridade com subunidades D, E com similaridades em 28 peptídeos que correspondem a ambas subunidades.

Hemocyanin F chain OS=Aphonopelma californicum GN=HCF PE=2 SV=3

Database: SwissProt
 Score: 118
 Nominal mass (M_r): 72684
 Calculated pI: 5.73
 Taxonomy: [Aphonopelma sp](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of HCYF APHCL against nr](#).

Search parameters

MS data file: IT_KATIE9_20140430_09.mgf
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Fixed modifications: [Carboxymethyl \(C\)](#)
 Variable modifications: [Dioxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 7%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1  MTVQDKQRQI LPLFEHLTSL TRGGLDRTES DVRLRRVGR L PRGTLFSCFH
51  SEHLKEATEL YQILVKADSF ADFIHLAQQ A RDIVNEGLFV YSVSVAILHR
101 DDCRGVIVFP IQEIFFDRFV FAETVNQAVK ADLKRQSSDE DVLVEIQETG
151 NILDPEHKLA YFREDIGANA HHHWHIVY P PTWDASVMSK VKDRKGELFY
201 YMQQMCARY DCDRLSTGLR RMIPFHNFDE KLEGYSPLHT SLVSGLMYAS
251 RPAGLHLRDL VDFVDVQDMA RWRERLLYSI DIGHVIDHEG QEIPLDAEHG
301 IDVLGALLES SHDSLNDYY GNLHNSGHVM MARIHDPDGR FRENPGVMSD
351 TSTSLRDPF YRYHRFIDNI FQEYKATLPC YEKKDLFESG VEIVNCTVNA
401 KAPNVINTYM KESTLEMSHG ISFKGAVKVK VQHLHDHPT YSISVENTTG
451 DVKHATVRIF LGPTQDELGN RLRLNEQRRF YIELDKFHAE LAAGKNIITR
501 KSSESVTVS HIPTFEELQR GEGVDENITE FCSCGWPEHL LVPRGTYKGM
551 DFQLFVMLTD YEDDHVGSNH GQTLCADAVS YCGAKDSKYP DKRAMGFFPD
601 RVIKARTVAD FRTTMSFTD VKIQFKDQV
  
```

Unformatted sequence string: [629 residues](#) (for pasting into other applications).

Figura 33 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.

Na eluição de 80% de acetonitrila (Figura 34), encontramos duas frações com atividade antimicrobiana contra *C. albicans* (P80-1 e P80-2) e quando submetidas à digestão “in solução” (3.2.1 – Digestão “in solução”) e analisadas no programa Mascot, também revelou alta similaridade com subunidades de hemocianina (Tabela 3 e Tabela 4).

Tabela 3 – Tabela de atividade antimicrobiana do 80%, concentração e busca em banco de dados das frações obtidas após purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Etapas de Purificação		Microrganismo		Concentração (µg/µL)	Banco de Dados SwissProt (Mascot)
Sep Pak	CLAE-FR	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>		
80%	P80-1	+	-	0,02	Hc G
	P80-2	+	-	0,73	Hc F*, Hc D*, Hc G, Hc C, Hc B

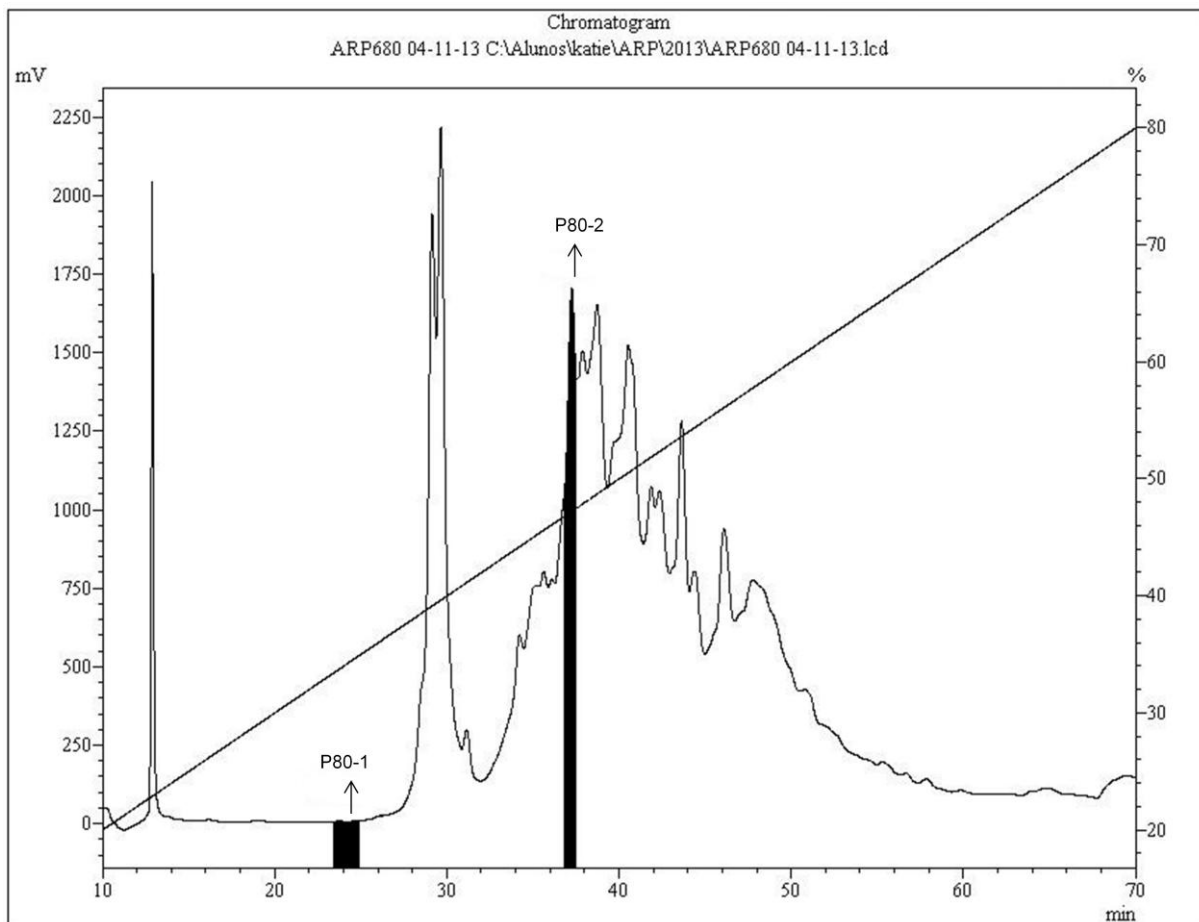


Figura 34 - Fracionamento de peptídeos antimicrobianos do plasma de *Acanthoscurria rondoniae*. Frações antimicrobianas obtidas do plasma eluídas com ACN 80% analisadas numa coluna semi-preparativa Júpiter C18 com um gradiente linear de acetonitrila de 20 a 80% em água acidificada por 60 min, num fluxo de 1,5 mL/min.

A Fração P80-1 apresentou atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans* e mostrou maior similaridade com subunidade G da hemocianina de *A. hentzi* (Figura 35), apresentando um score de 17, a massa dessa fração ainda precisa ser avaliada.

Hemocyanin G chain OS=Aphonopelma californicum GN=HCG PE=2 SV=3

Database: SwissProt
Score: 17
Nominal mass (M_r): 72404
Calculated pI: 5.76
Taxonomy: [Aphonopelma_sp](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of HCYG APHCL against nr](#).

Search parameters

MS data file: IT_RATIE14_20140430_14.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: [Carboxymethyl \(C\)](#)
Variable modifications: [Dioxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 2%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MASIFEKQAL ILPLFEKLTIS LTKETPPRAQ WDFRLAGVGV LPRGTLFSCF
51 HEKHLEATK LFKVLYSPES FNDFLQLARE ARVVVNEGLF AVAFSVAVIH
101 RDDCKGVTLF PIQEVFPDRF VFSETINLAM KEAKNDPNSD IVVDVQETGN
151 ILDPEYKLAY FREDIGANAH HWVHVVYEA NWDVAVTIGT KDRKGELFYI
201 MHQQMCRAYD CERLSNGLTR MTPFHNPKK LEGYAPHLTS LVSGLHYASR
251 FAGLCLRDLS ELEVQDVERM RDRILDAYHL NHVHDRENND VVLDAEHGAD
301 ILGALIESSS DSVNRRFYGS LHNWGHVMAA RMDFDRSFE ENPGVMSDTS
351 TSLRDPFVYR WHRFVDNIFQ EYKATLPSYT ADDLNFPGLR IVSVQVNAKS
401 QNRVRIFLKQ EELVLSHGIN FGTHTVKVH YNHLDEPPFS YTINVDNSSG
451 AVKHATVRIK LGPKDELGN ILEPNEQRRL FIELDKFKKE LGPGLNTINR
501 NSVESNVIVA HTYTFDELRE GKLAPEDATE YCNCGWFRHM LIPKGTIRGM
551 EFQLFVMLTD YTVDMFCOGA GKIVCADAVS YCGARDQKVP DTKPMGFPPD
601 RPTKIHTAEE ILTPNMSLTD VVIQYVGHE

```

Unformatted sequence string: [629 residues](#) (for pasting into other applications).

Figura 35 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.

A Fração P80-2 apresentou atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans* e mostrou maior similaridade com subunidade F da hemocianina de *A. hentzi* (Figura 36), apresentando um score de 426, essa fração também apresentou similaridade com subunidade D, com score de 276 com similaridades em 48 peptídeos que correspondem a ambas subunidades.

Hemocyanin F chain OS=Aphonopelma californicum GN=HCF PE=2 SV=3

Database: SwissProt
Score: 426
Nominal mass (M_r): 72684
Calculated pI: 5.73
Taxonomy: [Aphonopelma sp](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of HCYF APHCL against nr](#).

Search parameters

MS data file: IT_KATIE15_20140430_15_140506101054.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: [Carboxymethyl \(C\)](#)
Variable modifications: [Dioxidation \(M\)](#)

Protein sequence coverage: 29%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1  MTVQDKQRQI LPLFEHLTSL TRGGLDRTES DVRLRRVGRLL FRGTLFSCFH
51  SEHLKEATEL YQILYKADSF ADFIHLAQQA RDIVNEGLFV YSVSVAILHR
101 DDORGVTVPF IQEIFFDRFV PAETVDAQVK ADLKRQSSDE DVLVEIQETG
151 NILDPEHKLA YFREDIGANA HHWHWHIVYP FTWDASVMSK VKDRKGELFY
201 VMHQQMCARY DCDRLSTGLR RMIPFFHNPE KLEGYSPHLT SLVSGSLNYAS
251 RFAGLHLRDL VDFVDVQDMA RWRERLLYSI DIGHVIDHEG QEIPLDAEHG
301 IDVLGALLES SHDSLNDYYI GNHNSGHVM MARIHDPDGR FRENPGVMSD
351 TSTSLRDPF YRYHRFIDNI FQEKATLPC YEKKLEFSG VEIVNCTVNA
401 KAPNVINTYM KESTLEMSHG ISPKGAVKVK YQHLDDHDFPT YSISVENTIG
451 DVKHAIVRIF LGPTQDELGN RLRLNEQRRF YIELDKFAE LAAGKNTITR
501 KSSSESVTVS HPTTFEELQR GEGVDENTTE FCSCGWPEHL LVPRGTYKGM
551 DFQLFVMLTD YEDDHVGSNH GQTLCADAVS YCGAKDSKYP DKRAMGPFPPD
601 RVIKARTVAD FRTINMSFTD VKIQEKDQV

```

Unformatted sequence string: [629 residues](#) (for pasting into other applications).

Figura 36 - Análise em banco de dados SwissProt pelo software Mascot. O fragmento assinalado em vermelho corresponde ao peptídeo encontrado na busca.

Nossos resultados apontam que a nova via do sistema imune de aranhas descrita em estudos anteriores (Kuhn-Nentwig, Nentwig, 2013; Riciluca et al., 2012) caracterizada pela formação da rondonina através de uma atividade proteolítica na hemocianina e pode estar ocorrendo não só pela formação deste peptídeo e sim pela formação de diversos peptídeos antimicrobianos.

Análises mais detalhadas precisam ser realizadas para confirmar corretamente as sequências dos peptídeos encontrados e determinar de qual subunidades eles pertencem, já que foi visto que as subunidades de hemocianina são muito conservadas entre si.

A hemocianina é um componente integral do sistema imune dos invertebrados, como descreve Coates e Nairn (2014), apresenta um domínio ERK 1/2, um domínio Ig-like, liberação de peptídeos antimicrobianos e expressão aumentada e síntese de uma região particular durante uma viremia, indicando que o C-terminal da hemocianina dos artrópodes é importante para as diversas funções imunes dessa proteína.

Tabela 4 – Análise das frações antimicrobianas em banco de dados

Fração	Banco de Dados SwissProt (Mascot)	Score	
P5-1	Hc D	41	
P5-2	Hc E*	31	
	Hc G*	29	
P5-3	Hge-scorpine	17	
P5-4	nd	nd	
P40-1	nd	nd	
P40-2	Frag Hialuronidase	17	
P40-3	Frag Hialuronidase	13	
Rondonina	Rondonina	-	
P40-5	Hc E - Cterminal	32	
P40-6	Hc A	79	
	Hc F	53	
	Hc G	311	
P40-7	Hc A	155	
	Hc C	34	
	Hc E - Cterminal	26	
	Hc F - C-terminal	193	
P40-8	Hc G	315	
	Hc D	141	
	Hc E	157	
P40-9	Hc F	425	
	Hc A*	41	
	Hc D	63	
	Hc E*	50	
	Hc F	121	
P80-2	Hc G*	41	
	P80-1	Hc G	17
	Hc B	20	
	Hc C	41	
	Hc D	269	
	Hc F	436	
	Hc G	69	

Todas as frações com atividade antimicrobiana foram submetidas a ensaio de citotoxicidade contra eritrócitos humanos (Figura 37), somente a fração P5-3, com similaridade a scorpine-like mostrou-se hemolítica (100% de hemólise), como já

descrita em estudos anteriores (Diego-García et al.,2008) e citotóxica (0% de viabilidade) quando avaliada contra células tumorais de colo de útero humano linhagem HeLA (Figura 38 **Error! Reference source not found.**) e adrenal de camundongo linhagem Y1 (Figura 39) pelo método de MTT.

As outras frações demonstraram baixa taxa de hemólise, variando de 0 a 2% quando comparadas ao controle de triton X-100 e não citotóxicas contra as linhagens tumorais testadas.

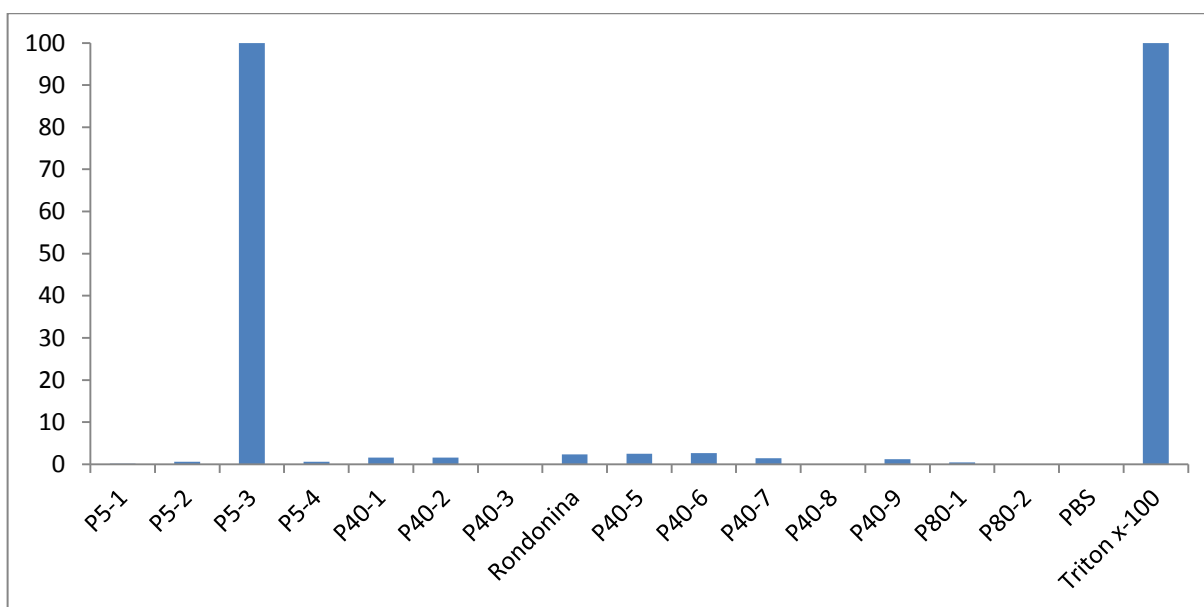


Figura 37 – Ensaio de citotoxicidade contra eritrócitos humanos. Avaliação dos peptídeos antimicrobianos contra eritrócitos humanos.

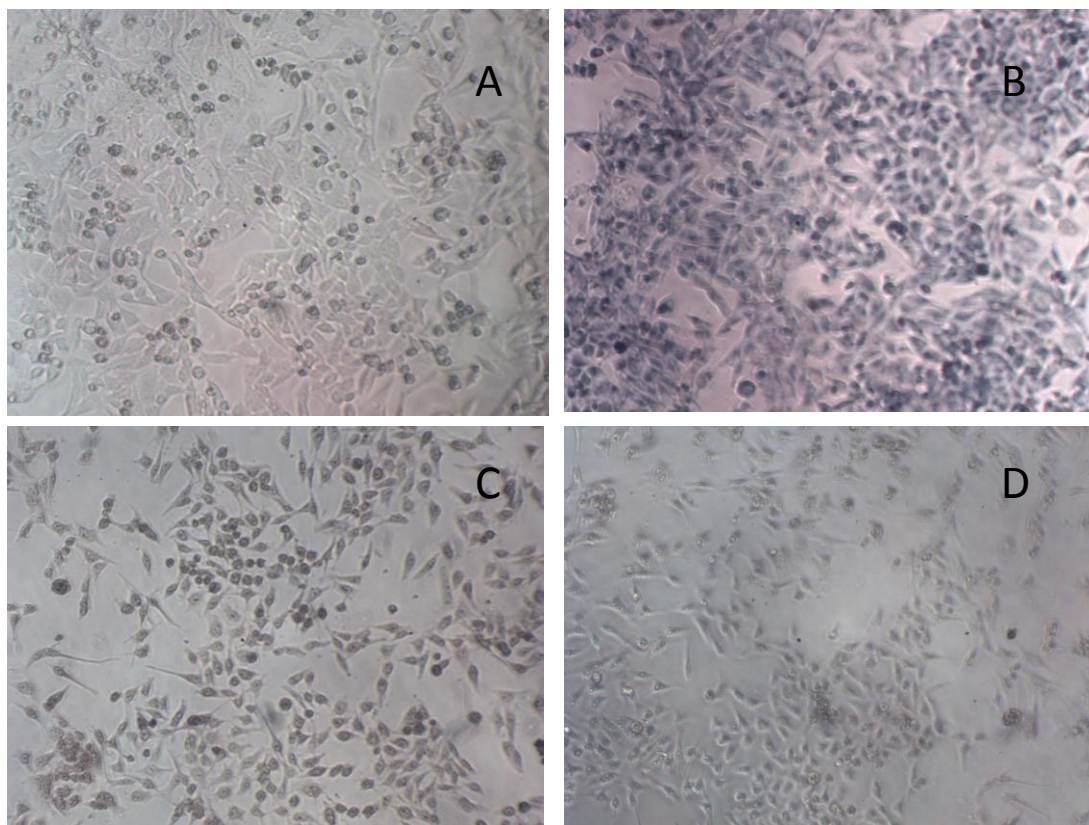


Figura 38 – Ensaio de citotoxicidade em linhagem celular HeLa. A fração P5-3 foi avaliada em linhagem celular HeLa. A- somente células, B- células com cristal de formazan (MTT), C- células com a fração P5-3, D- células com a fração P5-3 após MTT.

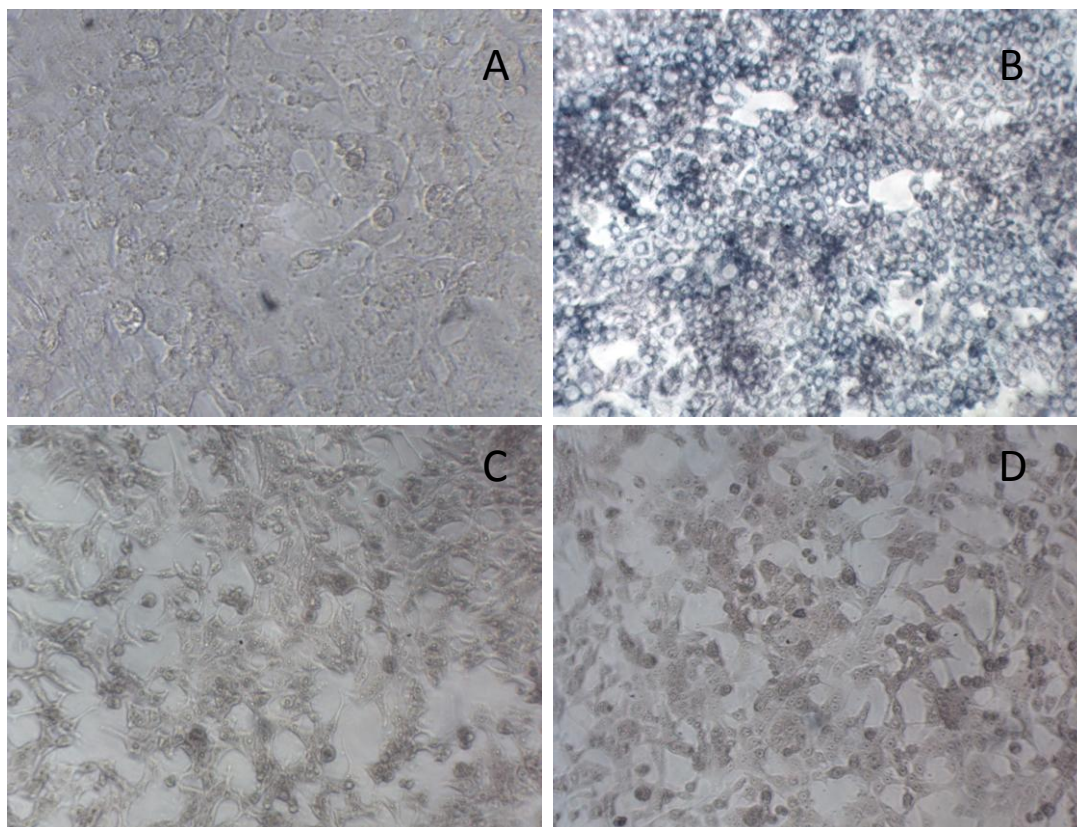


Figura 39 – Ensaio de citotoxicidade em linhagem celular Y1. A fração P5-3 foi avaliada em linhagem celular Y1. A- somente células, B- células com cristal de formazan (MTT), C- células com a fração P5-3, D- células com a fração P5-3 após MTT.

Peptídeos antimicrobianos originando de grandes proteínas precursoras têm sido reportados em diversos organismos e parecem ser uma via em geral para a geração desses peptídeos (Zaslhoff, 2002).

Neste contexto, alguns peptídeos, fragmentos de hemocianina, foram detectados na hemolinfa de crustáceos como *Penaeus vannamei* (PvHCt), *Penaeus stylirostris* (PsHCt1, PsHCt2) (Destoumieux-Garzón et al., 2001) e *Pacifastacus leniusculus* (Astacidina) podendo esta ser considerada como fonte de peptídeos antimicrobianos (Lee et al., 2003). Na hemocianina de *Aphonopelma hentzi*, somente as subunidades b e c mostraram atividade de oxidase 0-diphenol após ativação por SDS (Decker et al., 1998), o que pode indicar que as outras subunidades estão livres para a produção de peptídeos antimicrobianos, pois o gasto energético no animal seria reduzido aproveitando proteínas já existentes ao invés da síntese de novas moléculas.

4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão da Hemocianina

Uma vez que peptídeos antimicrobianos estão sendo gerados a partir do processamento da hemocianina, torna-se interessante o conhecimento de sua estrutura tridimensional e sequência primária de aminoácidos. Pensando desse modo, buscamos inicialmente a confirmação da estrutura quaternária da proteína e análise da qualidade da amostra através de um protocolo de contraste negativo (*negative stain*). O plasma foi coletado na ausência de tampão anticoagulante e diluído 1000 vezes em tampão “Tris Stabilizing Buffer” (50 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂). A grade foi preparada segundo metodologia já citada e a imagem obtida em um microscópio eletrônico de transmissão com aumento de 150k. Segundo figura abaixo (Figura 40), podemos verificar a presença das estruturas 4x6mer como já descrito na literatura para *Aphonopelma hentzi* (*Eurypelma californicum*) (Markl, Decker, 1992).

As estruturas quaternárias estão presentes em maior quantidade, mostrando assim que não houve dissociação dos hexâmeros.

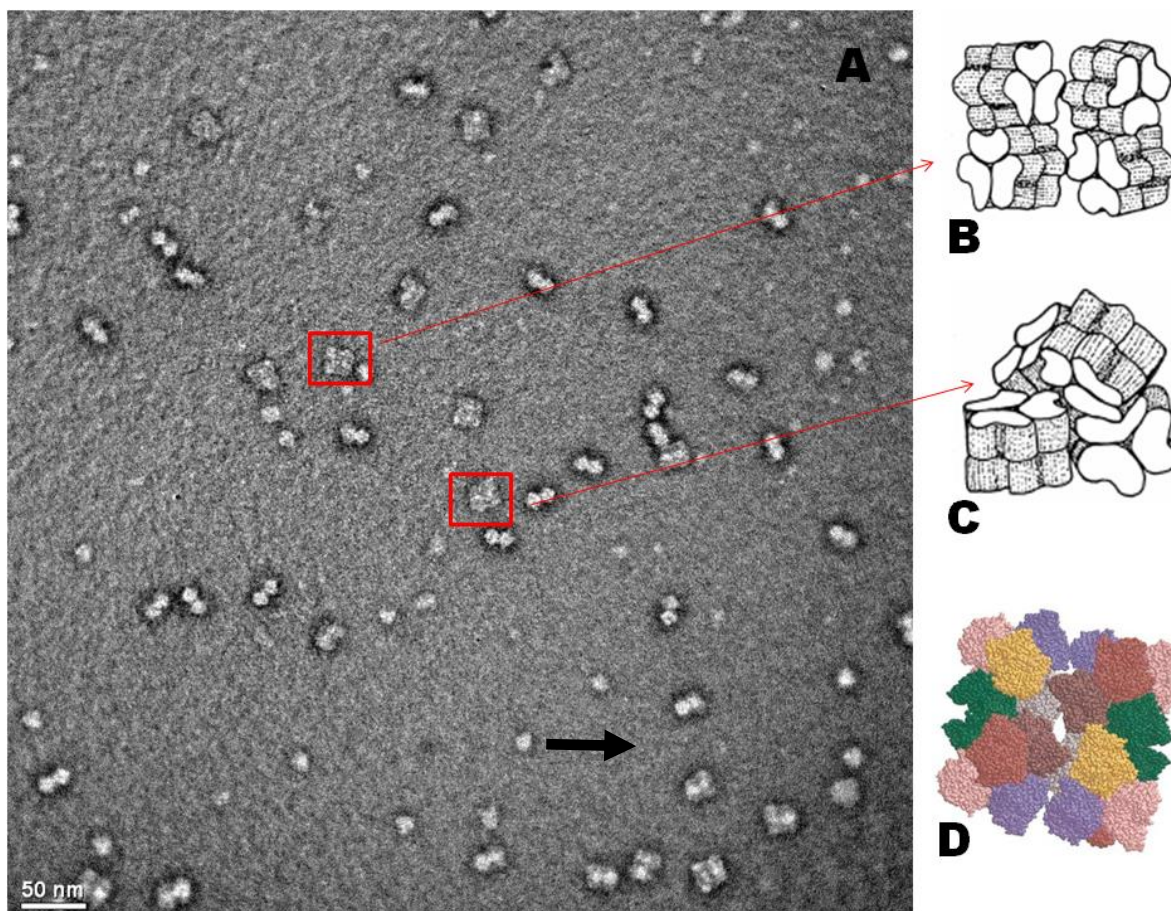


Figura 40 – Microscopia Eletrônica de Transmissão. A) Presença de estruturas 4X6 mer da hemocianina de *Acanthoscurria rondoniae* (aumento de 150k) coradas por “negative stain” com 2% de acetato de uranila . B) Estrutura 4x6 mer vista superior (Markl, Decker, 1992) C) Estrutura 4x6 mer vista a 45° (Markl, Decker, 1992) D) As diferentes cores se referem às diferentes subunidades: a - verde; b - cinza; c - marron; d - amarelo; e - rosa; f - azul; g – vermelho (Voit et al, 2000). A seta preta indica a vista lateral.

Com o objetivo de obter uma estrutura de alta resolução, a metodologia de preparo de amostras em condições criogênicas (Cryo-EM) tornou-se extremamente relevante, uma vez que essa metodologia permite o estudo estrutural da amostra em solução, uma vez que, com o congelamento, as amostras permanecem com a conformação estrutural semelhante a que apresentavam em solução aquosa, o que torna possível o estudo de complexos transientes, como o complexo dessa proteína.

Inicialmente, as grades foram preparadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano-CNPEM, Campinas) pelo Dr. Alexandre Cassago e com a supervisão do Dr. Rodrigo Villares Portugal. Foram utilizados grades C-Flat (R2/2 400 mesh), negativamente carregadas utilizando equipamento Glow-Discharger (Pelco) operando a 15 mA durante 25 segundos.

Cerca de 3 μL da amostra foi utilizado para o preparo das grades utilizando o equipamento Vitrobot Mark IV (FEI) a 100% de humidade a 22 °C. As grades foram secas utilizando uma etapa de contato de 3 segundos com papel filtro 597 e forças de contato variando de -10 e -5. Algumas amostras foram então estocadas em nitrogênio líquido e enviada para o NeCEN-LU (Holanda) em dewar seco para a segunda aquisição de dados.

Uma primeira coleta de dados, foi realizada utilizando o microscopio Jeol JEM-2100 200kV e as micrografias foram adquiridas manualmente utilizando numa câmera F-416 CMOS (TVIPS). A coleta foi feita com o pixel size de 1.78 Å em uma faixa de defocus variando de -1.5 a -5(μm) com magnificação de 60 k. No total foram obtida 307 micrografias usáveis.

As 307 micrografias de 4096 x 4096 pixels foram convertidas para o format padrão IMAGIC e três destas consideradas “ruins” foram deletadas resultando num conjunto de dados final de 304 micrografias (Figura 41). Após isso, foi necessária a determinação da função de transferência de contraste (CTF) de todas as imagens. O CTF muda o detalhe do contraste de certas imagens dependendo do defocus utilizado. Para “boas” imagens é possível inverter o contraste para seu valor correto, mas esse procedimento se torna difícil quando as micrografias não são coletadas com “Field Emission Gun” - FEG (feixe principal de elétrons capaz de produzir imagens de alta resolução).

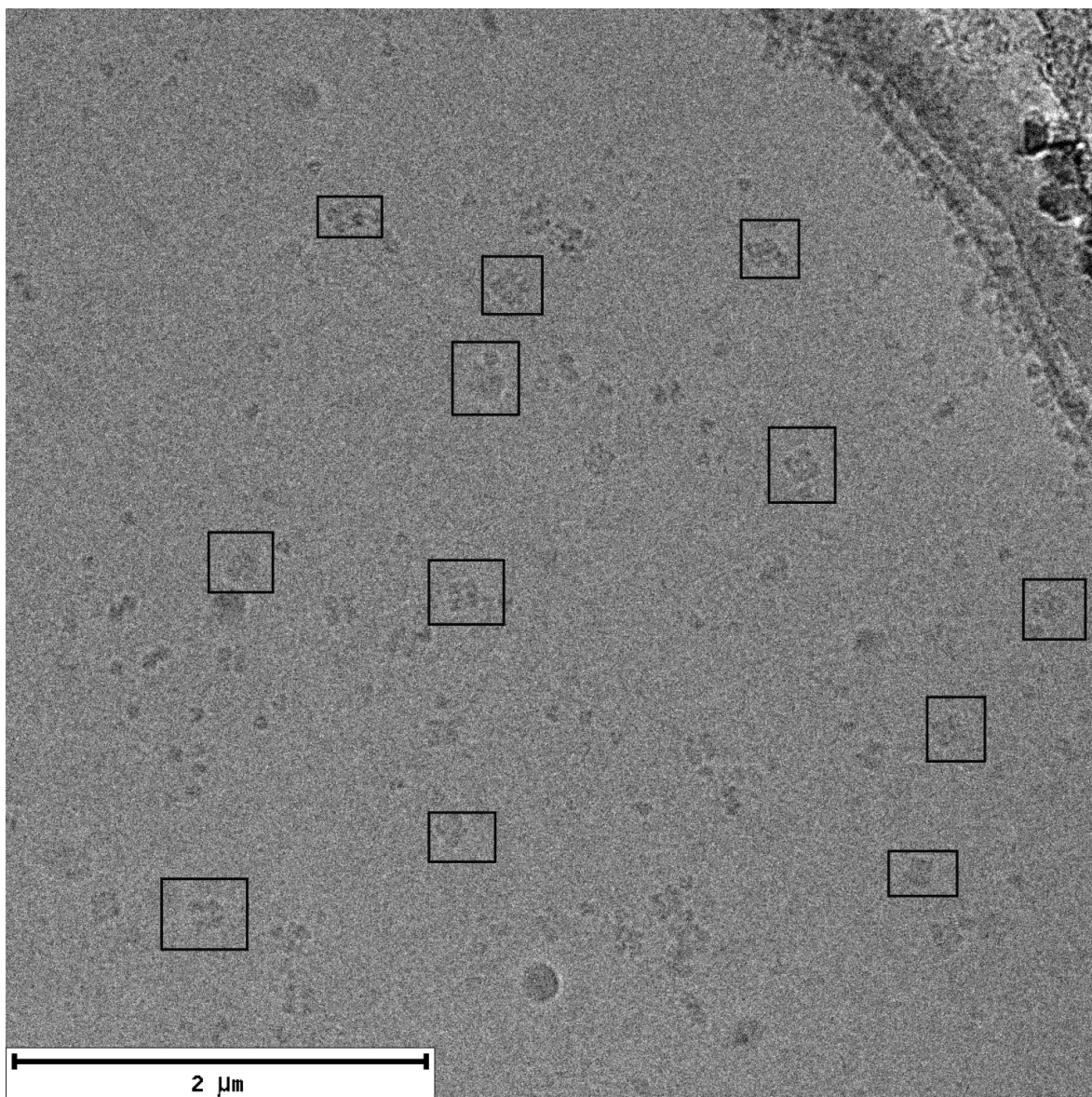


Figura 41 – Micrografia obtida pela técnica de crio microscopia. Os retângulos representam algumas partículas distribuídas no gelo.

O procedimento foi possível somente para 172 micrografias que foram consideradas por apresentar um bom CTF. Essas 172 micrografias foram utilizadas para a obtenção de partículas (Figura 42).

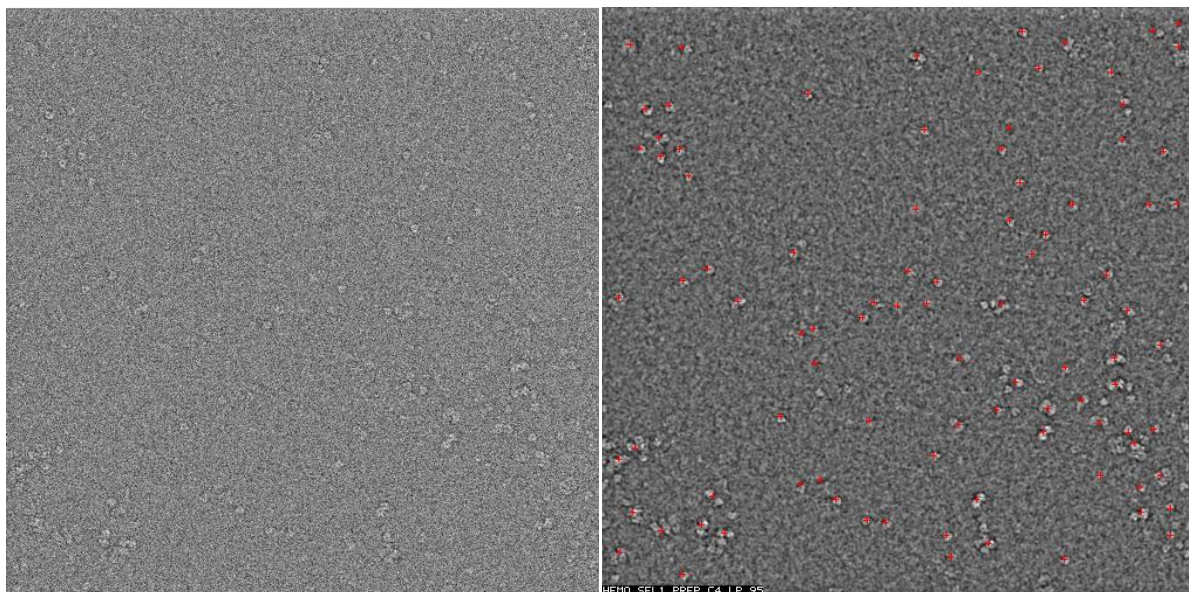


Figura 42 – Obtenção automática das partículas baseado na variância. A figura da esquerda corresponde a micrografia obtida diretamente do microscópio já a da esquerda representada com os pontos vermelhos as partículas recortadas.

Após a obtenção, as partículas foram selecionadas pela correlação cruzada (van Heel et al.,1992) com respeito a 12 referências com pouca rotação simétrica e as partículas obtidas foram submetidas à classificação automática. As classes resultantes (Figura 43) foram usadas por algumas etapas de alinhamento multi-referência e classificação. Após várias etapas desse refinamento, as classes foram usadas para procedimentos de reconstituição angular assumindo o grupo de simetria C2 para obter uma reconstrução 3D inicial (Figura 44). Para uma melhor interpretação da estrutura obtida, foi aplicado um filtro para retirar o ruído de alta frequência (Figura 45). A visualização foi feita usando o software Chimera.

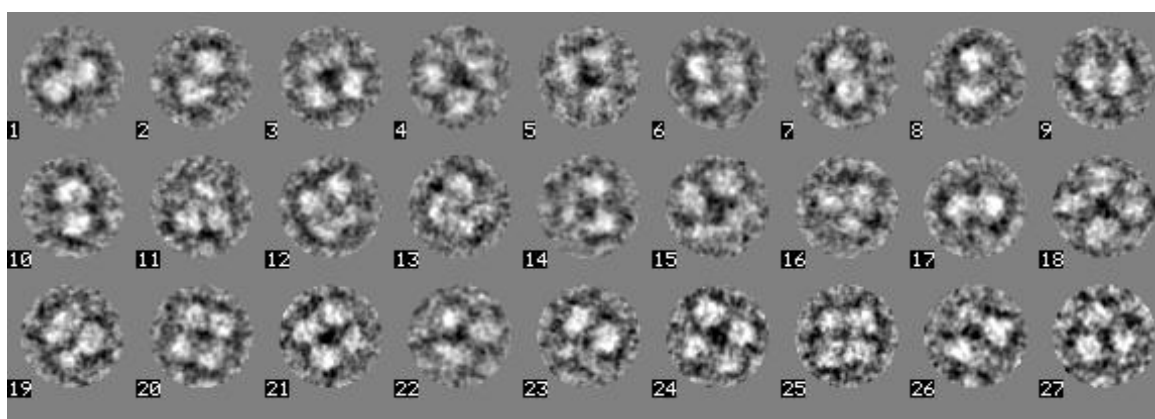


Figura 43 – Classes obtidas pela classificação automática das partículas

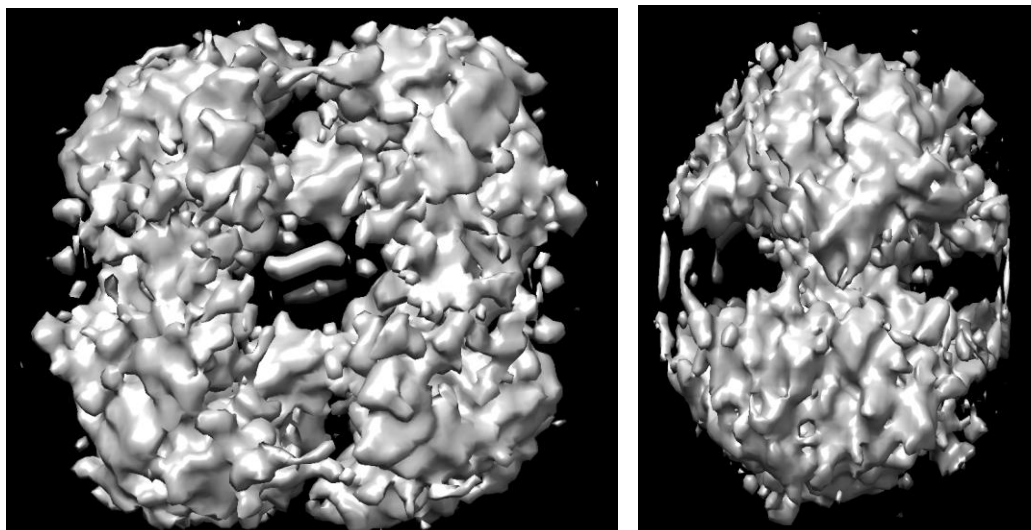


Figura 44 – O primeiro 3D baseado no conjunto de dados obtidos no LNNano mostra alto nível de ruído de alta frequência.

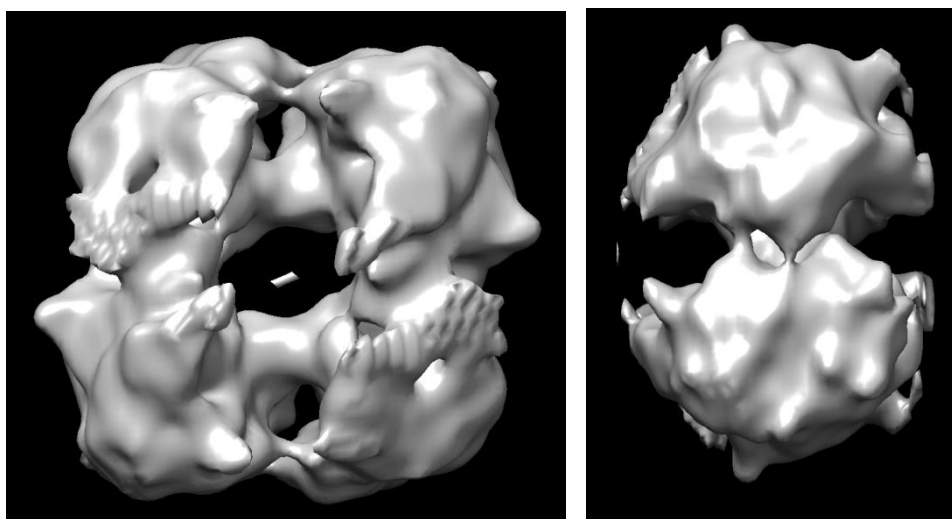


Figura 45 – O primeiro 3D após aplicar um filtro de baixa frequência para eliminar o ruído de alta frequência.

Após checar o primeiro modelo criado com o conjunto de dados do LNNano, nos realizamos uma coleta de dados usando o laboratório do NeCEN (The Netherlands Center of Nanoscopy) localizado na Universidade de Leiden. Este centro tem dois equipamentos equipados com um “*Field-Emission Gun*” (FEG) de alta resolução 300 kV e uma câmera de detecção direta (Falcon II).

As micrografias de crio-EM da amostra de hemocianina foram coletadas durante três dias consecutivos (3 x 24 horas) no TITAN KRIOS I no laboratório do NeCEN na Universidade de Leiden, Holanda, resultando em aproximadamente 1TB de dados.

Para conversão das micrografias no formato IMAGIC foi necessário criar uma lista de nomes excluindo as imagens que continham buracos vazios. Nos então usamos o programa “em2em” para converter todas as imagens em um único arquivo. Após a conversão, nos criamos outro índice no cabeçalho da imagem, chamado “user2”, o qual tem a localização de cada frame dentro do conjunto original.

Todos os frames (24.899) obtidos após a conversão foram somados, em grupo de sete, para criar (3.557) filmes. Nós selecionamos 2.254 bons filmes, aqueles que não apresentavam “drift”, regiões de gelo grosso ou má qualidade, e extraímos estes do arquivo original com todos os frames correspondentes (15.778). Essa seleção foi baseada em estatísticas como média de densidade dos tons de cinza (average density) e desvio padrão (sigma) dos filmes somados como mostra os histogramas abaixo (Figura 46).

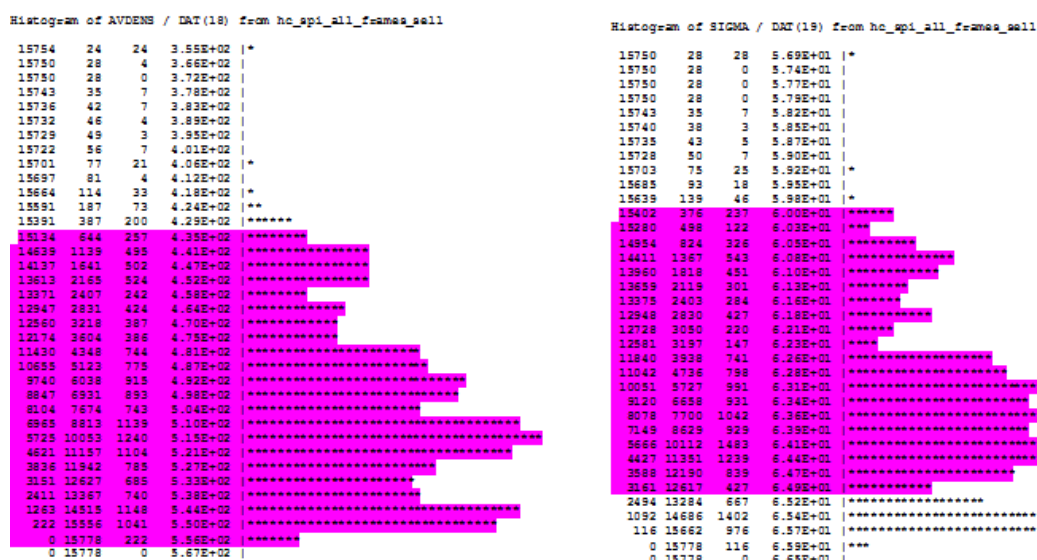


Figura 46 – Histogramas utilizados para seleção dos filmes. A região rosa representa os filmes selecionados pela média da densidade (esquerda) e sigma (direita).

Cada câmera tem suas propriedades específicas e nós aplicamos os procedimentos para padronizar as características de todos os pixels na câmera (Afanasyev et al., 2015). Para iniciar a correção da câmera foi necessário selecionar somente as imagens ativas (retângulo vermelho) no histograma. As áreas selecionadas dos frames ativos de 491 - 512 na média da densidade e 69,9 - 75,2 para sigma foram usadas para a normalização da câmera (Figura 47).

A câmera foi normalizada usando distribuição gaussiana.

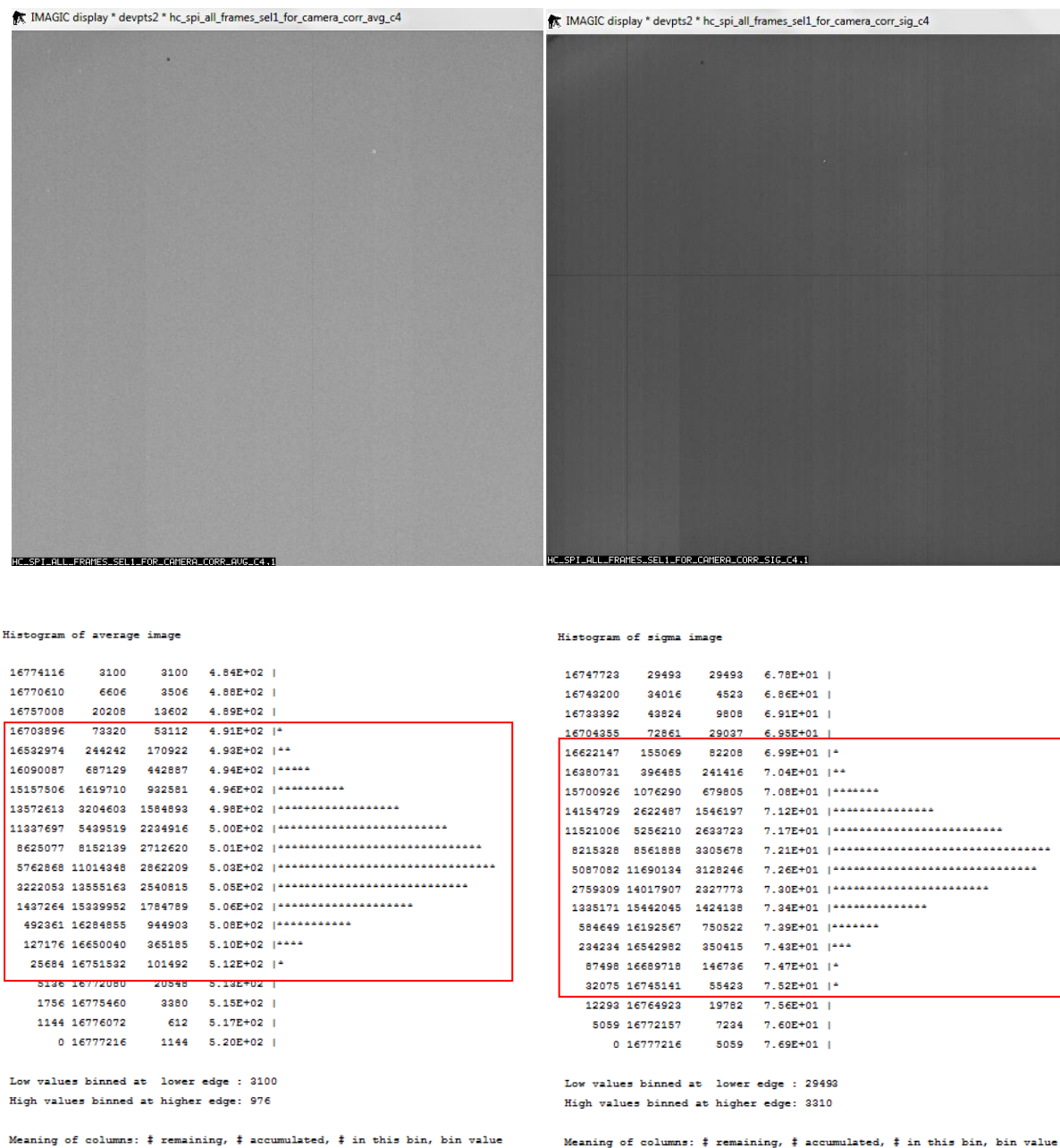


Figura 47 – Correção da câmera a posteriori. Utilizando normalização através dos valores de média de densidade (esquerda) e sigma (direita), foi possível corrigir as imperfeições da câmera. A soma total da média de densidade mostra pontos que são decorrentes de pixels danificados com o passar do tempo. A soma total de sigma das imagens revela algumas faixas com variação nos valores esperados. Abaixo, é apresentada a estatística média de densidade e de sigma para esse conjunto de dados. O retângulo vermelho refere-se a área selecionada.

Uma vez corrigido as imperfeições da câmera, é necessário alinhar os frames pertencentes a cada movie. Durante a aquisição de dados, os frames possuem deslocamentos na ordem de angstroms que interferem diretamente na resolução do conjunto de dados, portanto, sendo necessário um alinhamento dos frames para cada movie, incrementando a resolução do conjunto de dados.

Primeiramente, os 15.778 frames selecionados e corrigidos foram usados para preparar a imagens e coarseadas pelo fator 4, ou seja, 1.024 X 1.024 pixels, para o alinhamento dos frames. Após isso, foi necessário aplicar uma rotação equivalente nos dados não coarseados para calcular o p-spectra e checar se os frames foram alinhados corretamente.

Uma vez que o p-spectra foi calculado para todos os frames, nós cortamos a parte central e aplicamos um filtro de baixa frequência e realizamos o calculo de CTF e a correção do CTF. Nós selecionamos 14.287 frames (2.041 filmes) com bom CTF dos arquivos meio/meio para continuar o processamento do conjunto de dados (Figura 48).

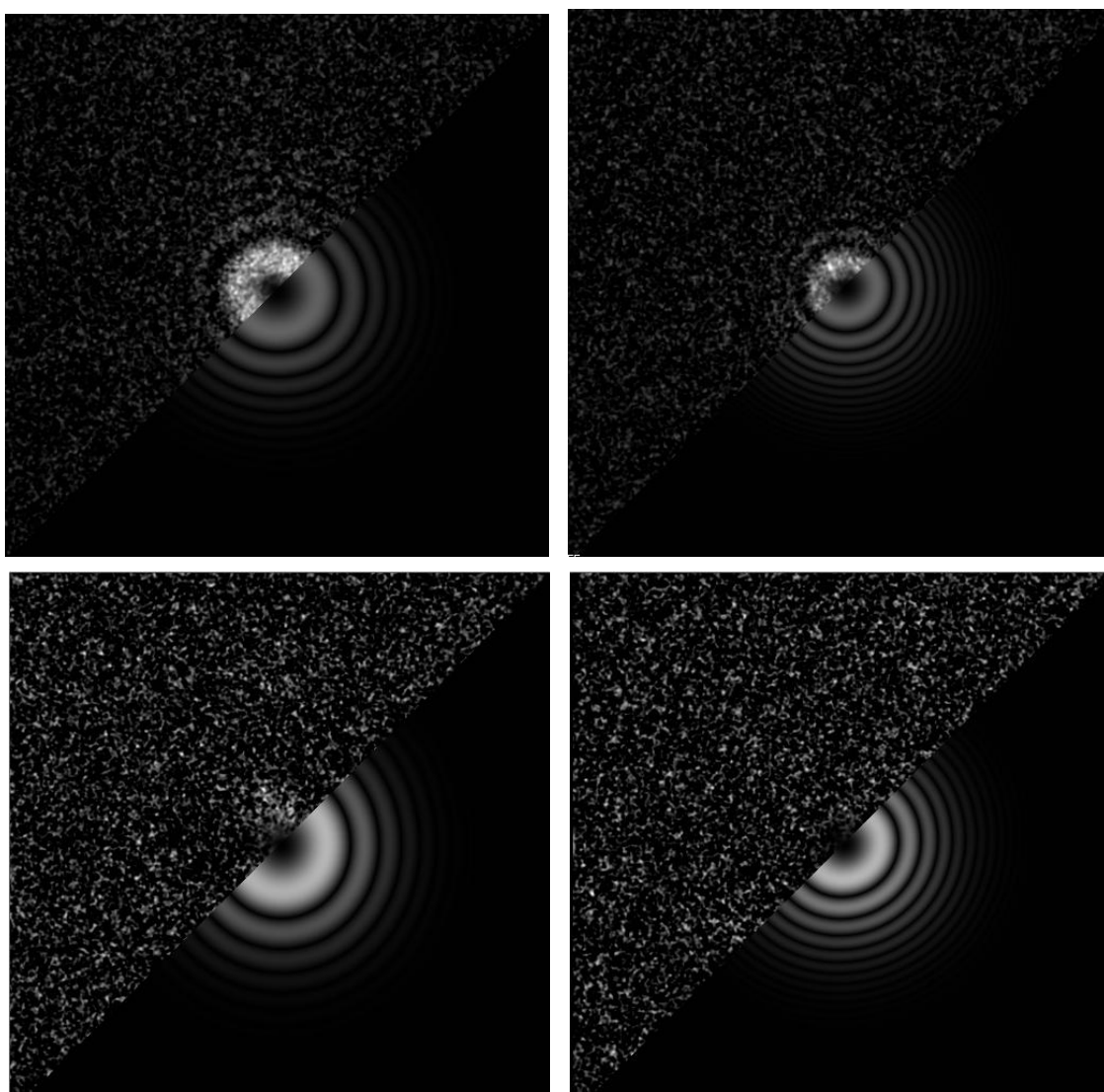


Figura 48 - Comparativo de bons e maus ajustes de CTF. As duas imagens superiores mostram que as curvas teóricas se ajustam com as amplitudes encontradas no conjunto de dados, sendo esse o padrão de imagens selecionadas para o processamento do conjunto de dados. Por outro lado, os

dados representados na parte inferior da figura mostram que não há ajuste entre a predição teórica e determinada experimentalmente, correspondendo a um mau ajuste de CTF.

Para a seleção de boas imagens, nos criamos um arquivo de coordenadas (plt) contendo a localização de bons filmes e então apagamos os filmes considerados com CTF ruim do arquivo original. As boas imagens foram “corseadas” (diminuídas de tamanho) 4 vezes e aplicado um filtro de baixa frequência para aumentar a visibilidade das partículas.

Para obter um primeiro modelo a partir desse conjunto de dados, selecionamos apenas as micrografias de alto contraste ($-3 \mu\text{m}$) e usamos para a obtenção das partículas. Aproximadamente 100 partículas por filme foram coletadas (Figura 49).

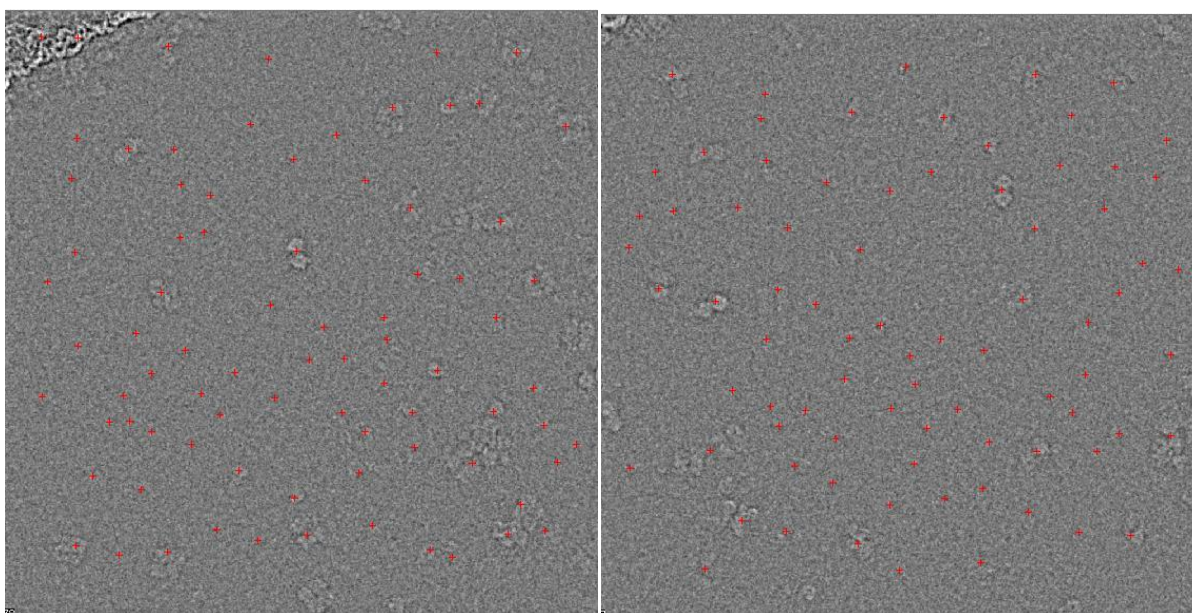
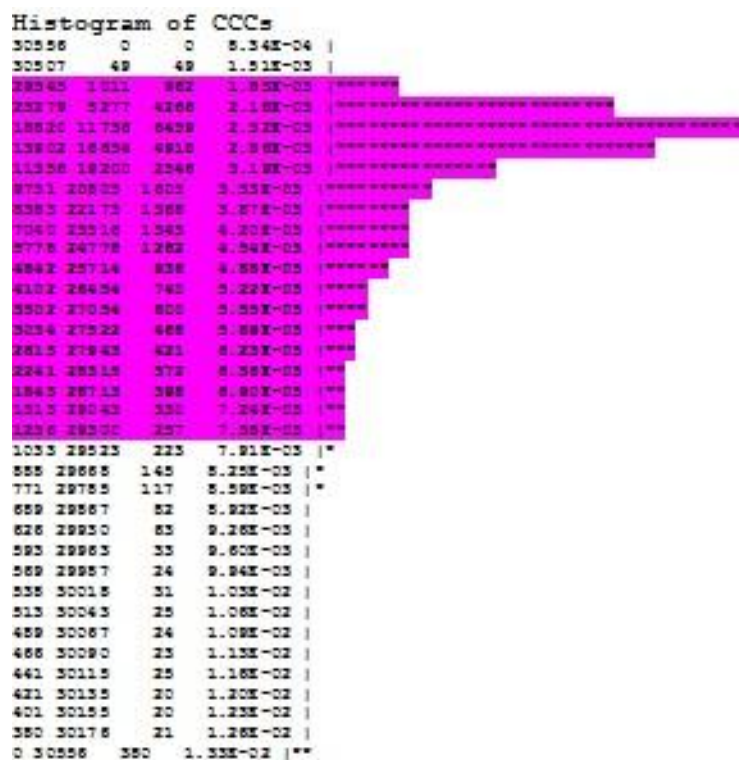


Figura 49 - Obtenção automática das partículas baseado na variância. Os pontos vermelhos representam as partículas recortadas das micrografias.

No final, nós obtemos 30.556 partículas recortadas e após a seleção por correlação cruzada, mostrado no histograma abaixo (Figura 50) na região rosa, resultou em 28.886 partículas (Figura 51).



Foram geradas 150 “eigenimages” (combinação linear de imagens) para esse conjunto de dados e todas foram usadas para a classificação (Figura 52).

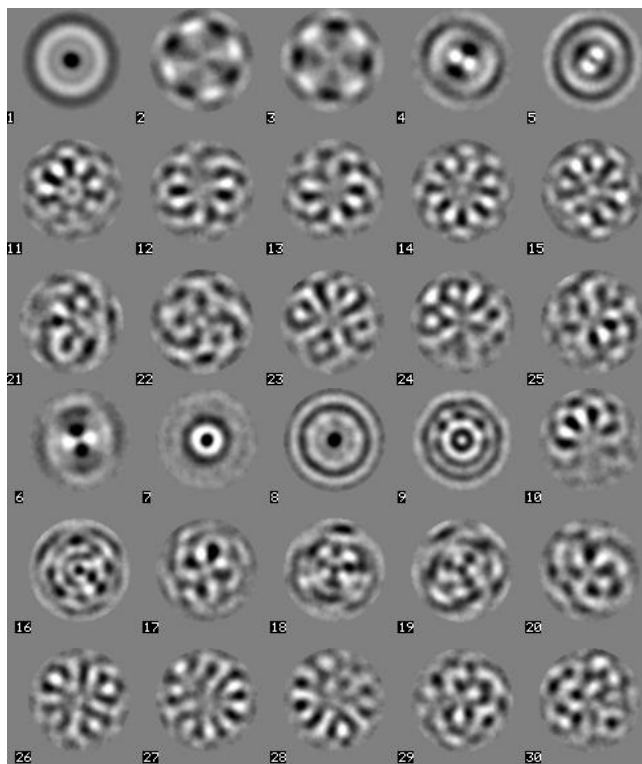


Figura 52 – Primeiras 30 Eigenimages que representam o conjunto de dados.

Nós classificamos as partículas em 1.000 classes e selecionamos pelo número de classes e qualidade para criar referências (Figura 53) para outro ciclo de obtenção de partículas.

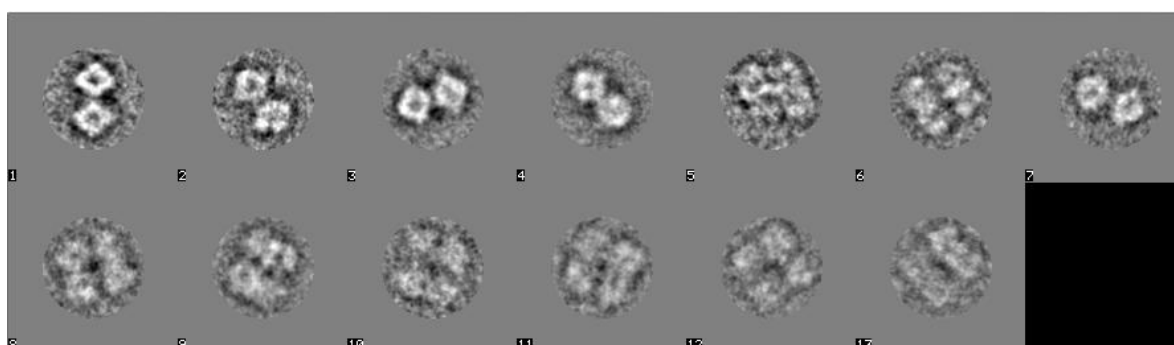


Figura 53 – Classes geradas pelo primeiro ciclo de classificação (MSA). Classes usadas como referência para outro ciclo de obtenção de partículas.

Com o objetivo de obter mais partículas, utilizamos as referências para um novo ciclo para obtenção das partículas do conjunto de dados de alto defocus pela metodologia de CCF (Função de correlação cruzada), que evita problemas com a variabilidade do *background* da imagem (Figura 54).

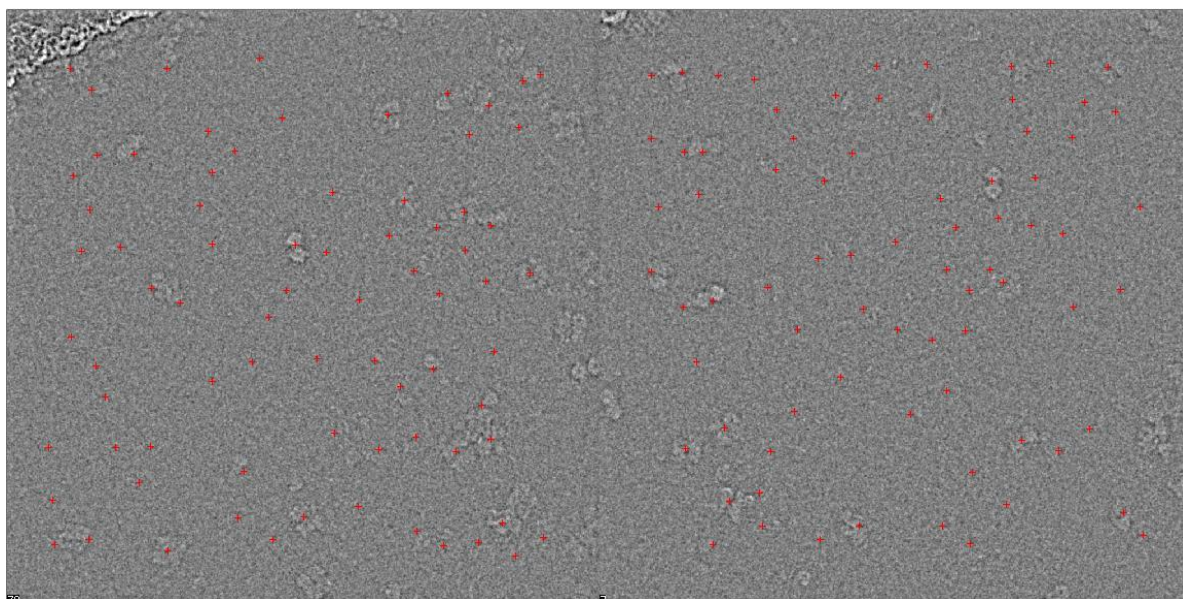


Figura 54 - Obtenção automática das partículas baseado na variância por CCF. Os pontos vermelhos representam as partículas recortadas das micrografias.

Nós recortamos as partículas das micrografias em caixas 192 x 192 num total de 29.886 partículas. Após a seleção por correlação cruzada (área rosa), resultou em 28.310 partículas e inativamos as ruins (2.105) pelo sigma (área amarela) para um novo ciclo de MSA como pode ser observado abaixo no histograma (Figura 55).

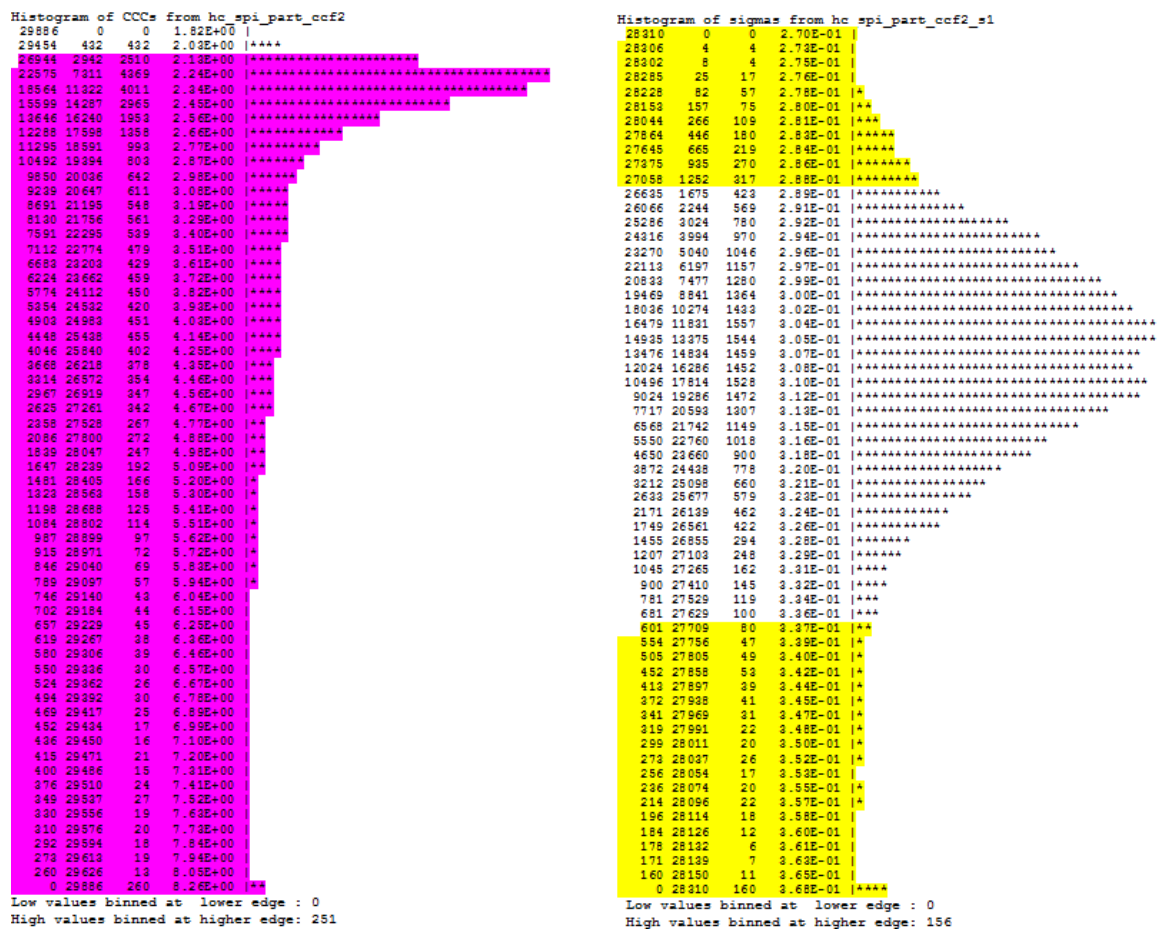


Figura 55 – Histograma para seleção de partículas. Os histogramas foram utilizados para selecionar as partículas, a região rosa (esquerda) corresponde às partículas selecionadas e a região amarela (direita) corresponde às partículas inativas.

As partículas foram “coarseadas” 2 vezes, aplicado um filtro de baixa frequência para aumentar o contraste.

Para gerar novas classes a partir dessas partículas obtidas, outro ciclo de MSA foi processado usando 100 “eigenimages” (Figura 56) para classificação em 100 classes (Figura 57).

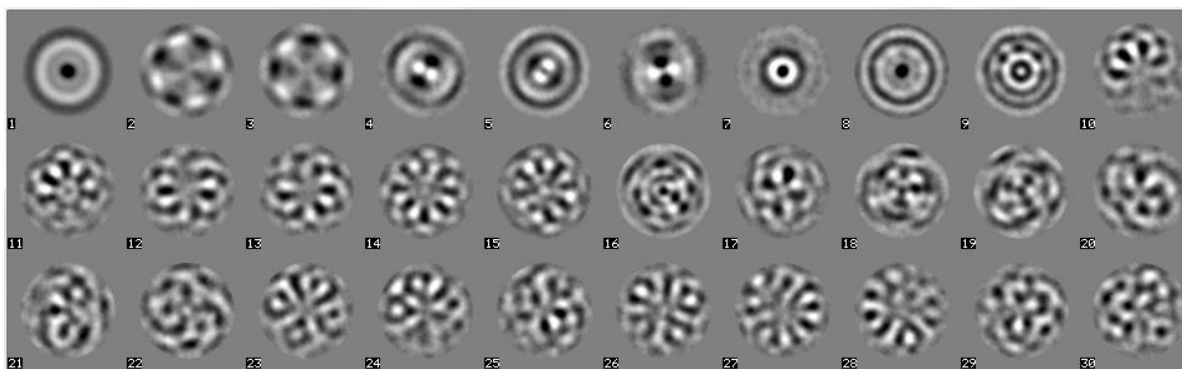


Figura 56 – Primeiras 30 eigenimages do novo ciclo de MSA.

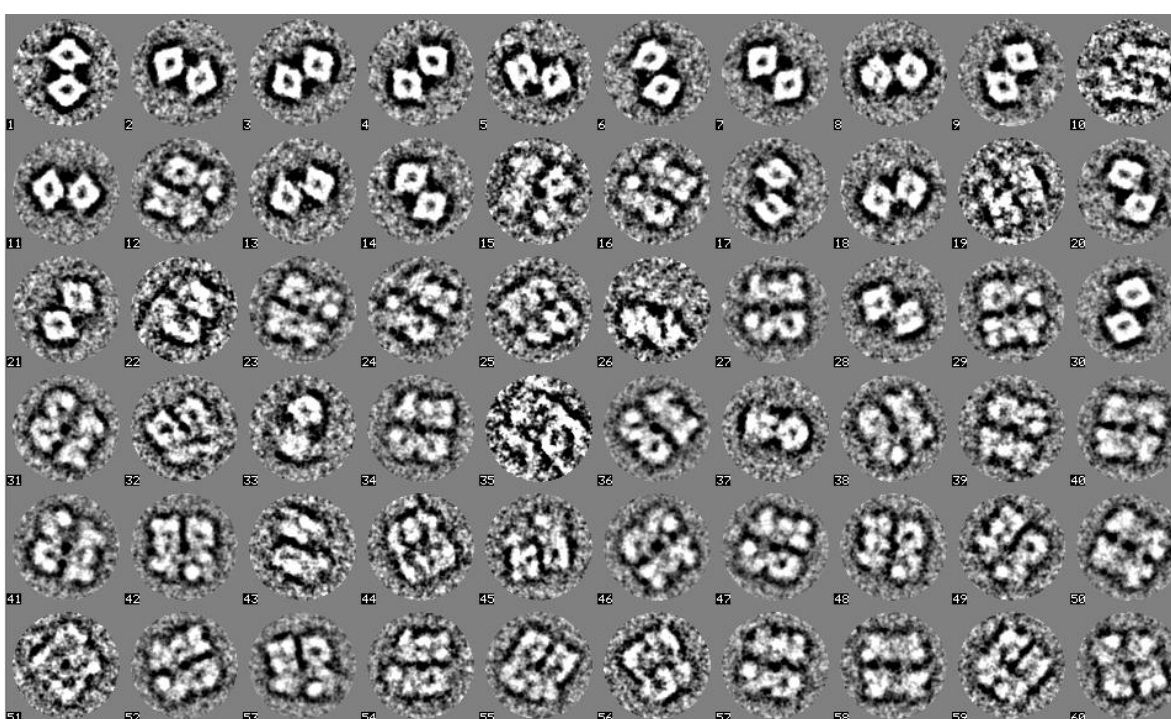


Figura 57 – Primeiras classes obtidas após seleção por qualidade.

Nós selecionamos as primeiras 66 classes, mascaramos e usamos para a primeira reconstituição angular (Figura 58).

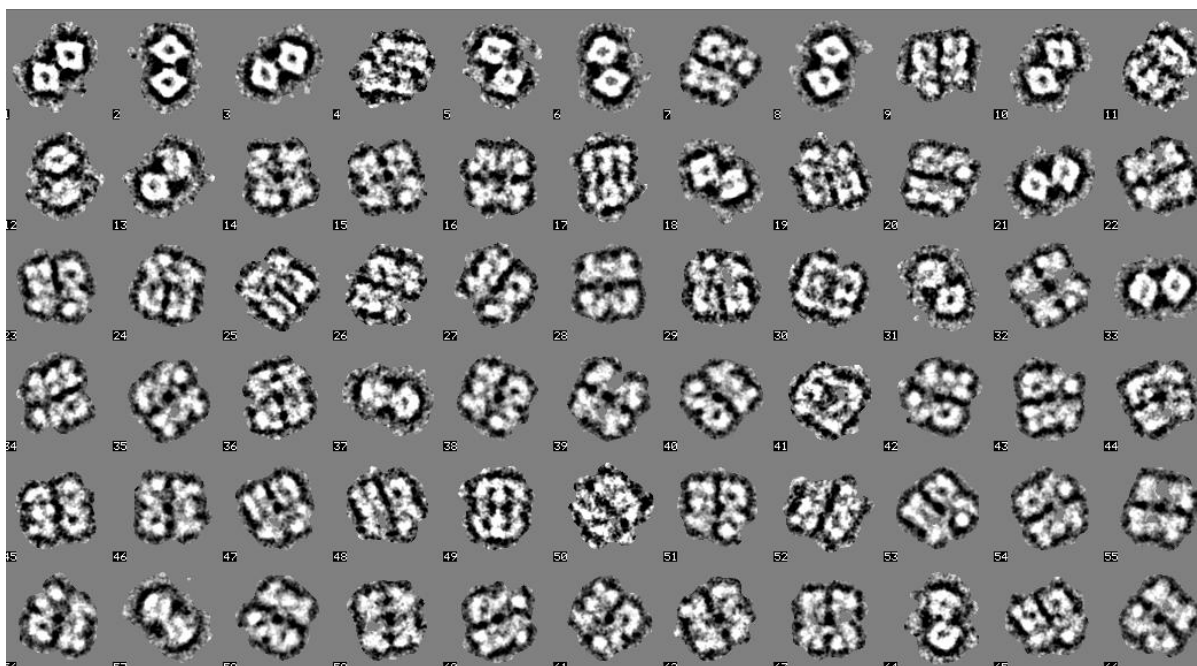


Figura 58 – Classes usadas para primeira reconstituição angular.

Após vários ciclos de refinamento, nós criamos as reprojeções do 3D (Figura 59) para usar como referência para a reconstituição de todas as classes. Nós checamos por erro angular e apagamos as consideradas ruins e criamos a imagem 3D final (Figura 60) como referência para um novo ciclo de obtenção de partículas.

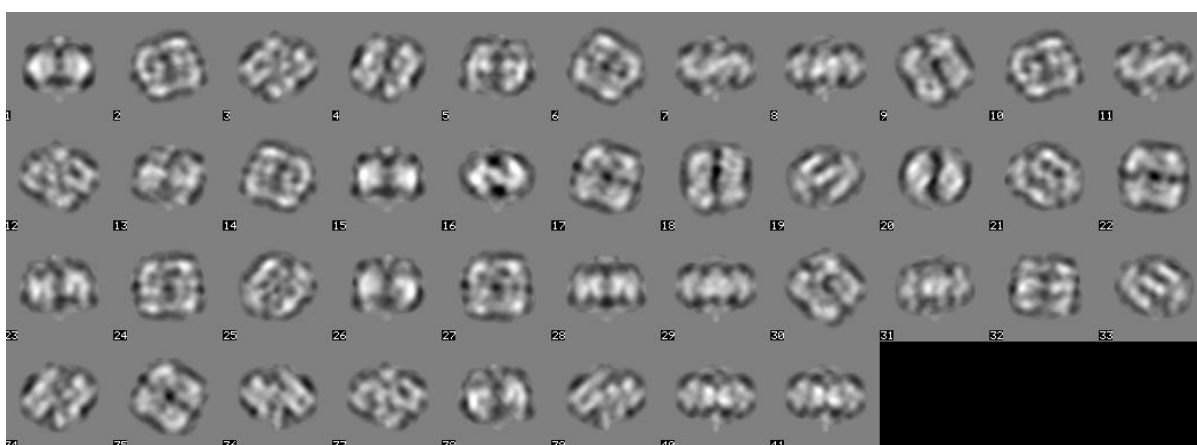


Figura 59 – Reprojeções usadas como referências para todas as classes.

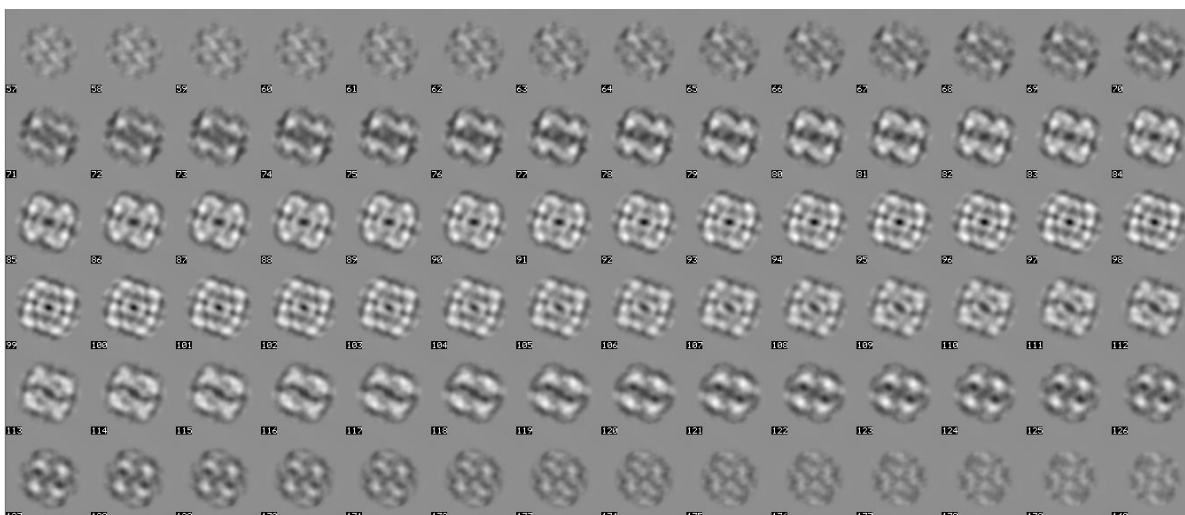


Figura 60 – Primeiro 3D obtido com todas as classes.

Depois de criada as refêrencias, nós realizamos um novo ciclo de obtenção de partículas automatizada, as partículas foram selecionadas por correlação cruzada e sigma e usadas para classificação. As classes foram usadas para reconstituição angular e reconstrução 3D. Após vários ciclos de refinamento, nos usamos as reprojeções para análise multi-referência. Essas partículas foram alinhadas com as refêrencias, e então submetidas a outro ciclo de classificação. As classes foram usadas para outro ciclo de reconstituição angular e reconstrução 3D (Figura 61).

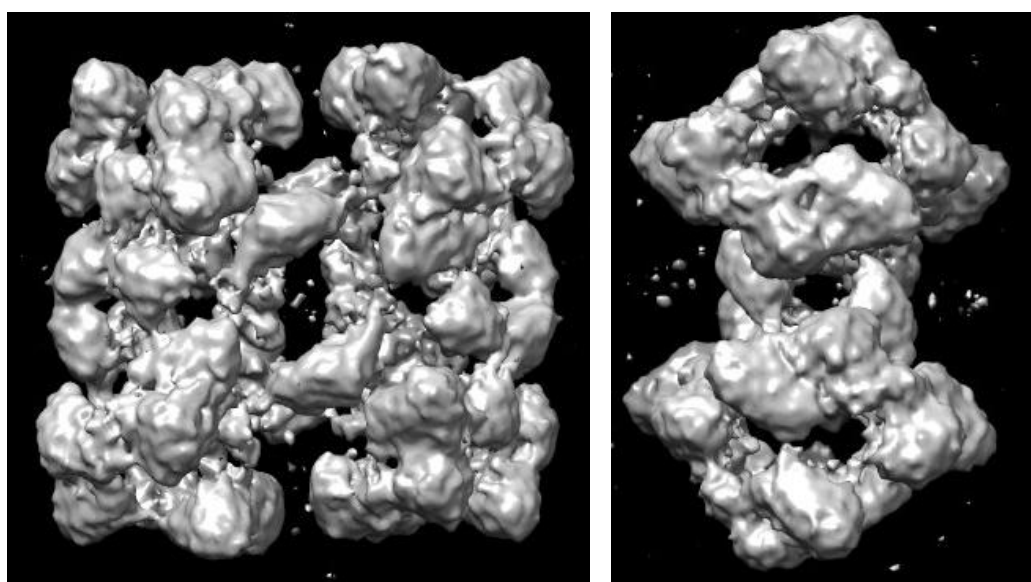


Figura 61 – O último 3D obtido com as classes de alto defocus ($-3\mu\text{m}$). Modelo 3D da hemocianina visualizado pelo programa Chimera. Vista superior (esquerda) e vista lateral (direita).

Usando as reprojeções (Figura 62) do 3D reconstruído com todas as referências (Figura 61), nos realizamos um novo ciclo de obtenção de partículas usando os pares de “defocus” (-1 μ m, -3 μ m) para validar este passo (Figura 63).

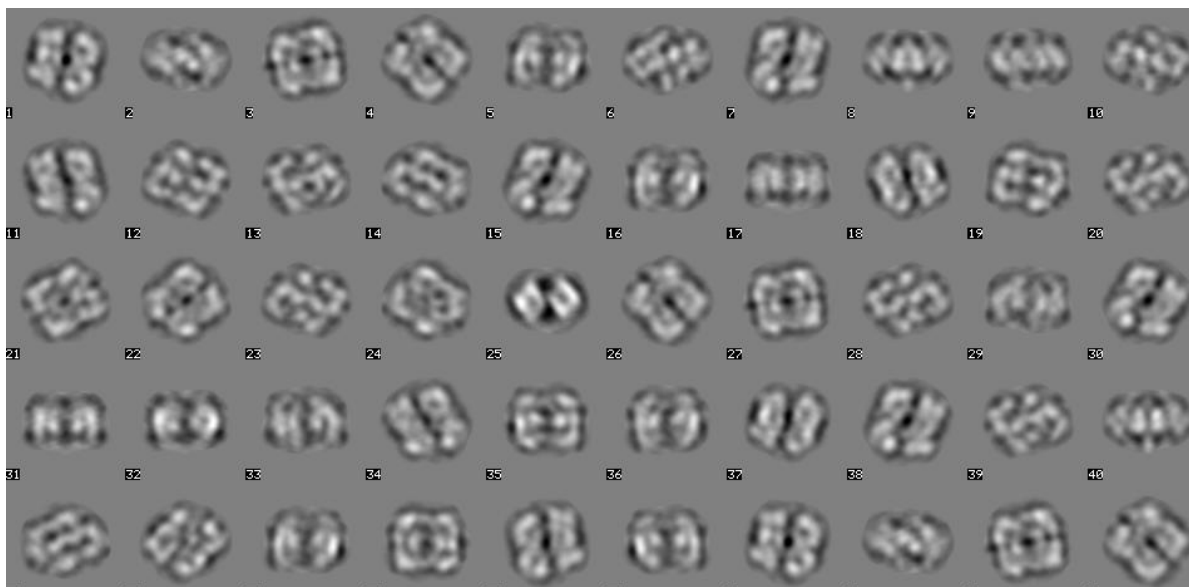


Figura 62 – Reprojeções do ultimo 3D usado para novo ciclo de obtenção de partículas.

Após checar todos os parâmetros, nos realizamos um novo ciclo de obtenção de partículas de todas as imagens (2.041 movies). Estes dados ainda estão sendo processados para alcançar a alta resolução da estrutura da proteína hemocianina com o objetivo de localizar o peptídeo rondonina.

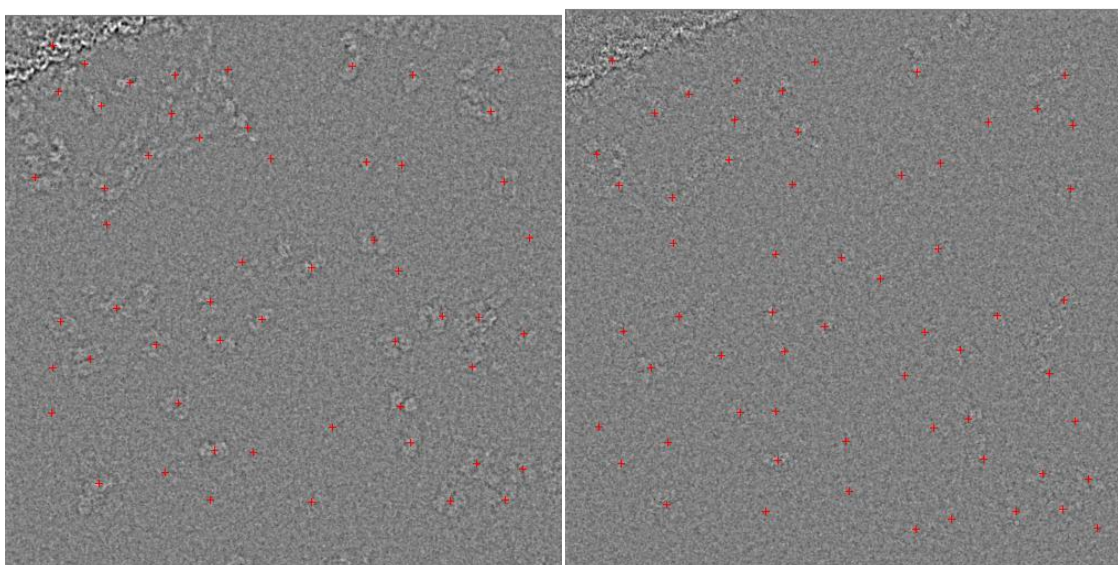


Figura 63 – Obtenção de Partículas automatizada com os pares de defocus para validação. O filme da esquerda corresponde ao alto defocus -3 μ m e a da direita corresponde a de alta resolução -1 μ m. Os pontos vermelhos correspondem as partículas recortadas. Como podemos ver as mesmas partículas foram recortadas nos dois filmes.

Nós recortamos as partículas das micrografias em caixas 384 x 384 num total de 116.144 partículas que estão sendo selecionadas e serão usadas para a reconstrução do 3D em alta resolução. Durante o processamento, utilizamos o programa que está em fase de aperfeiçoamento, portanto, todos os problemas encontrados deveriam ser reportados e levou um atraso na obtenção final do modelo tridimensional.

A criomicroscopia nos últimos anos tem se tornado uma técnica muito utilizada e com a sofisticação das câmeras de detecção, a obtenção de uma molécula individual pode ser colectada em dezenas de frames por segundo. A técnica de “cryo-EM” está causando revolucionando o campo da biologia estrutural, uma vez que moléculas podem ser obtidas na sua forma nativa já que estão envoltas de um gelo amorfo (Callaway, 2015).

Com o desenvolvimento da reconstrução por “cryo-EM”, muitas estruturas de baixa e média resolução de hemocianina de artrópodes foram resolvida recentemente. As estruturas de *Limulus* (48-mer) e *Scutigera* (36-mer) foram publicadas a 10 Å de resolução (Markl et al., 2009; Martin et al., 2007) e a estrutura de hemocianina do escorpião *Pandinus imperator* (24-mer) a 6.8 Å (Cong et al., 2009).

Essa será a primeira estrutura de alta resolução a ser reconstruída a partir de hemocianina de aranha. De acordo com o material obtido, esperamos alcançar a resolução de 3,5 Å.

4.3 Hemocianina

Hemocianinas são complexos grandes de multi subunidades de proteínas alostéricas representando uma das três classes de proteínas respiratórias animais. Estas estão livremente dissolvidas na hemolinfa de artrópodes e moluscos e constituem um grupo predominante de proteínas da hemolinfa neste táxon, cerca de 50% a 90%, e em algumas espécies está presente em concentrações acima de 100mg/mL (Coates et al., 2012).

A hemocianina da aranha migalomorfa *Aphonopelma hentzi* é um complexo de proteínas nativas de 24-mer constituindo de dois dodecâmeros idênticos com uma massa molecular total estimada em cerca de 1.800 kDa (Markl et al, 1979,

1980, 1986; Shneider et al, 1977). A formação do complexo 24 mer exige a agregação de sete tipos diferentes de subunidades na mesma quantidade com quatro cópias de cada uma das subunidades a, d, e, f e g, e duas cópias da subunidade b e c (Markl, 1981, 1986).

Cada subunidade da hemocianina dos artrópodes (~70 - 75kDa) consiste de três domínios; domínio I contem de 5 a 6 α -hélices, domínio II contem um feixe de 4 α -hélices e o domínio III é de sete folhas β antiparalelas presas. O domínio II engloba o centro di-cobre (Jaenicke et al.,2012; Hazes et al.,1993; Magnus et al.,1994; Rehm et al.,2012, Volbeda, Hol, 1989; van Holde et al.,2001).

Na aranha caranguejeira *Acanthoscurria rondoniae* identificamos diversos peptídeos antimicrobianos derivados de hemocianina, neste caso é muito interessante a separação e identificação das subunidades. Na biblioteca de cDNA construída a partir de hemócitos de *Acanthoscurria gomesiana*, o alinhamento das subunidades de hemocianina encontrados com *A. hentzi* sugerem que existe uma oitava subunidade (Lorenzini, 2006). Neste contexto procuramos saber se em *A. rondoniae* também encontramos sete ou oito subunidades. Para avaliar o número de subunidades existentes aquecemos a solução de hemocianina em tampão de dissociação a 95 °C por 20 minutos em banho seco. Após esse procedimento, a amostra, em diferentes concentrações (100 μ g, 50 μ g e 25 μ g) foi diluída em tampão de amostra (4 x concentrado) com ou sem redução e submetida à eletroforese 6% SDS-PAGE revelando cinco bandas distintas como mostra a Figura 64.

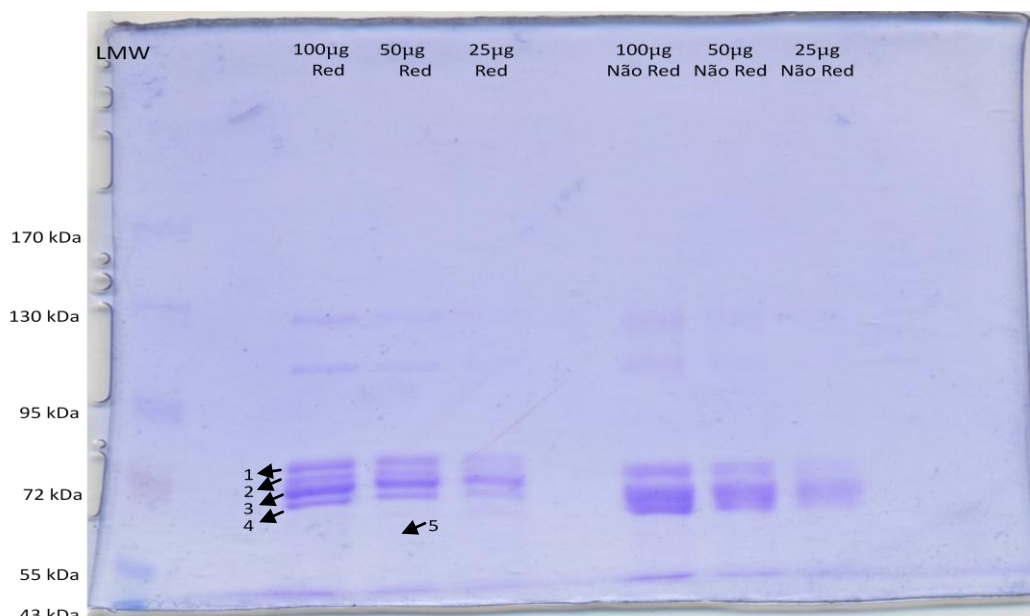


Figura 64 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Amostras de Hemocianina reduzidas ou não reduzidas após tratamento com tampão de dissociação.

Obtivemos uma melhor separação em amostras reduzidas e na maior concentração testada. As bandas observadas no gel, numeradas de 1 a 5, foram recortadas e submetidas à digestão “in gel” segundo protocolo já descrito (3.2.2 - Digestão “in gel”). As amostras obtidas da digestão foram submetidas à espectrometria de massas e os espectros obtidos transformados e analisados em banco de dados SwissProt com filtro para Arachnida. Pudemos verificar a presença de cinco subunidades existentes em *Aphonopelma hentzi* (Tabela 5). Apenas a subunidade E foi totalmente isolada, o que nos levou a acreditar que precisamos melhorar a técnica de separação.

Tabela 5 – Análise de bioinformática - Busca em banco de dados das bandas recortadas e tratadas (ND não detectado)

Banda	Subunidade	Score	Fragmentos
1	Hc A	17	R.AMGYPFDR.K
2	Hc F	164	R.IFLGPTQDELGNR.L
	Hc E	179	K.GIVVPAIQEIFPDR.F
3	Hc D	18	R.ILPLFK.K
	Hc G	35	K.GVTLPPIQEVFPDR.F
4	Hc A	60	K.DTGNILDPEYK.L
	Hc D	76	R.FVPAETINR.A
5	ND	ND	ND

Com o intuito de melhorar a separação das subunidades da hemocianina, esta foi submetida à eletroforese bidimensional onde pudemos verificar a presença de 10 “spots” distintos (Figura 65). Esses “spots” foram recortados, e analisados por espectrometria de massas para identificação das subunidades (Tabela 6 **Error! Reference source not found.**). Podemos observar que spots localizados próximos (“spots” 6, 7 e 8) apresentam a mesma subunidade identificada após análise em banco de dados.

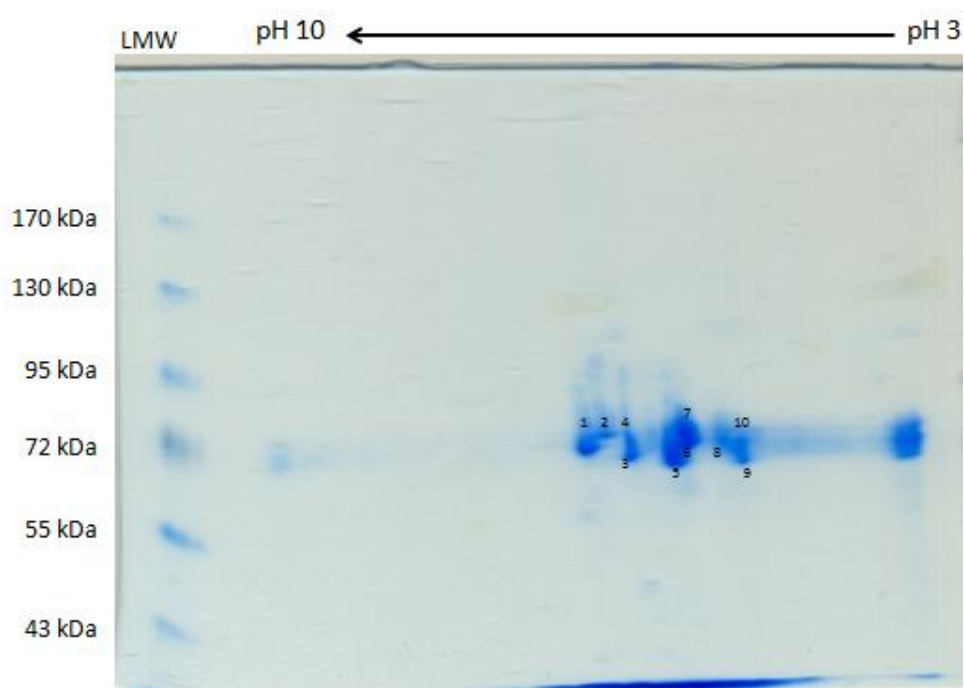


Figura 65 – Eletroforese bidimensional da hemocianina pH 3 a pH 10.

No total foram observadas a presença de seis (Hc A, Hc B, Hc D, Hc E, Hc F, Hc G) das sete subunidades existentes em *Aphonopelma hentzi* (*Eurypelma californicum*) como verificados na tabela abaixo (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de bioinformática - Busca em banco de dados dos spots recortados e tratados.

Spot	Subunidade	Score	Fragmento
1	Hc B	30	R.DPIFYR.W
	Hc D	271	R.DDCNGVVLPPIQEVFPDR.F
	Hc E	30	R.DDCKGIVVPAIQEIFPDR.F
2	Hc D	29	R.DDCNGVVLPPIQEVFPDR.F
	Hc F	86	R.DLVDFVDVQDMAR.W
3	Hc G	36	K.IHTAEEILTPNMSLTDVVIQYVGHE.-
4	Hc G	89	R.FVDNIFQEYK.A
5	Hc A	147	R.SSTDSSVTLSSVHTFK.E
	Hc F	33	R.FIDNIFQEYK.A
6	Hc E	26	R.TLNIELDKFK.A
7	Hc E	69	K.GIVVPAIQEIFPDR.F
8	Hc E	133	K.GIVVPAIQEIFPDR.F
9	Hc A	19	K.DTGNILDPEYK.L
10	Hc B	24	R.ILKDMR.E
	Hc G	29	R.IVSVQVNAK.S

De acordo com o gel 2D (pH 4-7) somente foi possível identificar seis bandas (Figura 66), provavelmente esse resultado se deve ao ponto isoelétrico das subunidades serem muito semelhantes e apresentarem peso moleculares próximos (Tabela 7).

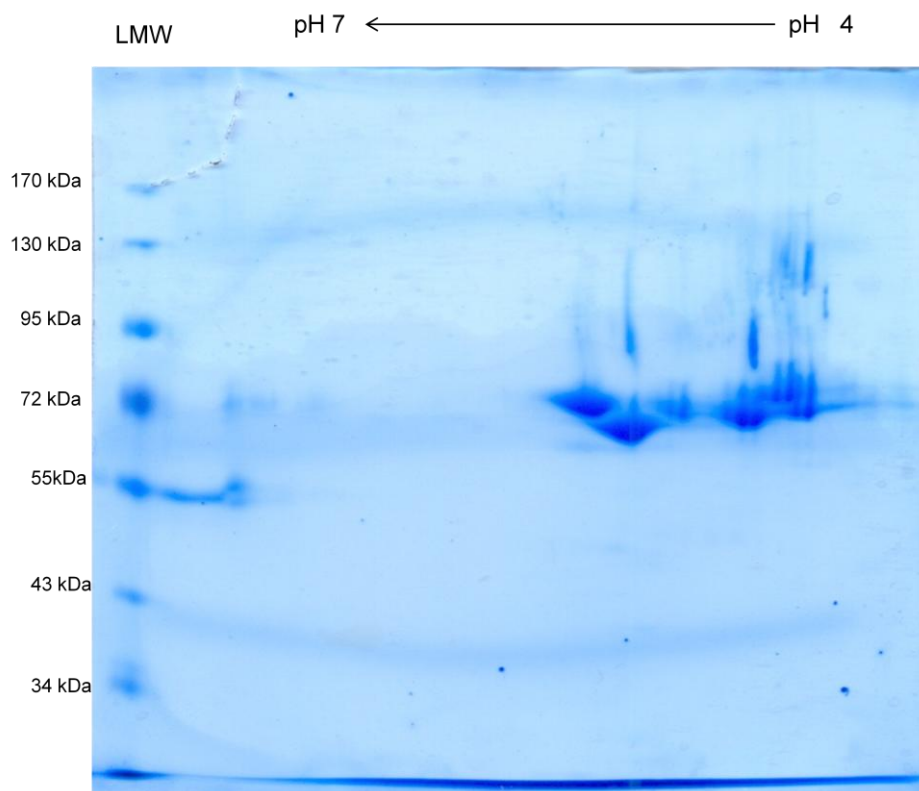


Figura 66 – Eletroforese bidimensional da hemocianina pH 4 a pH 7.

Voit et al., 2000 observou que no sequenciamento das sete subunidades existentes a partir do cDNA construído a partir do material genético extraído do coração da aranha *A. hentzi*, as subunidades apresentaram um alto grau de aminoácidos conservados o que pode estar prejudicando a nossa análise, sendo que íons gerados podem estar presente em mais de uma subunidade, como podemos ver na Tabela 5 a identificação de diferentes subunidades com o mesmo íon na fragmentação.

Tabela 7 – Análise das subunidades com a ferramenta expasy.

Subunidade	PI	PM (Da)	PM + IAA
Hc A	5,5	72.388	72.955
Hc B	5,78	72.231	72.803
Hc C	5,57	72.582	73.268
Hc D	5,87	72.122	72.694
Hc E	5,38	71.459	72.088
Hc F	5.9	72.031	72.545
Hc G	5.83	71.729	72.357

Como não foi possível identificar corretamente as subunidades através do gel de eletroforese e com o objetivo de obter a sequência completa das subunidades da aranha caranguejeira *A. rondoniae*, foi realizada a análise do transcriptoma obtido a partir dos hemócitos. Após a montagem dos contigs, uma busca utilizando as sete subunidades já sequenciadas anteriormente para a aranha caranguejeira *A. hentzi* (Voit et al., 2000) foi realizada, assim obtemos as sequências das subunidades por consensus (Tabela 8).

Tabela 8 – Identificação dos contigs. Contigs montados referentes as subunidades de hemocianina

contig	Subunidade
TRINITY_DN52286_c1_g1_i1	Hc A
TRINITY_DN35476_c0_g1_i1	Hc B
TRINITY_DN58239_c0_g1_i1	Hc C
TRINITY_DN40774_c0_g1_i1	Hc D
TRINITY_DN58496_c0_g1_i1	Hc E
TRINITY_DN65331_c1_g2_i1	Hc F
TRINITY_DN56571_c0_g1_i1	Hc G

O resultado nos revelou que em *A. rondoniae* as subunidades apresentam regiões bem conservadas com *A. hentzi* (Figura 66) com porcentagem de identidade maior que 94% para todas as subunidades, demonstrando que essa proteína é bem conservada nas aranhas migalomorfas. O alinhamento entre as subunidades também nos mostram essa conservação, dificultando um pouco a análise por espectrometria de massas (Figura 67).



Figura 67 - Alinhamento das subunidades da hemocianina da aranha caranguejeira *Acanthoscurria rondoniae* com as subunidades da aranha *Aphonopelma hentzi*. As análises foram realizadas utilizando a ferramenta ClustalX no programa Jalview. As regiões em azul representam as regiões conservadas entre elas (Hc* – *A. rondoniae*, HcY* – *A. hentzi*).

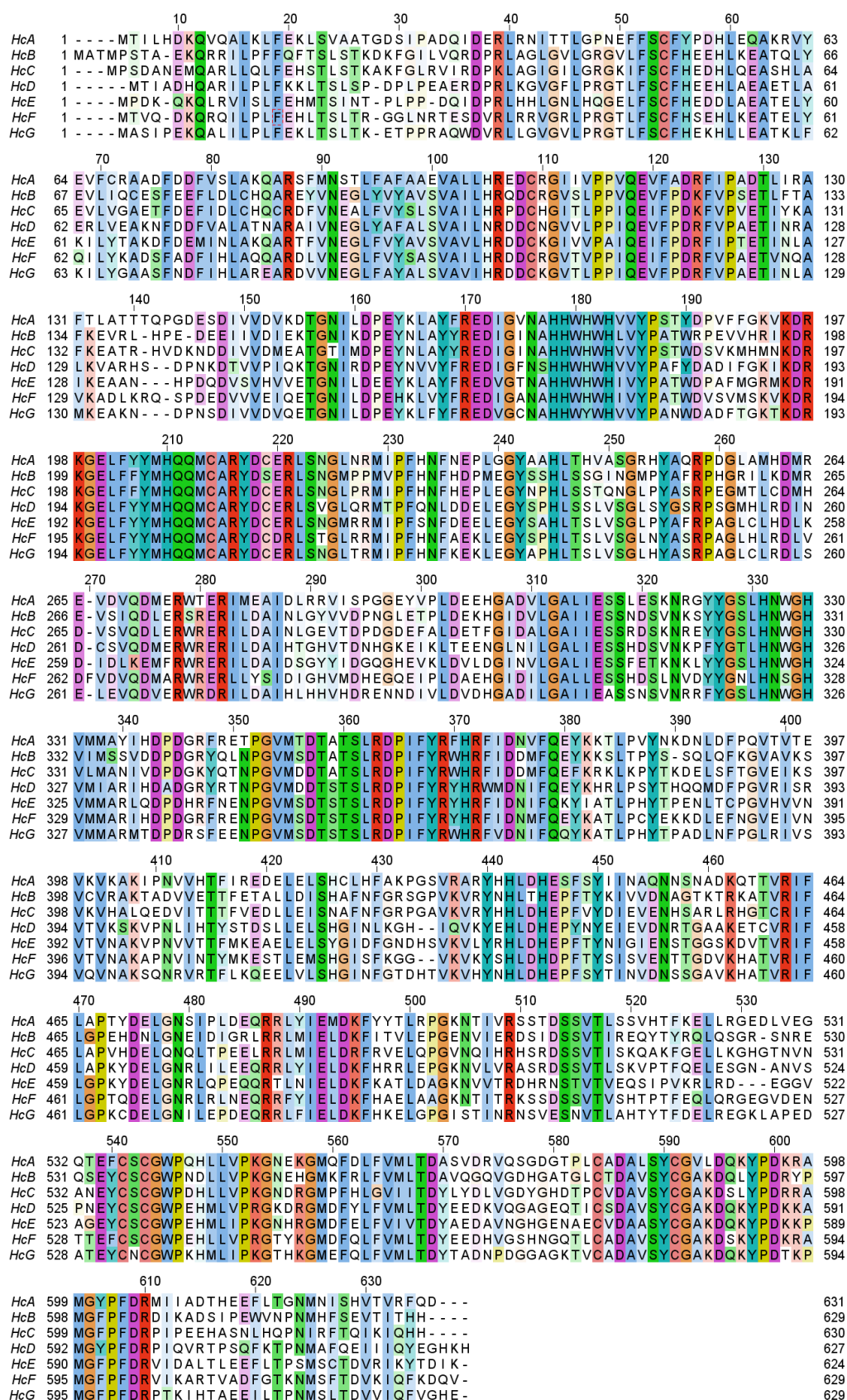


Figura 68 – Alinhamento das sete subunidades da hemocianina da aranha caranguejeira *Acanthoscurria rondoniae*. As análises foram realizadas utilizando a ferramenta ClustalX no programa Jalview. As regiões coloridas representam as regiões conservadas entre elas.

A anotação dos contigs montados foi feita a partir de comparação das sequências obtidas nesse transcriptoma com banco de dados do uniprot de aracnídeos através da ferramenta Blastp. O resultado obtido nos mostra que existem poucas moléculas ainda não caracterizadas 29,02% como mostra o gráfico abaixo (Figura 69). Apenas 1,49% de todo o transcriptoma corresponde a hemocianina, o que pode nos levar a acreditar que essa proteína é pouco expressa uma vez que é produzida e armazenada nos cianócitos.

Dentre as subunidades da hemocianina, a mais expressa é a subunidade D (29,95%) que pode sugerir seu uso como possível geradora de peptídeos antimicrobianos (Figura 70).

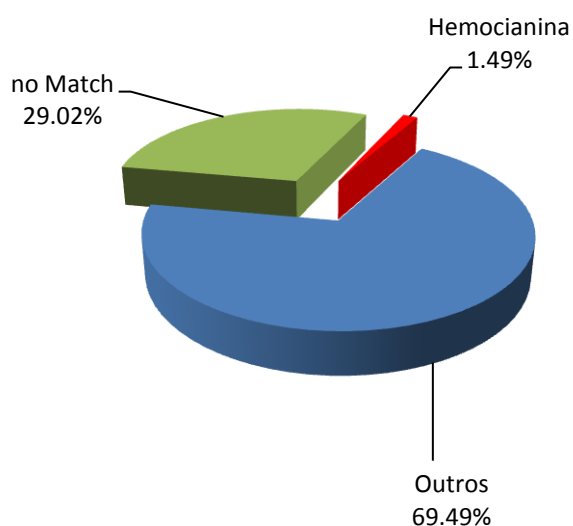


Figura 69 – Nível de expressão da hemocianina em relação ao transcriptoma obtido a partir dos hemócitos de *Acanthoscurria rondoniae*.

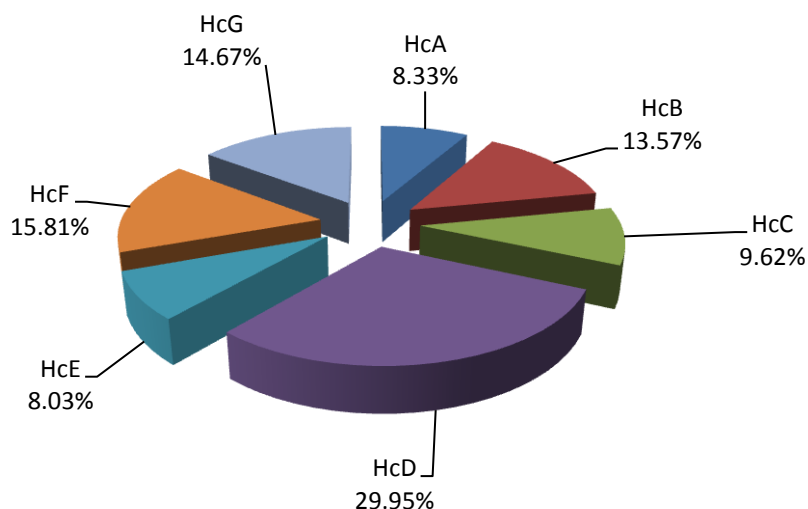


Figura 70 – Nível de expressão das subunidades da hemocianina de *Acanthoscurria rondoniae*.

A hemocianina dos Chelicerata não contém nenhum peptídeo sinal no N-terminal que tem como alvo a proteína para a via secretora (Voit et al., 2000). As hemocianinas dos Chelicerata são sintetizadas por ribossomos livres e após, liberadas pela ruptura dos hemócitos (Kempter, 1983) como podemos ver pelos resultados obtidos, onde nenhum peptídeo sinal foi localizado.

4.4 Rondonina

4.4.1 Atividade Antifúngica

Para ampliar o espectro de atividades do peptídeo rondonina, novos ensaios de inibição em meio líquido foram realizados. Esse peptídeo se mostrou ativo não somente contra leveduras do gênero *Candida* como já visto anteriormente (Riciluca et al., 2012). O peptídeo também se mostrou ativo contra a única levedura encapsulada capaz de causar uma doença a seres humanos, o *Cryptococcus neoformans* (Ribas et al., 2011). Este fungo apresenta característica de ser oportunista podendo acometer pacientes imunodeprimidos (Filiú et al., 2002). O fungo apresenta uma cápsula polissacarídica que o protege da fagocitose, reduzindo assim a apresentação de antígenos pelas células T o que ocasiona numa diminuição da resposta imunológica do hospedeiro (Reolon et al., 2004), o que torna nosso resultado interessante.

Não foi observada atividade contra *Sacharomyces cerevisiae*, essa levedura pertence ao filo Ascomycota (Kurtzman, 1997), no qual podemos encontrar os fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Cladosporium sp* e *Penicilium fumegatus*, que já foram testados anteriormente e o peptídeo não apresentou atividade (Riciluca et al., 2012). Esta levedura está associada a processos industriais como a panificação, produção de etanol e vinhos, além de uso na indústria e farmacêutica na obtenção de lepirudina (Schaden, Kozek-Langenecker, 2010) se tornando bem interessante o resultado encontrado nesse trabalho.

O fungo entomopatogênico *Paecilomyces farinosus* é encontrado em regiões tropicais, sendo sapróbio de solos florestais e parasita de várias espécies de artrópodes. Foi encontrado em larvas de Lepidoptera, pupas de Diptera, Coleóptera, Hymenoptera, pupário de Hemiptera e Arachnida (Goettel et al., 1990), a rondonina não foi capaz de inibir o crescimento desse fungo na concentração testada contra esse patógeno como podemos observar na tabela abaixo (Tabela 9).

Tabela 9 – Atividade antifúngica do peptídeo rondonina. Avaliação da concentração mínima inibitória do peptídeo rondonina com concentração inicial de 200µM. (ND – não detectada na concentração testada)

Microrganismos	Rondonina CIM µM
<i>Cryptococcus neoformans</i>	50 -25
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	ND
<i>Paecilomyces farinosus</i>	ND

Cryptococcus neoformans é um patógeno levedura-like encapsulado que causa meningoencefalite em indivíduos imunossuprimidos. Meningite criptocócica é uma das mais importantes infecções fúngicas desenvolvida em pacientes infectados por HIV-1 e a terceira mais frequente em complicações neurológicas em pacientes com AIDS (Del Valle, Piña-Oviedo, 2006).

4.4.2 Atividade Antifúngica pH Dependente

Doenças causadas por fungos passaram a receber maior atenção no século passado, principalmente nas duas décadas finais, com o advento da AIDS, avanços nas terapêuticas de doenças de base, maior uso de antibacterianos, aprimoramento de técnicas de transplantes, ou seja, com a maior sobrevivência de pacientes. Dentre os fungos responsáveis por doenças em indivíduos imunodeprimidos, e nos aparentemente saudáveis, encontramos as espécies do gênero *Candida* (Naglik et al., 2003).

O gênero *Candida* é constituído de aproximadamente 200 diferentes espécies de leveduras, que vivem normalmente nos mais diversos nichos corporais, como orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes. Entre as espécies que compõem esse gênero, a *Candida albicans* apresenta maior relevância em função de sua taxa de prevalência em condições de normalidade e de doença (Kurtzmann et al., 1998; Odds et al., 1988; Rippon, 1974).

As leveduras do gênero *Candida*, em particular a *C. albicans*, são patógenos oportunistas freqüentemente isolados das superfícies mucosas de indivíduos normais (Moragues et al., 2000). Colonizam as mucosas de todos os seres humanos no decorrer ou pouco depois do nascimento, havendo sempre o risco de infecção endógena (Brooks et al., 2000). O balanço entre o hospedeiro e esse fungo comensal pode-se transformar em uma relação parasitária, com o desenvolvimento de infecções denominadas candidíases (Chaffin et al., 1998)

Candidíase é uma micose causada por leveduras do gênero *Candida*, em que a lesão pode ser branda, aguda ou crônica, superficial ou profunda, e de espectro clínico bem variável. O principal agente causador dessa doença é a *Candida albicans* (Chaves et al., 2003).

Espécies de *Candida* vivem como comensais, ou seja, fazendo parte da microbiota normal dos indivíduos saudáveis, portanto, quando há uma ruptura no balanço normal da microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies do gênero *Candida* se manifestam de forma agressiva, tornando-se patogênica (Monge et al., 2006; Naglik et al., 2003).

A microbiota vaginal normal é rica em lactobacilos produtores de peróxido (bacilos de Döderlein), os quais formam ácido láctico a partir do glicogênio, presente principalmente no citoplasma das células escamosas do tipo intermediárias do

epitélio vaginal, cuja produção é estimulada pelos hormônios sexuais femininos. Esse mecanismo propicia acidez adequada do ambiente vaginal (pH em torno de 4,5), dificultando a proliferação da maioria dos patógenos. As leveduras são uma exceção, uma vez que proliferam em ambiente ácido (Almeida et al.,1995).

A flora vaginal composta por lactobacilos constitui uma barreira defensiva importante à Candidíase vulvovaginal, sendo que os lactobacilos atuam em três diferentes níveis. Em primeiro lugar, competem com os fungos pelos nutrientes. Em segundo, realizam um processo de co-agregação, podendo com isso, além de competir com os fungos, bloquear os receptores epiteliais para eles, inibindo a adesão dos mesmos ao epitélio vaginal. Esse mecanismo de defesa é o mais importante. Em terceiro lugar, são capazes de produzir substâncias (bacteriocinas) capazes de inibir a germinação de micélios. Isso talvez explique porque tratamentos com antibióticos podem desencadear Candidíase vulvovaginal em decorrência da depleção da flora vaginal (Ziarrusta, 2000).

Estudos realizados anteriormente demonstram que a rondonina apresenta sua CIM na faixa de 33,5 μM a 16,75 μM quando testada contra *C. albicans* MDM8, sendo sua máxima concentração testada de 67 μM . De acordo com o seu tempo de ação, em experimentos de cinética de morte, foi verificado que em 10 minutos não existia mais nenhum blastoconídio viável (Riciluca et al.,2012).

Partindo de estudos realizados anteriormente e visando a busca de um novo possível antifúngico para tratamento contra candidíase, avaliamos o pH ótimo para atividade antifúngica de Rondonina. Testamos inicialmente contra os três microrganismos propostos (*E.coli*, *M. luteus* e *C. albicans*), mais somente a levedura *Candida albicans* MDM8 cresceu em todos os pH testados, que variou de 4 a 8 segundo a metodologia escrita acima. Essa levedura teve seu crescimento homogêneo em todos os pH, desta maneira sendo possível testar a atividade do peptídeo sintético conforme mesma metodologia para os testes de inibição de crescimento em meio líquido. Segundo mostra Tabela 10, este peptídeo apresenta um melhor resultado em pH ácido, o que se torna interessante se pensarmos que o pH da região vaginal, um dos ambientes propícios para o desenvolvimento de candidíase.

Tabela 10 – Atividade antifúngica da rondonina pH dependente. Avaliação da concentração mínima inibitória do peptídeo rondonina em diferentes pH.

Microrganismo	Rondonina CIM (μM)	
	<i>Candida albicans</i> MDM8	pH 4
pH 5		25 - 12.5
pH 6		50 – 25
pH 7		100 - 50
pH 8		100 - 50

Segundo tabela apresentada, testamos a rondonina com concentração inicial de 100 μM e obtivemos como resultado a faixa de concentração inibitória mínima entre 25 μM a 12,5 μM em pH mais ácidos (pH 4 e pH 5), este resultado se confirma com os dados anteriores já encontrados para o peptídeo, pois se encontra dentro da faixa determinada. Segundo protocolo já descrito, o pH do meio de cultura PDB está definido como sendo de 5, o que demonstra a melhor eficácia do peptídeo em pH ácido.

Esses resultados nos levam a acreditar que rondonina pode se tornar um possível fármaco no futuro, mais experimentos devem ser realizados, porém estes dados nos demonstram que além de ser um potente antifúngico, atua em diferentes concentrações em diferentes pH e não apresenta atividade antibacteriana, podendo assim talvez não prejudicar o tratamento, já que não destrói a flora bacteriana local.

4.4.3 Processamento da Hemocianina

Como Lee et al., 2003 verificou em *Pacifastacus leniusculus* a formação do peptídeo astacidina 1, um peptídeo antibacteriano, com 16 resíduos de aminoácidos, a partir do processamento do C-terminal da hemocianina do crustáceo e sugere que o mecanismo de formação desse peptídeo envolve uma proteinase rica em cisteína presente no plasma e esse peptídeo tem sua concentração aumentada após exposição a infecção por microrganismos. Sendo assim, decidimos avaliar a possível via de processamento de rondonina a partir da subunidade D da

hemocianina da aranha como já visto anteriormente para crustáceo, neste caso repetimos o experimento já descrito que consistiu na adição de Cacodilato de Sódio e CaCl_2 no plasma ocasionando assim na recuperação da atividade enzimática presente que foi bloqueada pela presença de EDTA no tampão anticoagulante. Segundo o gel abaixo (Figura 71), não verificamos a presença da formação do peptídeo rondonina após o processo de recuperação enzimática do plasma por esse método, verificamos apenas a intensificação de outras bandas, que serão analisadas posteriormente.

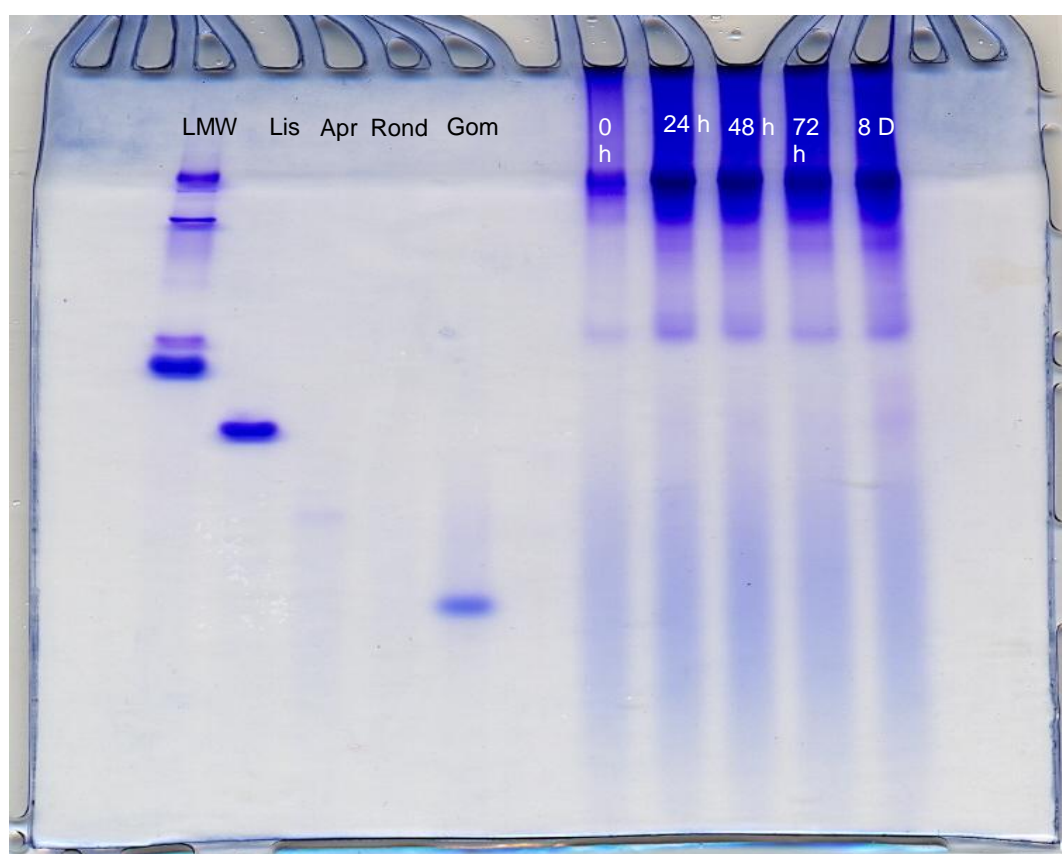


Figura 71 – “Acid-Urea” PAGE 20% – Processamento da Hemocianina para formação de peptídeos antimicrobianos em diferentes intervalos de tempo.

Uma vez que não foi possível verificar a presença do peptídeo em gel, as frações de 80% eluídas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa numa coluna analítica Júpiter C18 (250 mm x 4,60 mm x 10 μ) em um gradiente linear de acetonitrila na faixa de 10% a 30% ACN em 30 minutos. Para avaliar o tempo de retenção da rondonina como controle, foi utilizado o

peptídeo nativo isolado (Figura 72) e o peptídeo sintético em concentração de 6,2 µg (Figura 73).

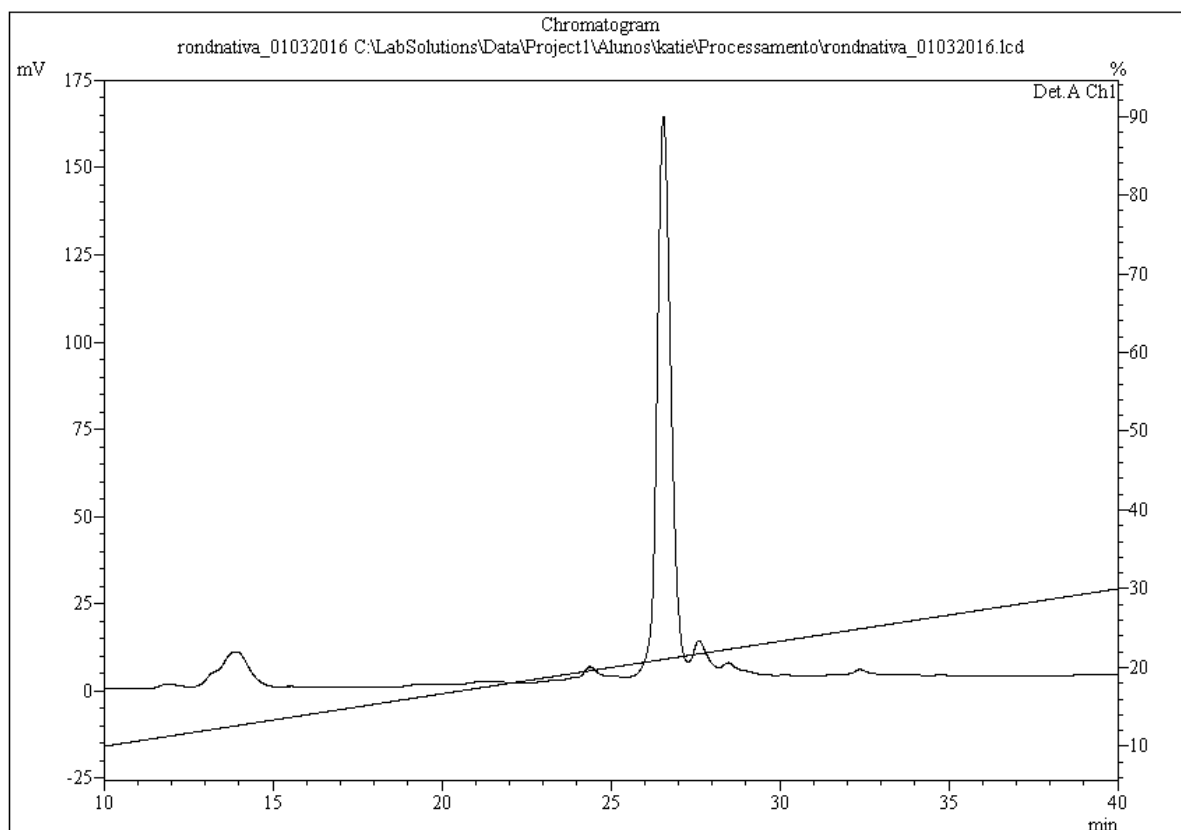


Figura 72 – Peptídeo Rondonina nativo – isolado a partir de cromatografia líquida de alta eficiência.

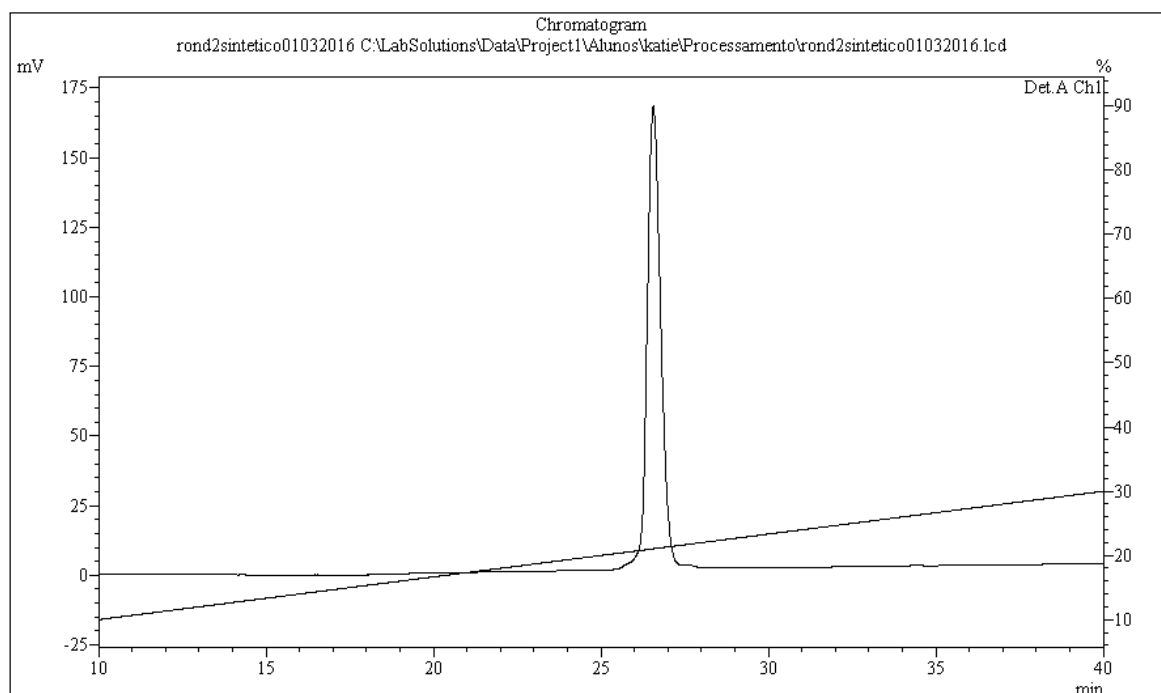


Figura 73 - Peptídeo Rondonina sintético.

De acordo com nossos resultados, pudemos verificar que houve um aumento na quantidade do peptídeo rondonina nos diferentes intervalos de tempo, dessa forma nos levando a propor a presença de uma enzima capaz de liberar esse peptídeo após acidificação (Figura 74).

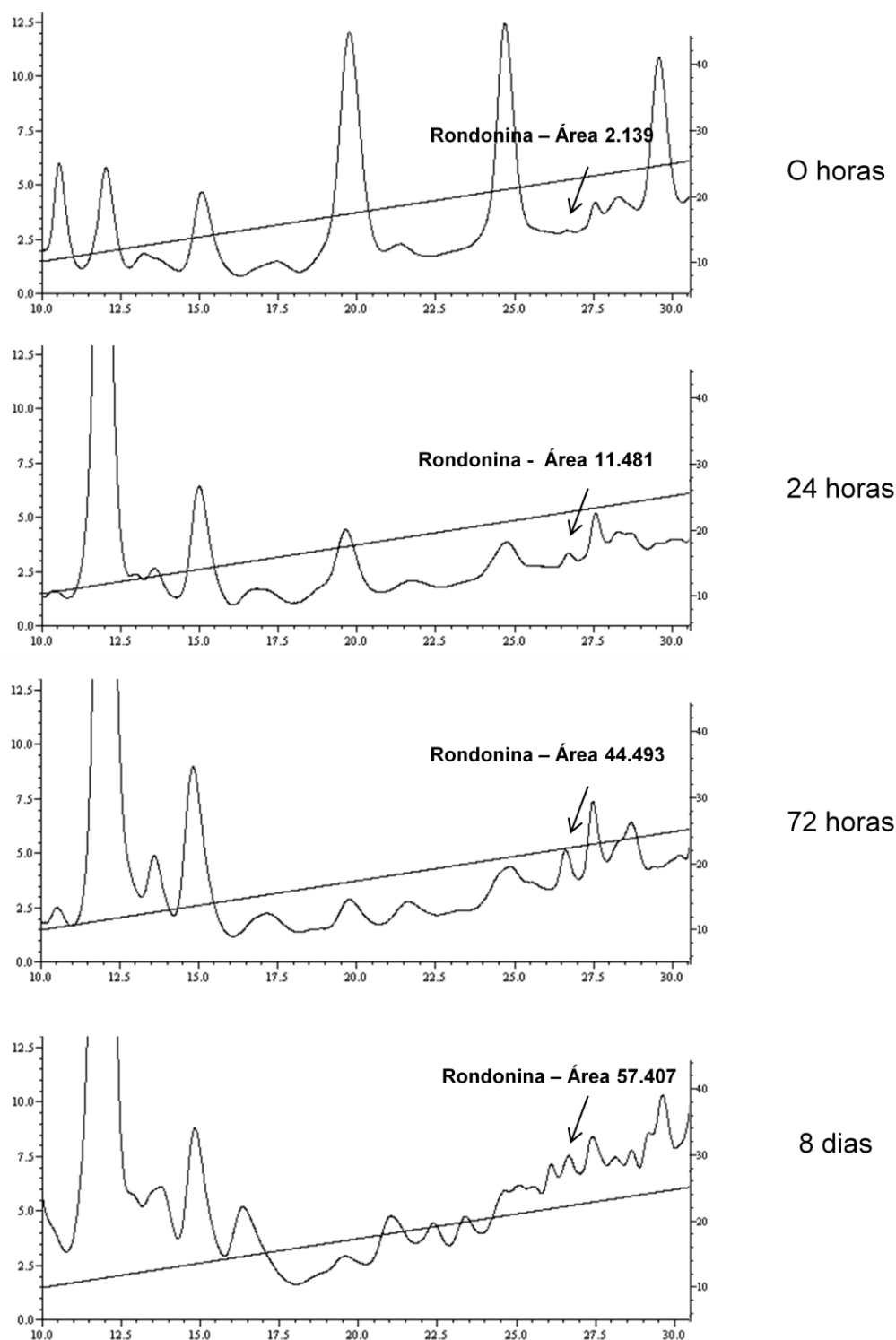


Figura 74 – Perfil cromatográfico do processamento da rondonina.

Para avaliar se nos hemócitos existem enzimas capazes de clivar a hemocianina, foi realizado um experimento em que consistiu na incubação de hemócitos macerados frescos em água ultrapura não tratados com o substrato de hemocianina purificada. Para esse experimento a solução de hemócito com hemocianina foi incubado em 3 intervalos de tempo (1 h, 2 h e 3 h) e pode-se verificar a presença de enzimas capazes de clivar a hemocianina sem alteração em relação ao tempo de incubação como mostra a região destacada em vermelho (Figura 75). Este resultado nos mostra a importância da degranulação dos hemócitos no sistema imune dos aracnídeos.

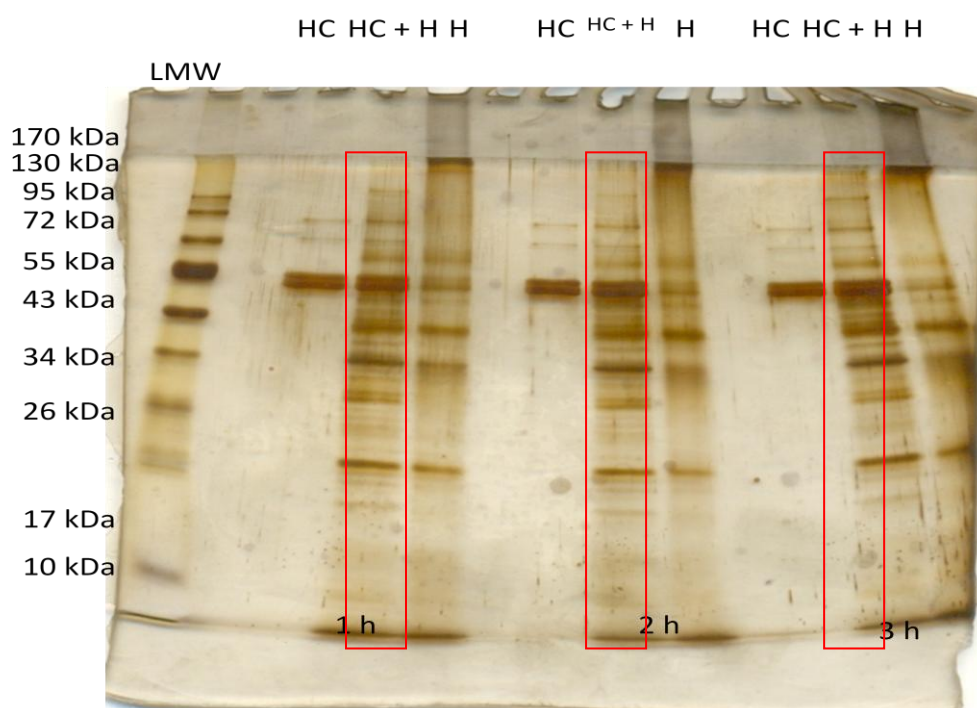


Figura 75 – Atividade enzimática de hemócitos. Avaliação da presença de enzimas nos hemócitos utilizando a hemocianina como substrato. SDS- PAGE 12% na presença de agentes redutores.

A atividade enzimática foi confirmada por zimografia em gel de poliacrilamida copolimerizada com gelatina bovina e caseína. Como podemos ver na figura abaixo (Figura 76), a atividade enzimática pode ser vista nos dois substratos utilizados na mesma faixa de massas moleculares.

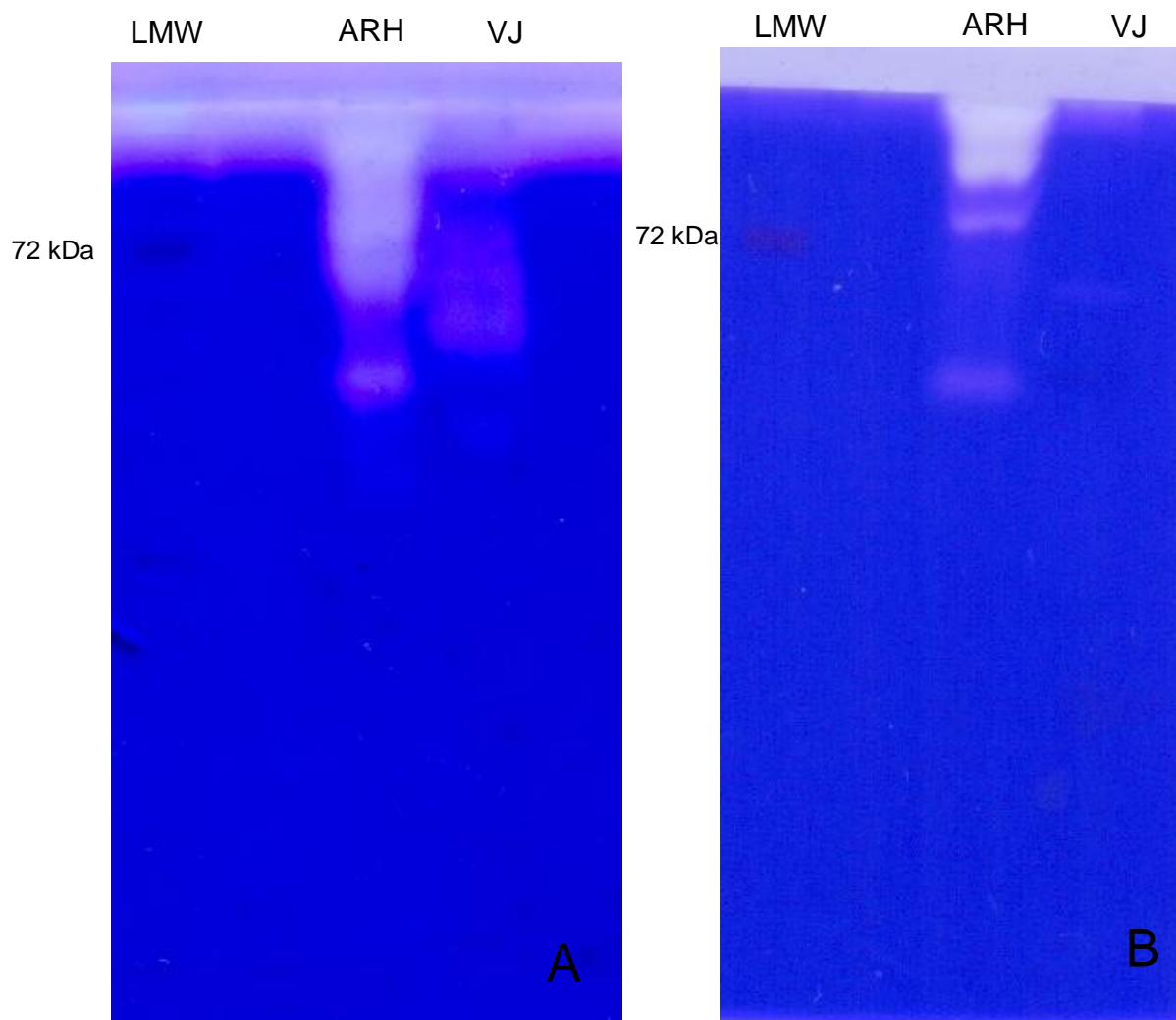


Figura 76 – Zimografia em gel de poliacrilamida 12%. Os géis foram copolimerizado com gelatina (A) e caseína (B). LMW – marcador de peso molecular. ARH – Hemócitos VJ – veneno de jararaca.

Conforme os experimentos realizados com hemócitos, verificamos que há uma liberação do conteúdo dos grânulos capazes de clivar a hemocianina e para avaliar se a produção de rondonina está relacionada ao conteúdo dos hemócitos, o plasma foi acidificado e incubado em dois intervalos de tempo, 0 hora e 48 horas como controle (Figura 77) e utilizamos o coquetel de inibidores enzimáticos (Figura 78) e o inibidor E64 (Figura 79). Como controle, o peptídeo sintético foi submetido à cromatografia (Figura 80).

Nossos resultados nos levam a acreditar que existe uma enzima presente no plasma que é ativada para a formação da rondonina sugerindo que o plasma

representa a primeira barreira na linha de defesa no animal após o rompimento da cutícula.

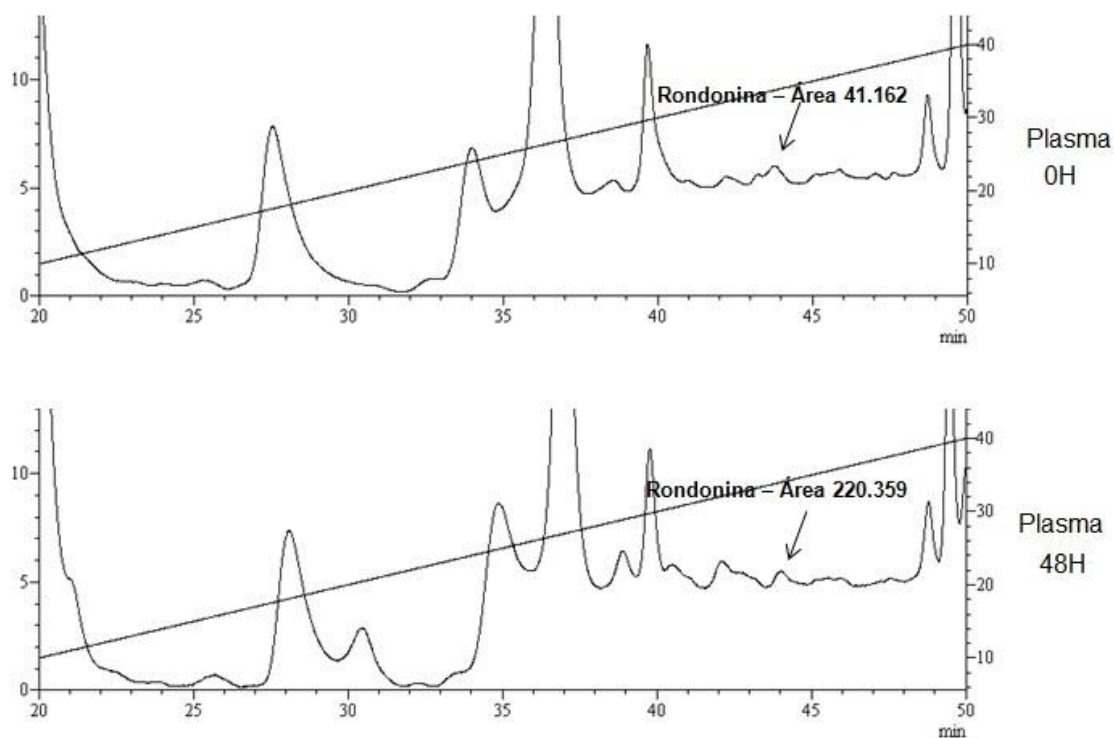


Figura 77 - Perfil cromatográfico Plasma. Cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna júpiter semi-preparativa C18 em gradiente linear de 10 a 40% de acetonitrila em água acidificada em 30 minutos num fluxo de 1,5 ml por minuto.

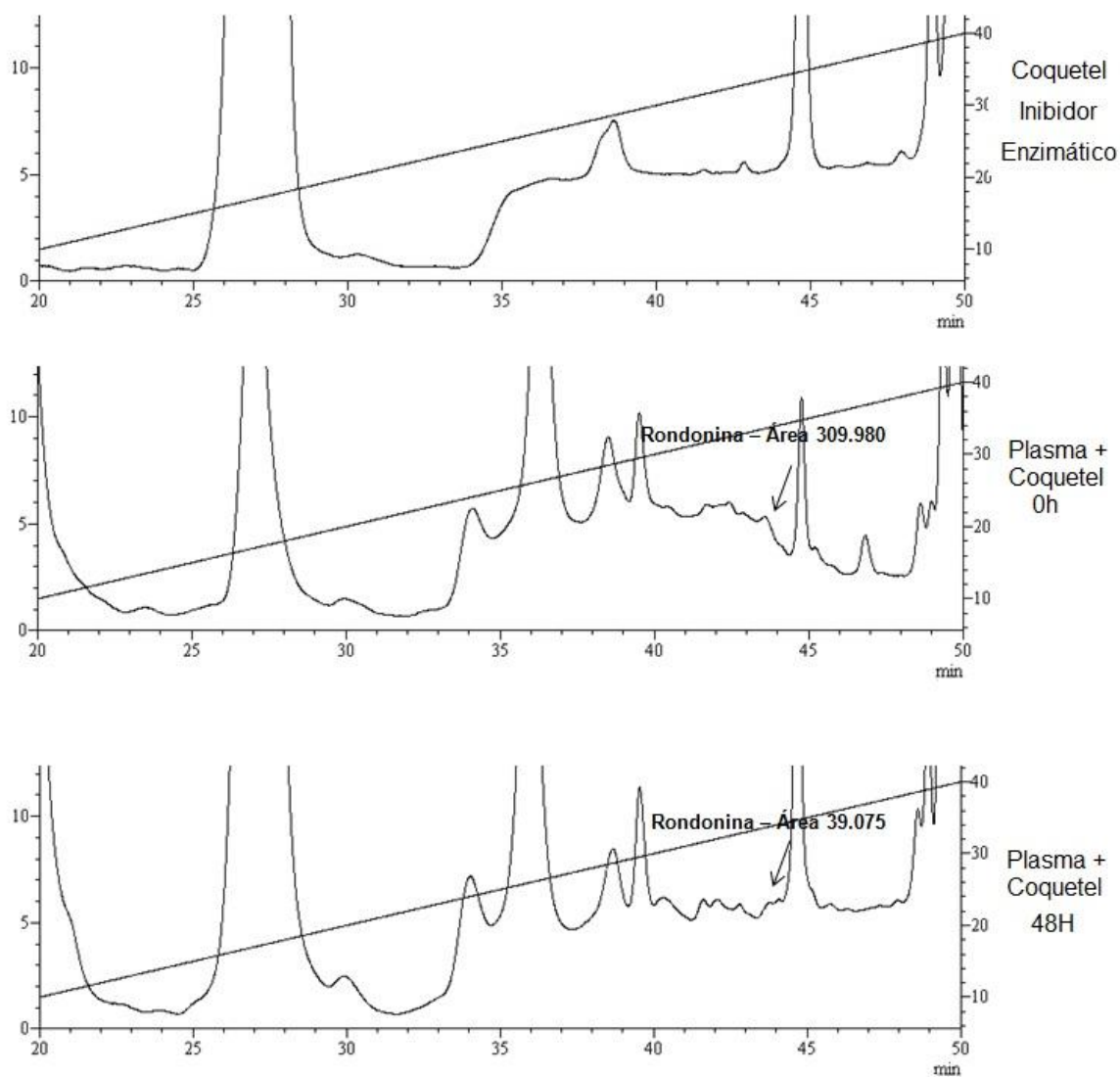


Figura 78 - Perfil cromatográfico Plasma incubado com coquetel de inibidores enzimáticos. Cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna júpiter semi-preparativa C18 em gradiente linear de 10 a 40% de acetronitrila em água acidificada em 30 minutos num fluxo de 1,5 ml por minuto.

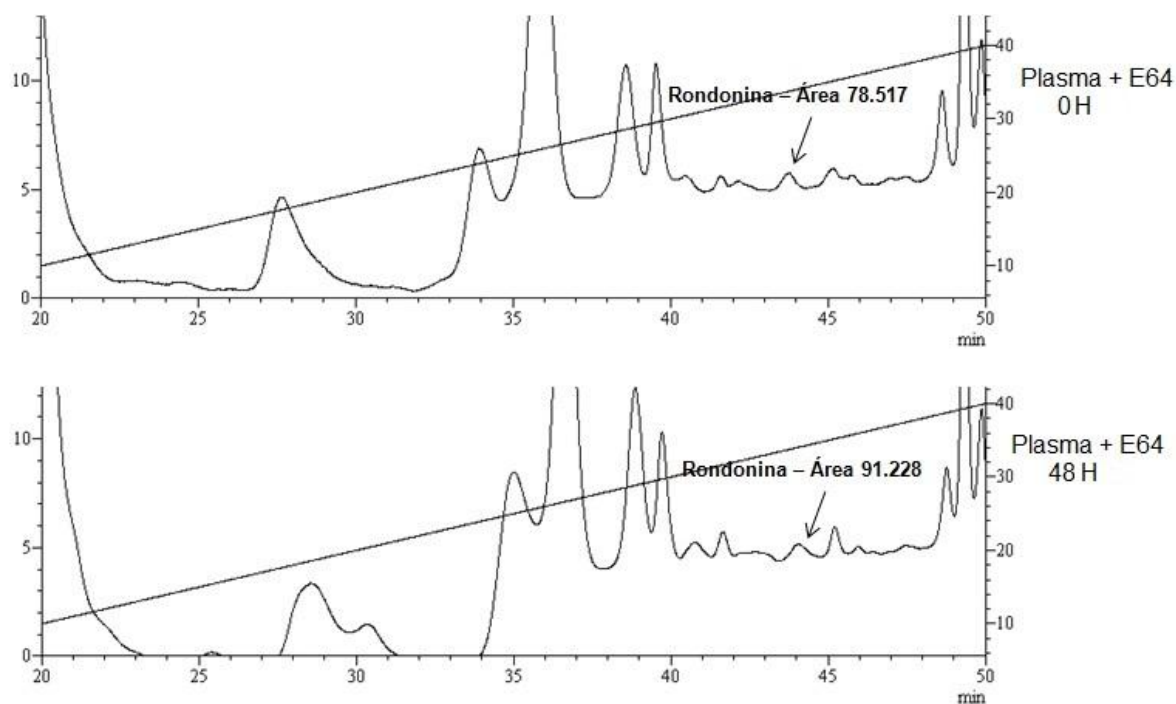


Figura 79 - Perfil cromatográfico Plasma incubado com inibidor enzimático E64. Cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna júpiter semi-preparativa C18 em gradiente linear de 10 a 40% de acetonitrila em água acidificada em 30 minutos num fluxo de 1,5 ml por minuto.

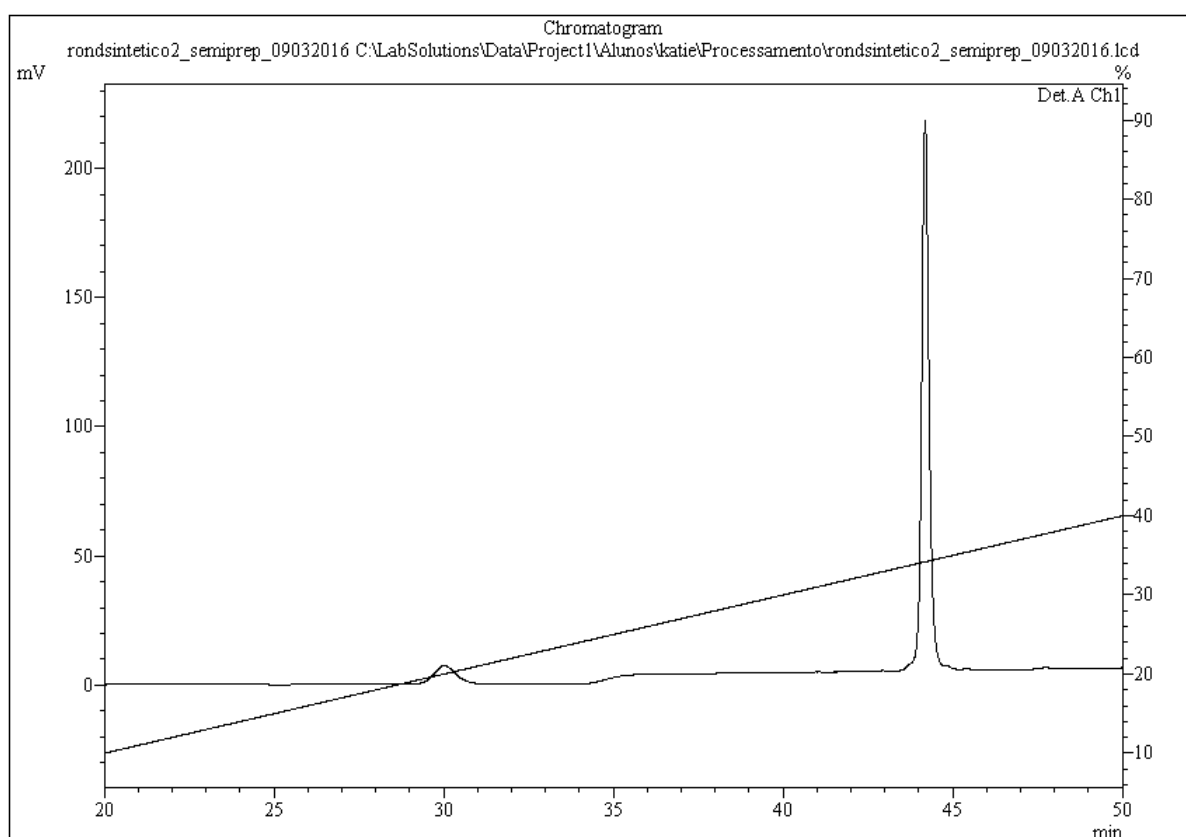


Figura 80 - Perfil cromatográfico do peptídeo Rondonina sintético. Cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna júpiter semi-preparativa C18 em gradiente linear de 10 a 40% de acetonitrila em água acidificada em 30 minutos num fluxo de 1,5 ml por minuto.

Para avaliar qual a relação entre os hemócitos e a formação da rondonina, também utilizamos os hemócitos incubados somente com o plasma (Figura 81) com o coquetel de inibidores enzimáticos (Figura 82) e com o inibidor E64 (Figura 83).

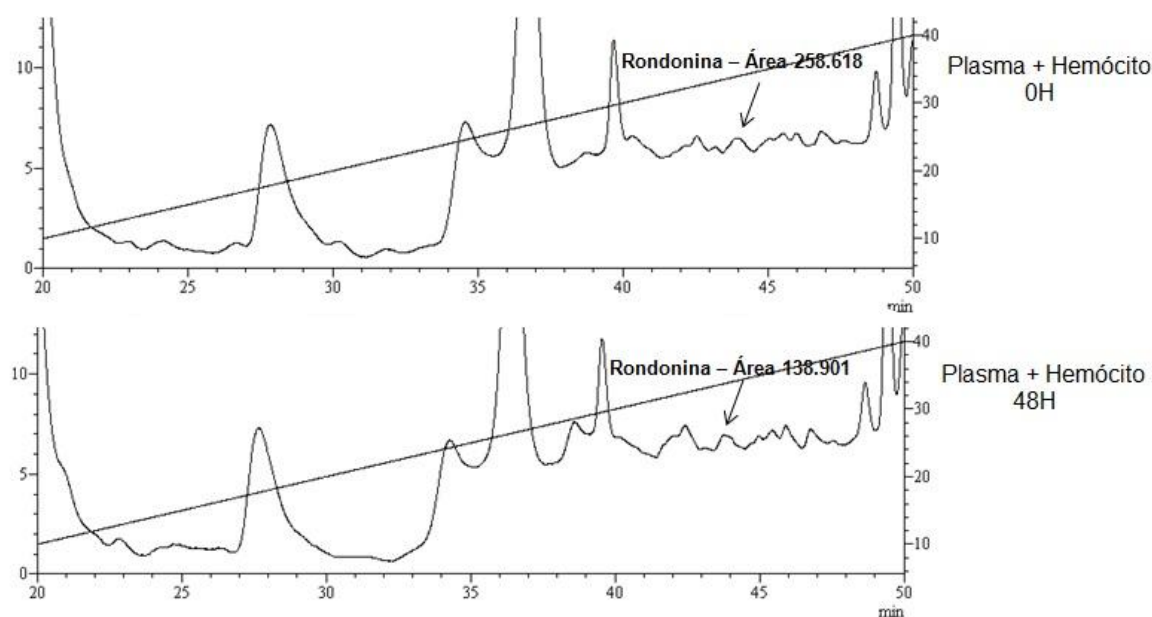


Figura 81 - Perfil cromatográfico Plasma incubado com hemócitos. Cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna júpiter semi-preparativa C18 em gradiente linear de 10 a 40% de acetonitrila em água acidificada em 30 minutos num fluxo de 1,5 ml por minuto.

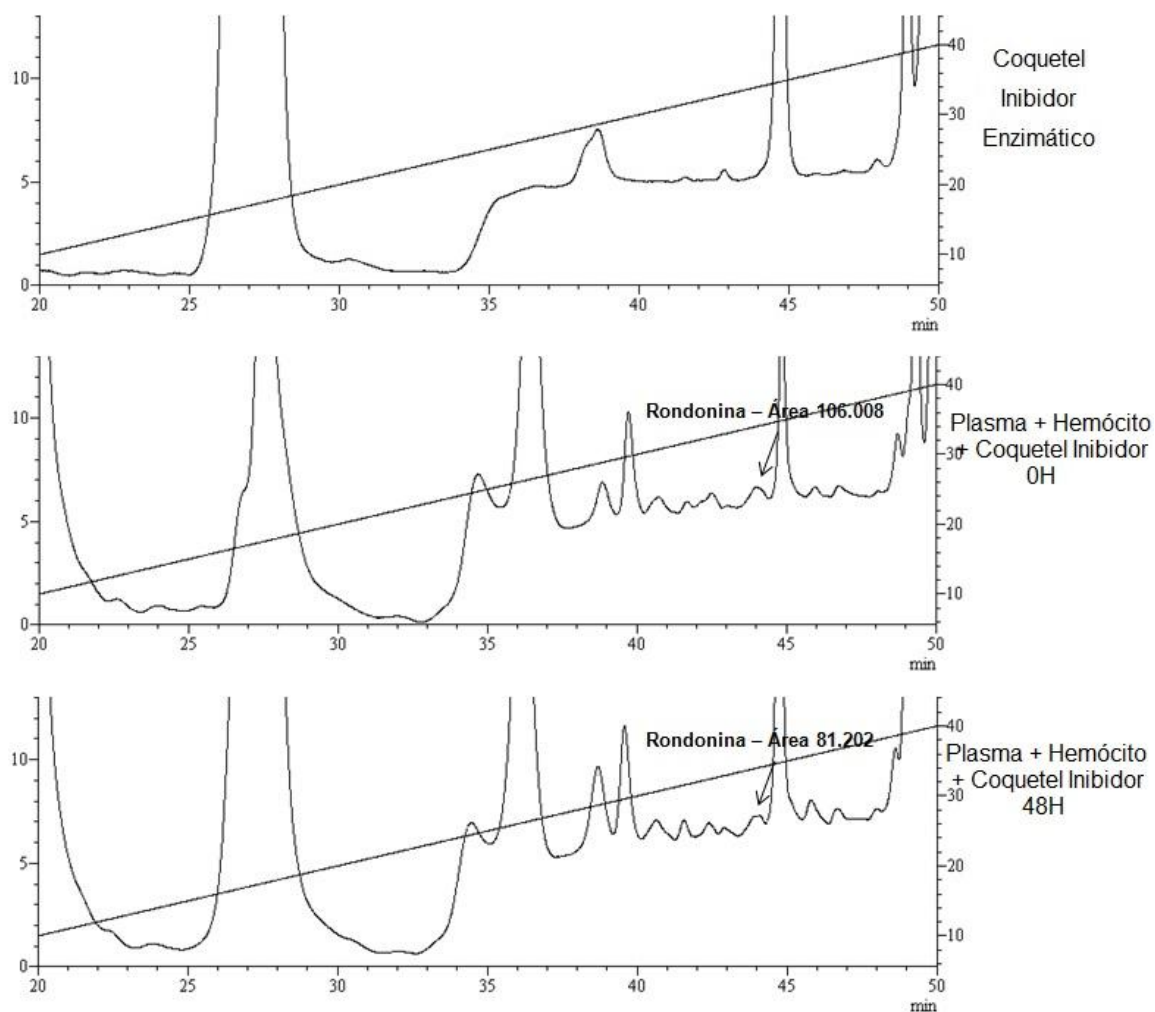


Figura 82 - Perfil cromatográfico Plasma incubado com hemócitos e coquetel de inibidores enzimáticos. Cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna júpiter semi-preparativa C18 em gradiente linear de 10 a 40% de acetonitrila em água acidificada em 30 minutos num fluxo de 1,5 ml por minuto.

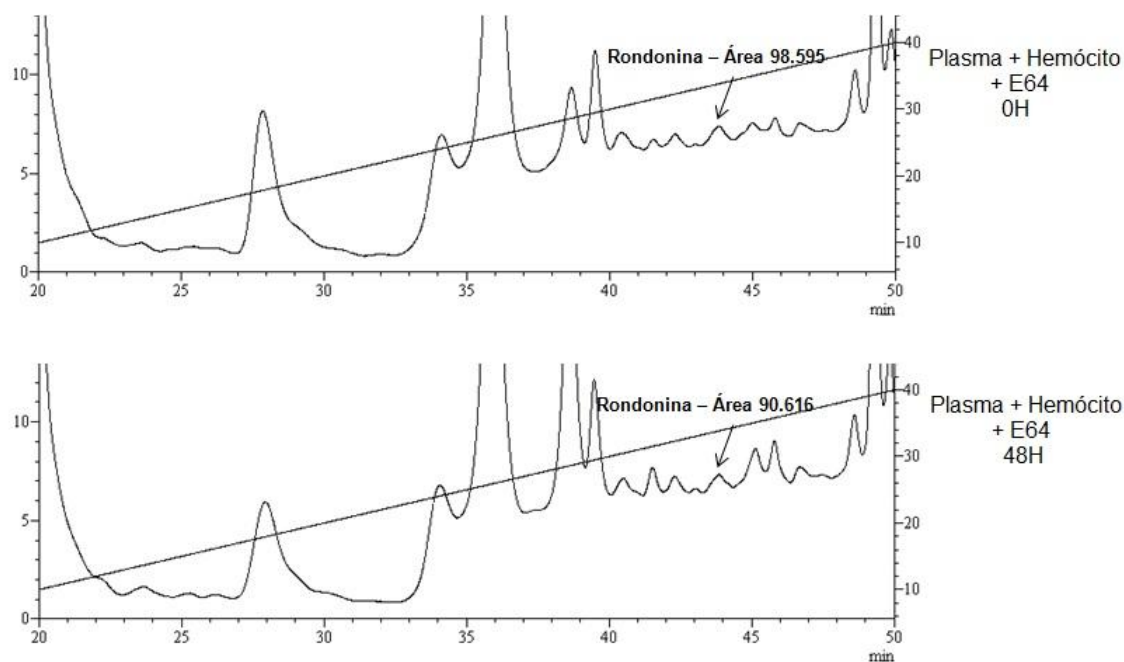


Figura 83 - Perfil cromatográfico Plasma incubado com hemócitos e o inibidor enzimático E64. Cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna júpiter semi-preparativa C18 em gradiente linear de 10 a 40% de acetronitrila em água acidificada em 30 minutos num fluxo de 1,5 ml por minuto.

Pudermos verificar que com a presença dos hemócitos, houve uma diminuição na quantidade do peptídeo rondonina, o que pode sugerir que existe uma enzima presente regulando toda essa cascata de eventos.

De acordo com análise do transcriptoma dos hemócitos de *A. rondoniae*, encontramos a enzima glutamil aminopeptidase (TRINITY_DN65349_c0_g1_i1_translation_of_ORF_aminopeptidase) (Figura 84) que é capaz de clivar o ácido glutâmico na porção n-terminal, o que poderia estar causando a clivagem do peptídeo rondonina, já que na sua sequência primária existe esse aminoácido, inativando assim sua atividade.

```

TRINITY_DN65349_c0_g1_h1-959 1 MSSRERLMDP TRHSSNNSNTQ I TFHQKGCYLRWV I FLLVGASLLAVVLVGI LAAYLTPCQLTQEAALHODDAE 77
TRINITY_DN65349_c0_g1_h1-959 78 KEESKLPDVLPLPSS I IPEHYD I QLQPYLDPSNFTFDGKVT I LKCVSETRN I TLH I NDIKVNQSS I V I TDGGGQKP 154
TRINITY_DN65349_c0_g1_h1-959 155 PSLNTVSEDP L RQFY I LHYNP L L P G H R Y E L S I A Y K G N L N D Q L A G F Y R S S Y K D A E G N T R W L A T T Q F Q P T D A R R A F P C 231
TRINITY_DN65349_c0_g1_h1-959 232 FDEPALKATFNI T I IRLRNMTS I SNMRI YKSEEKGQDWWVDHFESTVKMSTYLLAF I VSDFKSAGDDKFSVWSREEA 308
TRINITY_DN65349_c0_g1_h1-959 309 INTTSYALE I GPK I LHFYEQFFD I EYPLPKTDMVAVPDFSAGAMENWGL I TYRETALLYDPL YSSSRNKARVATVVS 385
TRINITY_DN65349_c0_g1_h1-959 386 HELAHQWFGNLVTPKWMDDLWLN EGFAS YVEYLGVD AVHPEWQMMEQFVLDLQDVMDLDCLKSSHPVSVVPGHPDE I 462
TRINITY_DN65349_c0_g1_h1-959 463 NE I FDR I SYGKGST I IRMMNHFLGNETFRTGLTNYLNAKKYDNAVQDDLWEFLTVAQTSKEK I SVKAVMDSWTLQTG 539
TRINITY_DN65349_c0_g1_h1-959 540 YPVLTV I RDYTAGTASVNQTRFLLNAKDMENSTS YQWEVPVITYTDSQNPDWEPKTKMMLHKNNGTLSGLPGDNSWI I 616
TRINITY_DN65349_c0_g1_h1-959 617 LNVQEVGYRVNYD I QNWKML I SQLFADHQK I HTVNRQA I IDDSMDLARAGLMNYHMA LNSTQYL I REKEYLPWKA 693
TRINITY_DN65349_c0_g1_h1-959 694 LLSFGFMDSMLCRSA I YGKWKAYVRKQLEP I YLDLQWNTSENE NLLKQYLRESALS WLCGYEYKDC I ETAQAMFRRW 770
TRINITY_DN65349_c0_g1_h1-959 771 KENPTDLT I I SPNLRG I VYCAAVRHGGQEWDFLWQQYQTTQVASERDKFMHSLACAKEPWLLTRYLDWSMNASSG I 847
TRINITY_DN65349_c0_g1_h1-959 848 RRQDGSYVFRS VASKLYGRD I AFNYVRDKWNVQFDRYGKSF FD I SGLLKSVTSS LNTQFELS QLKDFYTKNKNKVGA 924
TRINITY_DN65349_c0_g1_h1-959 925 AKRAFRQA I E N S E D N V R W M E A N Y A D I K A W L E A L Q * 959

```

Figura 84 – Sequência da glutamil aminopeptidase presente no transcriptoma de hemócitos de *A. rondoniae*.

Propomos que uma enzima presente no plasma (semelhante a uma Glutamyl endopeptidase) em forma inativa é ativada no curso de uma infecção clivando a subunidade D da hemocianina liberando peptídeos antimicrobianos, entre eles a Rondonina. Quando os hemócitos, semelhante rolagem de leucócitos, chegam até o local da infecção e liberam os conteúdos dos grânulos, dentre eles a enzima glutamil aminopeptidase que inativa a rondonina e de alguma forma interrompe a clivagem das subunidades da hemocianina autoregulando esse sistema.

4.4.4 Avaliação da atividade antifúngica – Rondonina x Gomesina

Como já foi verificado anteriormente, nos hemócitos de *A. rondoniae* foram encontrados os mesmos peptídeos antimicrobianos que existem em *A. gomesiana*: Gomesina e Acanthoscurrina (Riciluca, 2011).

Esses peptídeos podem estar agindo sinergicamente quando de uma infecção. Para verificar se isso poderia estar ocorrendo procedemos à avaliação de interação “in vitro” da rondonina com gomesina.

Se o peptídeo gomesina, presente nos hemócitos, estivesse atuando em sinergismo com rondonina, presente no plasma, elucidaremos assim a importância da degranulação dos hemócitos no momento da infecção para ocorrer o encontro entre esses dois peptídeos.

De acordo com os que pudermos verificar no ensaio de inibição em meio líquido, gomesina e rondonina estão agindo em sinergismo Tabela 11.

Tabela 11 – Concentração Mínima Inibitória (CIM) da rondonina, gomesina e a combinação entre eles.

Peptídeo	<i>C. albicans</i> MDM8 (CIM)
Rondonina	25 uM
Gomesina	0,6 uM
Rondonina + Gomesina	1,5/0,15

O índice de fração inibitória (IFI) da combinação entre rondonina e gomesina foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{IFI} = \frac{\text{CIM Gomesina} + \text{Rondonina}}{\text{CIM Gomesina}} + \frac{\text{CIM Rondonina} + \text{Gomesina}}{\text{CIM Rondonina}}$$

$$\text{IFI} = \frac{1,5}{25} + \frac{0,15}{0,6} = 0,06 + 0,25 = 0,31$$

Nosso resultado se deu abaixo de 0,5 o que significa sinergismo segundo Johnson et al., 2004. De acordo com o resultado obtido, podemos verificar que os dois peptídeos estão agindo em sinergismo, ou seja, a presença dos dois peptídeos pode ter uma resposta melhor em relação a uma infecção fúngica na aranha. Provavelmente na aranha isso pode ter um significado muito importante, ou seja, dependendo do grau de infecção teremos como primeira barreira de defesa os componentes do plasma, segunda barreira de defesa com uma provável associação de componentes do plasma com os dos hemócitos. Neste momento fizemos apenas para gomesina, mas outros peptídeos estão presentes nos hemócitos que podem estar agindo em combinação com peptídeos do plasma.

4.4.5 Interação com membranas artificiais lipídicas

Os peptídeos são geralmente pequenos, catiônicos e adquirem uma conformação anfipática após interação com a membrana celular. Três modelos são geralmente considerados para explicar a permeabilização da membrana celular (Bechinger, 2011; Brogden, 2005; Jenssen et al., 2006): *barrel-stave* (Ehrenstein,

Lecar, 1977), *carpet* (Pouny et al., 1992), e *toroidal pore* (Ludtke et al., 1996). Recentemente, tem sido proposto que em alguns casos, alguns peptídeos antimicrobianos catiônicos podem atuar promovendo agrupamento dos fosfolipídios carregados negativamente das membranas bacterianas, em particular, o lipídio abundante fosfatil glicerol (Epanand, Epanand, 2009).

As membranas biológicas são sistemas altamente organizados e essenciais para a vida e definem um limite de separação entre a célula e o meio externo, mantendo assim uma integridade celular. Por sua vez é o elemento mediador da comunicação entre a célula e seu meio externo constituindo uma barreira altamente seletiva, que possibilita a criação de um compartimento intracelular com uma composição química própria (Shida, 1993).

O modelo de membrana biológica mais aceito é o do “mosaico fluído” proposto por Singer e Nicolson (1972). Segundo este modelo os lipídios, em sua maior parte, estão organizados em bicamadas, formando uma matriz fluída. Este modelo, entretanto, com o progresso das técnicas espectroscópicas utilizadas no estudo das bicamadas lipídicas, tem sofrido modificações para ajustá-los aos dados experimentais (Mouritzen, Jorgensen, 1992).

Os lipídios são, por definição, uma classe de compostos orgânicos de origem biológica com estruturas bastante variadas, caracterizadas pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água (Lehninger, 1986; Marzzoco, Torres, 1990; Tanford, 1980). Geralmente apresentam em sua molécula pelo menos um grupo álcool e um ácido graxo esterificado.

Para avaliar o possível mecanismo de ação da rondonina utilizamos o protocolo utilizado por Bozelli Jr et al., 2011, onde o peptídeo teve sua ação sobre membranas artificiais lipídicas avaliada.

Realizamos os experimentos utilizando lipídios polares zwitterionicos (POPC) ou polares aniônicos (POPG). Para esses testes, tiramos vantagem da presença do aminoácido Tirosina presente na sequência primária de Rondonina. Este aminoácido apresenta fluorescência no comprimento de onda 280nm e assim podemos verificar se ocorre a interação com membrana uma vez que quando o peptídeo está ligado à membrana ocorre uma supressão da fluorescência.

De acordo com a Figura 85, podemos verificar que não houve interação com a membrana tanto na presença de tampão acetato pH 5 como com tampão fosfato pH 7, neste caso, com os lipídios mimetizando células de mamíferos, o resultado

mais importante é o de pH 7 pois é este o utilizado para os experimentos em cultura celular.

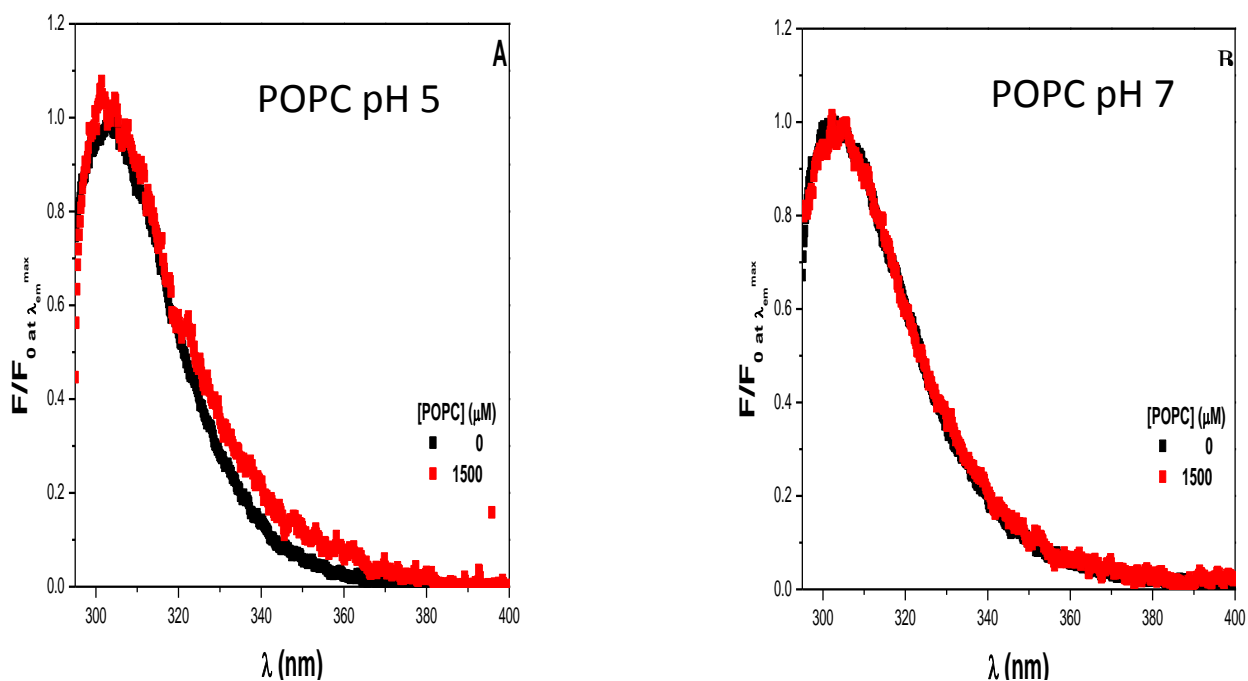


Figura 85 – Interação do peptídeo rondonina com membranas artificiais lipídicas POPC em diferentes pH.

Ao acrescentar um lipídio, mimetizando assim a membrana biológica de microrganismos, ou seja, carregada negativamente, utilizamos os mesmos tampões utilizados anteriormente e mesmo assim continuamos a não verificar a interação do peptídeo rondonina com as membranas artificiais como mostra a Figura 86.

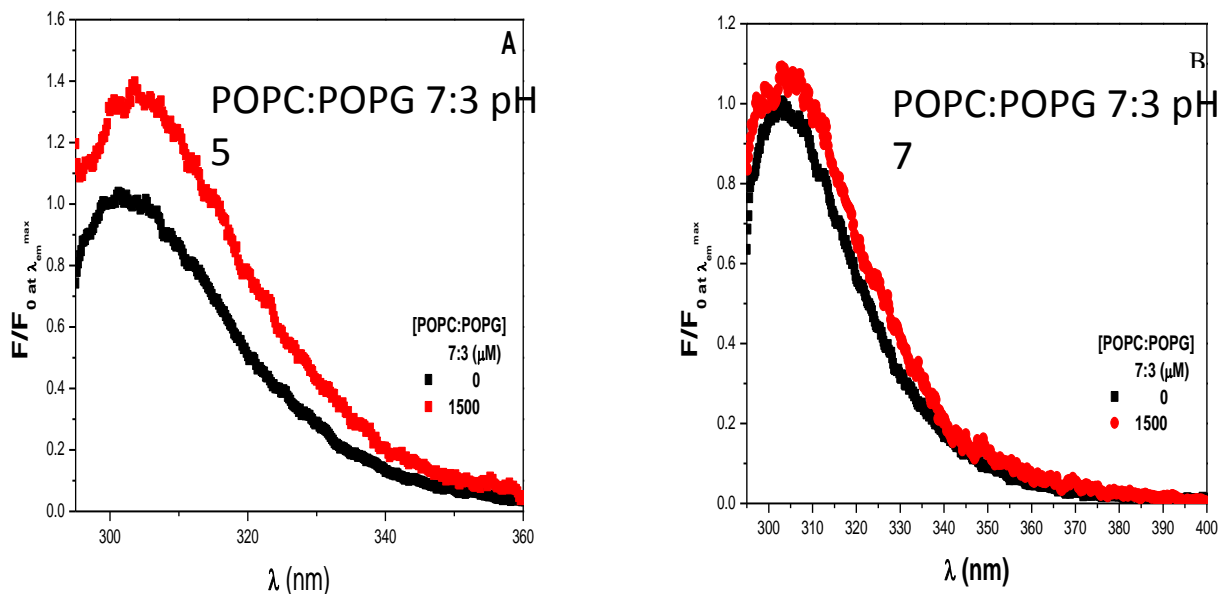


Figura 86 – Interação do peptídeo rondonina com membranas artificiais lipídicas POPC: POPG 7:3 em diferentes pH (diferenças entre 0 e 1 é considerado como sem interação).

De acordo com os resultados obtidos, o peptídeo rondonina não interage com membranas artificiais zwitterionicas, as quais mimetizam células de mamíferos, e aniônicas, as quais mimetizam as membranas de microrganismos, o que pode explicar que se meu mecanismo de ação provavelmente envolve um alvo interno, como já descrito para peptídeos aniônicos (Brogden et al., 1996), indolicidina (Subbalakshmi, Sitaram, 1998), mersacidina (Brotz et al., 1998), buforina II (Park et al., 1998), taquiplésina (Yonezawa et al., 1992) entre outros.

4.4.6 Interação com material genético

Uma vez que não ocorreu formação de poros nas membranas artificiais lipídicas, fomos verificar se o mecanismo de ação do peptídeo rondonina estava relacionado com alvos internos, como DNA, RNA e mRNA de microrganismos, sendo assim, após a extração do DNA genômico de *E.coli* SBS363, *M. luteus* A270 e *C. albicans* MDM8, nos incubamos o peptídeo rondonina em diferentes concentrações (0 μg , 1,2 μg , 2,4 μg , 3,7 μg , 4,9 μg , 6,2 μg and 12 μg) com aproximadamente 100 ng/ μl do DNA genômico de cada microrganismo durante 10 min em temperatura ambiente e aplicado em gel de agarose 0,8% em tampão TAE. Nós observamos que o peptídeo foi capaz de retardar somente a migração do DNA

genômico de *C. albicans* MDM8 a 4,9 µg do peptídeo ou mais (Figura 87), o que não ocorreu quando o peptídeo foi incubado com o DNA genômico das bactérias (Figura 88). Este resultado nos permite sugerir que o peptídeo está atuando internamente dentro das células corroborando com os resultados anteriores (Riciluca et al.,2012).

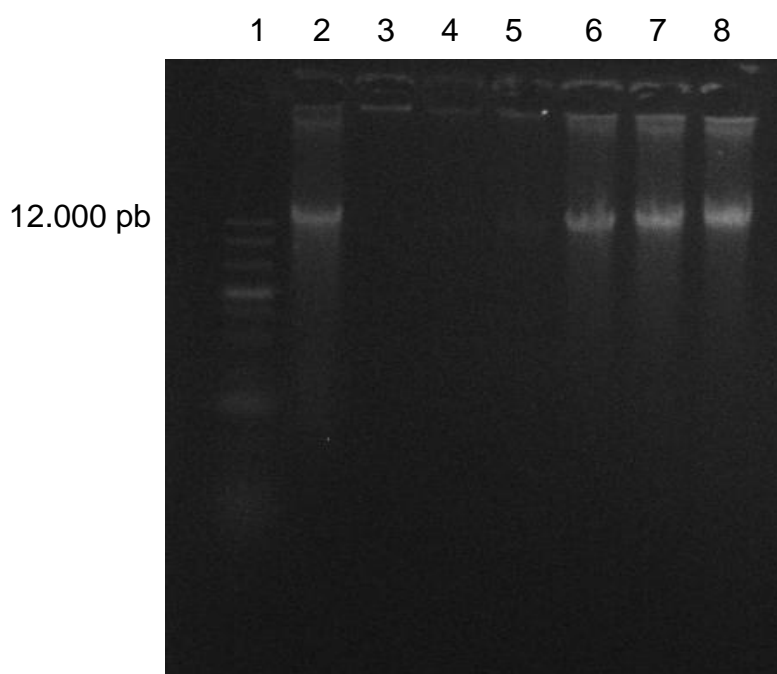


Figura 87 – Gel de agarose 0.8% de DNA genômico de *C. albicans*. 1 –LMW, 2 – Controle, 3 – 12 µg 4- 6,2 µg, 5 – 4,9 µg, 6 – 3,7 µg, 7- 2,4 µg, 8 – 1,2 µg.

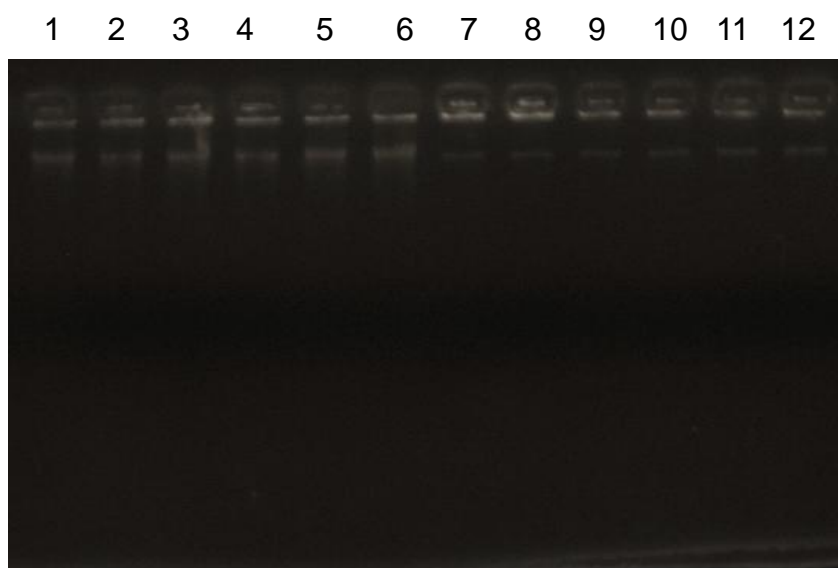


Figura 88 - Gel de agarose 0.8% de DNA genômico de *E. coli* e *M. luteus*. 1 – Controle *E. coli*, 2- 6,2 µg, 3- 4,9 µg, 4 - 3,7 µg, 5- 2,4 µg, 6 - 1,2 µg, 7- controle *M. luteus*, 8 - 6,2 µg, 9 - 4,9 µg, 10 - 3,7 µg, 11 - 2,4 µg, 12 - 1,2 µg.

A inibição foi parcial para o RNA total de *C. albicans* MDM8 (Figura 89) e dessa forma, nos levou a testar contra um RNA específico, RNA mensageiro (mRNA), de *C. albicans* MDM8.

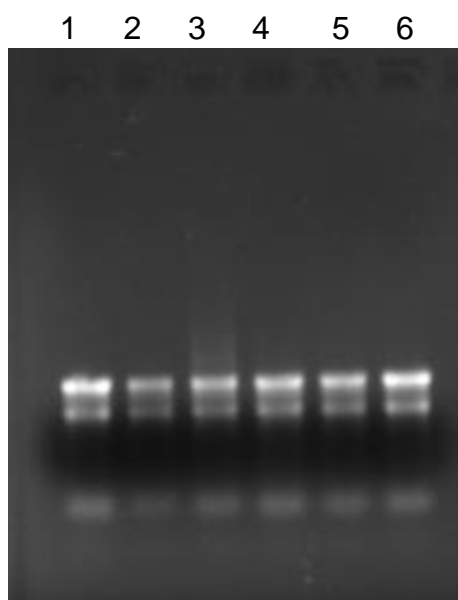


Figura 89 - Gel de agarose 0.8% de RNA total de *C. albicans*. 1 - Controle, 2 - 6,2 µg, 3 - 4,9 µg, 4 - 3,7 µg, 5 - 2,4 µg, 6 - 1,2 µg.

Para as análises de retardo desse peptídeo em mRNA, nos utilizamos a eletroforese capilar devido a baixa concentração de mRNA obtido. O peptídeo rondonina foi capaz de inibir a visualização do mRNA (Figura 90). Este peptídeo se mostrou capaz de se ligar aos ácidos nucleicos da levedura *C. albicans* sugerindo assim seu mecanismo de ação em um alvo intracelular.

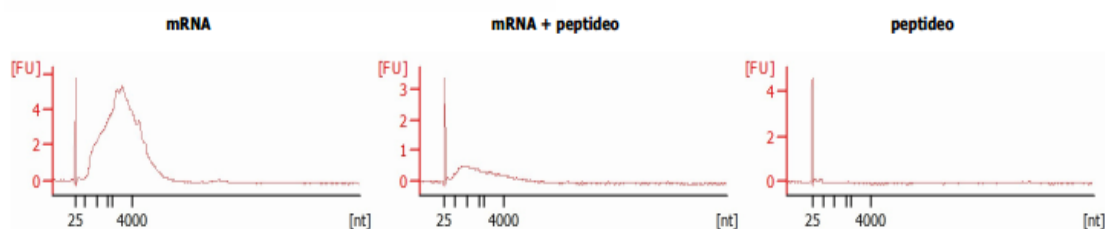


Figura 90 – Eletroforese capilar para avaliação do mRNA de *C. albicans*.

Estudos anteriores mostram resultado semelhante para o peptídeo indolicidina, que é capaz de se ligar a plasmídeos de levedura e RNA sendo a concentração do peptídeo usado nesse experimento menor comparado ao que nós

usamos nesse trabalho, porém a quantidade necessária para que ocorra o retardo pode ser menor uma vez que o plasmídeo utilizado apresenta um tamanho menor que o DNA gênomico como descrito por Hsu et al., 2005.

4.4.7 Citotoxicidade

Levando em conta o mecanismo de ação proposto como alvos internos aqui nesse trabalho e estudo realizado de citotoxicidade contra eritrócitos humanos onde foi verificado que rondonina não foi capaz de causar hemólise em concentração máxima de 134 μM (Riciluca et al., 2012), realizamos os testes de citotoxicidade do peptídeo em cultura de células de mamífero como pré-requisito para realização do teste de atividade antiviral. Foi utilizada uma cultura de células VERO (células renais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) considerada padrão para realização desses testes.

Os resultados obtidos da cultura celular mostrou que o peptídeo rondonina não é citotóxico quando incubado numa concentração inicial de 200 μM partindo para uma diluição seriada. A partir dessa observação, os testes utilizando vírus vacinais humanos puderam ser avaliados.

Para avaliação da atividade antitumoral do peptídeo rondonina foram utilizadas culturas celulares de câncer de colo de útero, linhagem HeLA e culturas celulares de câncer de adrenal de camundongo com a concentração inicial de 200 μM partindo para uma diluição seriada. Nossos resultados mostraram que o peptídeo não é citotóxico (Tabela 12) quando avaliado a viabilidade celular pela técnica de MTT, que consiste na formação do cristal de formazan, que apresenta coloração violeta, a partir da metabolização do sal de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH. Dessa maneira é possível avaliar que a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Mossman, 1983).

Tabela 12 – Teste de viabilidade celular. Diluição seriada do peptídeo rondonina avaliado contra duas linhagens celulares tumorais.

	Concentração (µM)	HeLA (%)	Y1 (%)
Rondonina	200	94.6	77.1
	100	87.9	80.9
	50	82.4	95.7
	25	84.6	97.3
	12,5	86.3	95.4
	6,25	90.6	90.8
	3,12	95.1	92.4
	1,5	71.6	93.7
DMSO	20%	0.8	3.6
PBS	20%	100	100

Nossos resultados mostram que o peptídeo rondonina já caracterizado como um peptídeo antifúngico contra cepas de fungo patogênicos, não hemolítico, não causa poros em membranas e atua em pH ácidos e uma vez que não se mostrou ativo contra linhagens celulares tumorais pode se tornar um possível candidato a um novo fármaco contra candidíase, uma doença causada principalmente em mulher, e como não afeta o crescimento de células tumorais do colo de útero pode ser interessante.

4.4.8 Atividade Antiviral

O efeito citopático viral (ECV) é definido como o conjunto de alterações provocadas por um vírus nas células onde ele se multiplica. Esse efeito pode ser manifestado como alterações na forma e no tamanho da célula, na destruição total da célula ou no descolamento da monocamada (Sidweel, 1986).

A ação antiviral da rondonina foi testada em microplacas de 96 poços contendo uma cultura de células confluentes. Na Figura 91, as células MDCK (células Madin Darby de rim canino) foram tratadas com Rondonina a 9 µM 1 hora antes da sua infecção. Após esse período as células foram infectadas com 0,01 MOI (relação entre cópias de vírus na infecção dividido pelo número de células a serem infectadas - *Multiplicity of infection*) de vírus do sarampo (Edmonston). As células foram observadas diariamente para visualização do efeito citopático (ECV). A

rondonina foi capaz de inibir na diluição $\frac{1}{2}$ do vírus. A titulação do vírus foi dada como 1/256 vírus.

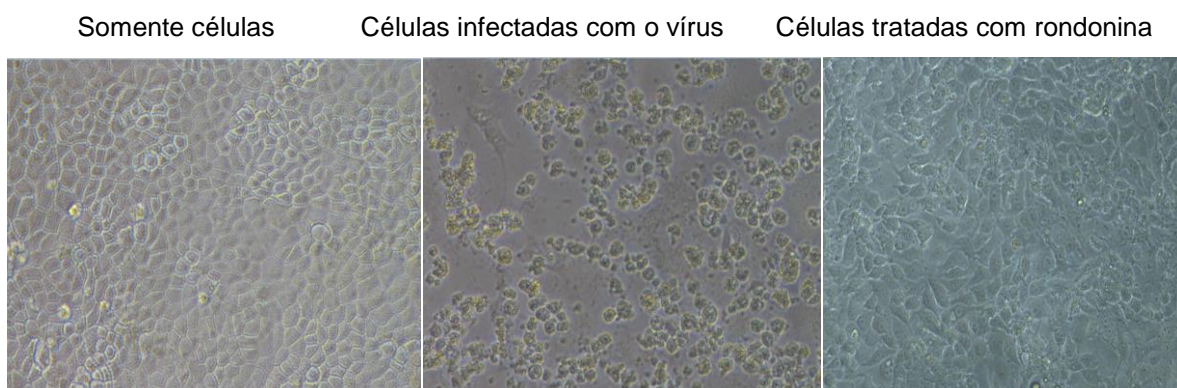


Figura 91 – Células MDCK infectadas com vírus do sarampo. As placas foram observadas diariamente para verificar o aparecimento do efeito citopático. As placas foram observadas em microscópio óptico invertido e fotografadas antes da coloração por cristal de violeta.

Em células VERO, como pode ser observado na Figura 92, o tratamento com rondonina a $24 \mu\text{M}$ foi 1 hora antes da sua infecção. Após esse período as células foram infectadas com 0,01 MOI de vírus da influenza (H1N1).

As células foram observadas diariamente para visualização do efeito citopático (ECV). A rondonina foi capaz de inibir na diluição 1/64 do vírus. A titulação do vírus foi dada como 1/256 vírus.

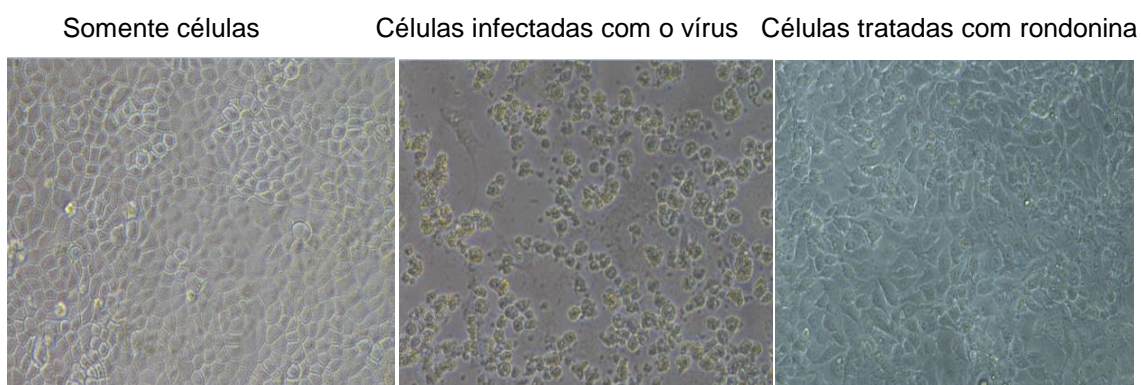


Figura 92 – Células VERO infectadas com vírus da influenza. As placas foram observadas diariamente para verificar o aparecimento do efeito citopático. As placas foram observadas em microscópio óptico invertido e fotografadas antes da coloração por cristal de violeta.

Em células L929 (célula fibroblástica de camundongo) como pode ser observado na Figura 93, o tratamento com o peptídeo rondonina $9 \mu\text{M}$ a 1 hora

antes da sua infecção. Após esse período as células foram infectadas com 0,01 MOI de vírus EMC.

As células foram observadas diariamente para visualização do efeito citopático (ECV). A rondonina foi capaz de inibir na concentração mais alta do vírus. A titulação do vírus foi dada como 1/4096 vírus.



Figura 93 – Células L929 infectadas com vírus EMC. As placas foram observadas diariamente para verificar o aparecimento do efeito citopático. As placas foram observadas em microscópio óptico invertido e fotografadas antes da coloração por cristal de violeta.

Segundo Dolaska e Voelter (2013), as hemocianinas são uma nova classe de compostos naturais antivirais contra diferentes vírus. Portanto, hemocianina de artrópodes são ativas somente a vírus próprios de artrópodes como WSSV (“white spot syndrome virus”) e TSV (“Taura syndrome virus”), enquanto que hemocianinas de moluscos são ativas contra vírus humanos, como RSV (“respiratory syncytial virus”) e EBV (“Epstein Barr virus”).

Estudos realizados com camarões infectados, *Penaeus monodon*, identificaram peptídeos derivados de hemocianina que são capazes de neutralizar os vírus WSSV (“White spot syndrome virus”) e evitar a sua replicação (Zhang et al.,2004). Já Lei et al.,2008, encontrou que partículas de WSSV pré-incubadas com hemocianina purificada de *P. japonicus* antes da infecção, permitiu a redução de 10 vezes da carga viral nas guelras comparados com os camarões controle que não foram previamente tratados.

Segundo a literatura, encontramos peptídeos derivados de hemocianina de artrópodes com atividade antiviral apenas em crustáceos (vírus de artrópodes) mostrando que rondonina pode ser o primeiro peptídeo antimicrobiano derivado de hemocianina da aranha migalomorfa com atividade contra vírus humano.

De acordo com os resultados obtidos pudemos observar que provavelmente o mecanismo de ação deste peptídeo está envolvido com componentes interno dos microrganismos. Em estudo realizado com membranas artificiais lipídicas não verificamos sua interação, provavelmente está ocorrendo uma internalização. Com esses resultados de teste com vírus de RNA, envelopado ou não, verificamos a proteção das células, evitando a replicação viral. Neste caso podemos acreditar que provavelmente o alvo desse peptídeo está no material genético. Novos estudos precisam ser realizados para comprovar essa teoria.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, pudemos concluir:

- A formação da maioria dos peptídeos antimicrobianos do plasma pode estar ligada ao processamento de hemocianina;
- O peptídeo rondonina não apresenta atividade citotóxica contra células de mamíferos;
- O peptídeo rondonina não interage com membranas artificiais lipídicas inferindo assim que seu provável mecanismo de ação é um alvo interno;
- O peptídeo rondonina é capaz de neutralizar vírus de RNA (sarampo, Influenza e EMC), impedindo assim sua ação nas células de mamífero o que pode ser a primeira vez vista em hemocianinas de aranhas;
- O peptídeo rondonina age em sinergismo com o peptídeo do hemócito gomesina;
- O peptídeo tem sua melhor atividade antimicrobiana em pH ácidos,
- O peptídeo rondonina não apresenta atividade contra fungos entomopatogênicos testados;
- A hemocianina na aranha *Acanthoscurria rondoniae* se encontra na forma de 4 x 6 mer como já observado em *Aphonopelma hentzi* e esse é o primeiro estudo em relação a estrutura 3D de aranha;
- O processamento de rondonina ocorre em pH ácido e provavelmente está envolvido com uma “cisteino proteinase-like” presente no plasma, que teve sua atividade inibida na presença do inibidor E64 e sua regulação pode acontecer pela enzima glutamil aminopeptidase presente nos hemócitos.

REFERÊNCIAS*

Abele D, Brey T, Philipp E. Bivalve models of aging and the determination of molluscan lifespans. *Exp Gerontol.* 2009; 44: 307–15

Afanasyev P, Ravelli RBG, Matadeen R, del Carlo S, van Duinen G, Alewijnse B, Peters PJ, Abrahams JP, Portugal RV, Schatz M, van Heel M. *A posteriori* correction of camera characteristics from large image data sets. *Sci.Rep.* 2015; 5, 10317; doi: 10.1038/srep10317

Almeida Filho GL, Passos MRL, Gouvêa TVD. Candidíase. In: Passos, MRL *Doenças sexualmente transmissíveis.* 4 ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica,1995. [s.p].

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

Andersson K, Steiner H. Structure and properties of protein P4, the major bacteria-inducible protein in pupae of *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem.* 19987; 17: 133-40.

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

Atherton, Sheppard. *Solid Phase Peptide Synthesis – a practical approach.* Oxford: IRL Press; 1989.

Autelitano DJ, Rajic A, Smith AI, Berndt MC, Ilag LL, Vadas M. The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivity. *Drug Discov. Today,* 2006; 11:306-14.

Bachère, E. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture,* 2000; 191: 3-11.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Barraviera, B. Venenos animais - uma visão integrada. Rio de Janeiro: EPUC, 1994.

Baumann T, Kämpfer U, Schürch S, Schaller J, Largiadèr C, Nentwig W, Kuhn-Nentwig L. Ctenidins: antimicrobial glycine-rich peptides from the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. Cellular and molecular life sciences: CMLS 2010, 67(16):2787-98.

Bechinger B. Insights into the mechanism of action of host defence peptides from biophysical and structural investigations. J. Peptide Sci. 2011. 17;306-14.

Beckage NE, Thompson SN, Federici BA (eds) Parasites and pathogens of insects,, 1993, vol.2, Pathogens. Academic Press, San Diego, 25-53.

Blast. Basic Local Alignment search tool. Disponível em <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> acesso em 06 jan.2016

Blundell TL, Johnson LN. Protein Crystallography. Academic Press, New York, 1976

Bodnar AG. Marine invertebrates as models for aging research. Exp. Gerontol. 2009; 44: 477–84

Boehm T. Evolution of Vertebrate Immunity. Current Biology. 2012; 22(17):722-32

Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. Journal of Internal Medicine, 2003; 254:197-215.

Boman HG. Peptides antibiotics and their role in innate immunity. Annu. Rev. Immunol. 1995; 13:61-92.

Borland L, van Heel M. Classification of image data in conjugate representation spaces. J. Opt. Soc. Am. A. 1982; 7(4): 601-10

Borneman E, Lowrie J. The immune response of corals. Part One: The Invertebrate Immune System. Aquarium.net. Abril, 1998. Disponível em: <http://www.reefs.org/library/aquarium_net/0498/0498_1.html> Acesso em: novembro, 2005.

Bozzeli Jr JC, Sasahara ET, Pinto MRS, Nakaie CR, Schreier S. Effect on head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritrpticin to lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipid*. 2012. 165; 365-73

Bradford MM. A rapid and sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976. 72:248-54.

Brogden K A, De Lucca AJ, Bland J, Elliott S. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1996; 93, 412–6.

Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Rev. Microbiol*. 2005. 3; 238-50.

Brokaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Osborn RW. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*, 1995; 108: 1353-8.

Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Jawetz, Melnick & Adelberg Microbiologia Médica*. 21 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.

Brotz H, Bierbaum G, Leopold K, Reynolds PE, Sahl HG. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1998; 42, 154–60.

Brown K L, Hancock REW. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*, 2006; 18: 24 - 30.

Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 2004; 198:169-84.

Bulet P, Hetru C, Dinarcq J, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental Comparative Immunology*. 1999; 23(4-5): 329-344.

Burmester T. Evolution and adaptation of hemocyanin within spider. In: Nentwig, W. (ed) *Spider ecophysiology*. Berlin: Springer Science; 2013. 529 p.

Caldas C. Vida e Morte e imortalidade: desvendando a história das células HeLa. *Cienc. Cult [online]*., 2010. 62 (2):17:8.

Callaway E. The revolution will not be crystallized. *Nature*. 2015 ; 525:172-4

Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol*. 2008. 29: 263-71.

Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev*. 2004. 198: 116-26

Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Molec Biol Rev*. 1998; 62:130-80

Chaves GM, Cavalcanti MAQ, Porto ALF. Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeast strains. *Braz J Microbiol*, 2003; 34:192-202.

Cheng Y, Grigorieff N, Penczek PA, Walz T. A Primer to Single-Particle cryo-Electron Microscopy. *Cell*, 2015: 161:438-49.

Coates CJ, Nairn J. Diverse immune functions of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*. 2014; 45: 43-55.

Coates CJ, Whaley T, Nairn J. Effect of temperature on biochemical and cellular properties of captive *Limulus polyphemus*. *Aquaculture*, 2012; 334-337, 30-38.

Coddigton JA, Levi HW. Systematic and evolution of spiders (Araneae). *Ann.Rev.Ecol.Syst.* 1991. 22:565-92

Cong Y, Zhang Q, Woolford D, Schweikardt T, Khant H, Dougherty M, Ludtke SJ, Chui W, Decker H. Structural mechanism of SDS-induced enzyme activity of scorpion hemocyanin revealed by electron cryomicroscopy. *Structure*. 2009; 17:749-58

Cruse JM, Lewis RE. *Illustrated dictionary of immunology*. 2009. CRC.Press, Boca Raton, USA.

Cuff ME, Miller KI, van Holde KE, Hendrickson WA. Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. 1998. *J.Mol. Biol.* 278: 855-70.

Daffre S, Faye Y . Lipopolysaccharide interaction with hemolin, an insect member of the Ig – Superfamily. *FEBS Lett.*, 1997; 408: 127 -30.

Decker H, Rimke T. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J. Biol. Chem.* 1998. 273: 25889-92

Decker H, Jaenicke E. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. 2004. *Dev. Comp. Immunol.* 28:673-87.

Del Valle L, Piña-Oviedo S. HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis. *Front Biosci.* 2006; 11:718–32

Delves PJ, Roit D. The immune system-First of two parts. *N. Engl. J.Med.* 2000;343:37-50.

Destoumieux D, Bulet P, Loew D, Van Dorsselaer A, Rodriguez J, Bache`re E. Penaeidins: A new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J Biol Chem* 1997; 272: 28398–406.

Destoumieux-Garzon D, Saulnier D, Garnier J, Jouffrey C, Bulet P, Bache`re E. Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C -terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J Biol Chem.* 2001; 276:47070–7.

Dolashka P, Voelter W. Antiviral activity of hemocyanins. *Invertebrate Survival Journal*, 2013. 10(1): 120-7.

Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically non-immunosupressed patients. *The Lancet Infections Diseases.* 2003; 3:685-702.

Ehrenstein G, Lecar H. Electrically gated ionic channel in lipid bilayers. *Q.Rev. Biophys.* 1977. 10;1-34

Ehret-Sabatier L, et al. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J Biol Chem*, 1996; 271:29537–44

Epand RM, Epand RF. Lipid Domains in bacterial membrane and action of antimicrobial agents. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. 1788; 289-94.

Faye,I, Hultmark D. The insect immune proteins regulation of their genes. In: Beckage NE, Thompson SN, Federici BA (eds) *Parasites and pathogens of insects. Pathogens.* Academic Press, San Diego, 1993; 2: 25–53

Filiú WFO, Wanke B, Agüena SM et al. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*,2000; 35:591-5,

Finlay BB, Hancock RE. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2, 497-504.

Fisher F, Cook NB. Leveduras e organismos leveduriformes. In: Fisher,F; Cook, N.B. Micologia: fundamentos e diagnostico. Rio de Janeiro. Revinter. 2000; 193-226.

Foelix RF. Biology of Spiders. Harvard University Press, Cambridge, Massachussetts/London, 1996; 305 pp.

Fogaça AC, Silva Jr PI Miranda MTM, Bianchi AG, Miranda, A, Ribolla PEM, Daffre S. Antimicrobial Activity of a Bovine Hemoglobin Fragment in the Tick *Boophilus microplus*. The Journal of Biological Chemistry, 1999; 274 (36):25330-4.

Franco OL, Murad AM, Leite JR, Mendes PA, Prates M V, Bloch C Jr. Identification of a cowpea -thionin with bactericidal activity. FEBS Journal, 2006; 273, 3489-97.

Freceer V, Ho B, Ding JL. *De novo* design of potent antimicrobial peptides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004; 48:3349-57.

Fukuzawa AH, Vellutini BC, Lorenzini DM., Silva PI Jr, Mortara RA, da Silva JM, Daffre S. The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. Developmental and Comparative Immunology. 2008; 32(16): 716-25.

Ganz T, Lehrer RI. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. Mol. Med. Today, 1999; 5:292-7.

Goettel MS, Poprawski TJ, Vandenberg JD, Li Z, Roberts DW. 1990, 'Safety to Nontarget Invertebrates of Fungal Biocontrol Agents', In: Safety of Microbial Insecticides, eds. M. Laird, L.A. Lacey and E.W. Davidson, Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 209-232.

Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. Nat Biotechnol, 2011; 29(7):644-52. doi: 10.1038/nbt.1883. PubMed PMID: 21572440.

Hammill P, Brown K, Jenssen H, Hancock RE. Novel anti-infectives: is host defence the answer? *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2008; 19:628-36.

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

Hanington PC, Forsys MA, Dragoo JW, Zhang SM, Adema CM, Loker ES. Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107: 21087–92.

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

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

Hazes B, Magnus K, Bonaventura C, Bonaventura J, Dauter Z, Kall K, Hol W. Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit two hemocyanin at 2.18 Å resolution, clues for a mechanism of allosteric regulation. *Protein Sci.* 1993. 2:597-619.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway JR, CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1999; 284: 1313-8.

Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*. 2001; 147(8): 1997-2005.

Iwanaga S, Kawabata SI. Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. *Front Biosci* 1998; 3:973–84

Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2005. 38(2) 128:50.

Jaenicke E, Pairet B, Hartmann H, Decker H. Crystallization and preliminary analysis of crystal of the 24-meric hemocyanin of the emperor scorpion (*Pandinus imperator*). *PLoS One*. 2012; 7:32548.

Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006. 19;491-511.

Johns R, Soneshine DE, Hynes WL. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick *Dermacentor variabilis*. *Biochem Mol Biol*. 2001. 31: 857-65.

Johsons MD, Macdougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex J.H. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48(3):693-15.

Kawabata S, Iwanaga S. Role of lectins in innate immunity of horseshoe crab. *Developmental & Comparative Immunology*, 1999; 23: 91-400.

Keller A, Eng J, Zhang N., Li XJ, Aebersold R. A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats. *Mol. Syst. Biol.* 2005; 2:1-8.

Kempter, B. Site of hemocyanin biosynthesis in the tarantula *Eurypelma californicum*. 1983. *Naturwissenschaften* 70:225-56.

Khoo L, Robinette DW, Noga EJ. Callinectin, an antibacterial peptide from Blue Crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. *Mar Biotechnol* 1999; 1:44–51.

Kopáček P, Vogt R, Jindrák L, Weise C, Safarik I. Purification and characterization of the lisozyme from de gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem Mol Biol*. 1999; 29: 989-97

Krop C. Hidrauli system of locomotion. In: Nentwig W. (ed) *Spider ecophysiology*. 2013. Berlin: Springer Science; 2013. 529 p.

Kuhn-Nentwig L, Nentwig W. The immune system of spider. In:_____ Nentwig W. (ed) Spider Ecophysiology. Berlin: Springer Science; 2013. 529 p.

Kurtzman CP. Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and a key to genera. In: Kurtzman CP, Fell JW The yeasts, a taxonomic study. 4 ed., p. 111–121, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, B. V. 1997

Kurtzmann CP, Fell JW. *The Yeast: a taxonomic study*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. 1076 p.

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

Lamberty M, et al. Insect immunity. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. *J Biol Chem*. 2001; 276:4085–92.

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

Lehninger, A.L. *Princípios de Bioquímica*, Savier Editora de Livros Médicos Ltda, 1984, São Paulo.

Lei K, Li F, Zhang M, yang H, Lu, T, Xu X., Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti_WSSV defence. *Dev. Comp. Immunol*. 2008; 32:808-13.

Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*. 2011; 12(1): 323.

Lie KJ, Heyneman D. Acquired resistance to echinostomes in 4 *Biomphalaria glabrata* strains. *Int. J. Parasit*. 1979; 9:533-7.

Litman GW, Anderson MK, Rast JP. Evolution of antigen binding receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17:109-47.

Little TJ, Kraaijeveld AR. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends Ecol. Evol.* 2004; 19: 58–60.

Lorenzini DM, Silva Jr PI, Soares MB, Arruda P, Setubal J, Daffre S. Discovery of immune-related genes expressed in hemocytes of the tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Developmental and Comparative Immunology.* 2006; 30: 545-56.

Lorenzini D M, Silva Jr PI, Fogaça A, Bulet P, Daffre S. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Developmental and Comparative Immunology.* 2003; 27: 781-91.

Ludtke SJ, He K, Heller WT, Harroun TA, Yang L, Huang HW. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry.* 1996. 35:13723-8.

Magnus KA, Hazes B, Ton-That H, Bonaventura C, Bonaventura J, Hol WG. Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropoda hemocyanin shows unusual differences. 1994. *Proteins*, 19(4): 302-9.

Markl J, Decker H, Stöcker W, Savel A, Linzen B, Schutter WG, van Bruggen EFJ.. On the role of dimeric subunits in the quaternary structure of arthropod hemocyanins. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1981; 362: 185-8

Markl J, Markl A, Schartau W, Linzen B. Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins: I (Chelicerata). *J Comp Physiol B* 1979; 130: 283-92

Markl J, Savel A, Decker H, Linzen B.. Hemocyanins in spiders, IX. Homogeneity, subunit composition and the basic oligomeric structure of *Eurypelma californicum* hemocyanin. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem.* 1980; 36: 649-60

Markl J. Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol Bull*,1986; 171: 90-115

Markl J, Decker H. Molecular structure of arthropoda hemocyanins. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 1992.13; 325–76

Markl J, Moller A, Martin A, Rheinbay J, Gebauer W. 10-A- cryo-EM structure and molecular model of myriapod scutigera 6x6 mer hemocyanin: understanding a giant oxygen transport protein. *J. Mol. Biol.* 2009; 392: 362-80.

Martin A, Depoix, F, Stohr, Meissner V, Hagner-Holler S. *Limulus polyphemus* hemocyanin: 10 A cryo-EM structure, sequence analysis, molecular modeling and rigid-body fitting reveals the interfaces between the eight hexamers. *J.mol. Biol.* 2007; 366:1332-50.

Marzzoco A, Torres BB. *Bioquímica Básica*. Editora Guanabara 1990, Rio de Janeiro

Matos BM, Komiyama EY, Balducci I, Koga-Ito C Y. Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita*. *Revista de Odontologia da Unesp.* 2009, 38(4): 244-8

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate Immunity. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343:388-44.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997; 388: 394-7.

Melo MN, Ferre R, Castanho MARB. Antimicrobial peptides linking oartition, activity and high membrane-bound concentration. *Nature Reviews Microbiology.* 2009; 7:245-50.

Mendonza HL, Faye I. Physiological aspects of immunoglobulin superfamily in invertebrates. *Developmental & Comparative Immunology*,1999; 23: 359-74.

Menezes CHP, Neufeld PM. Bacteriologia e Micologia: Para o Laboratorio Clinico. Revinter. Rio de Janeiro 2006, 387pp.

Monge RA, Román E, Nombela C, Pla J. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. Microbiology. 2006; 152:905-12.

Montanha JA, Moellerke P, Bordignon SALJ, Schenkel EP, Roehe PM. Antiviral activity of Brazilian plants extracts. 2004. Acta Farmaceutica Bonaerense. 23, 183-6.

Morangues MD, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, Sevilla MJ, Conti S, Polonelli L, Pontón J. A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C albicans* activities. *Infec Immun*, 2003. 71: 5273-9.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for a cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. 1983; J. Immunol Methods. 65: 55-63.

Mouritzen OG, Jorgensen K. Dynamic lipid-bilayer heterogeneity: a mesoscopic vehicle for membrane function? *BioEssays*. 1992; 14(2): 129-36.

Nagai T, Kawabata S. A link between blood coagulation and prophenoloxidase activation in arthropod host defense. *J. Biol. Chem*. 2000. 275: 29264-7

Naglik JR, Challacombe J, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol R*, 2003; 67(3): 400-28.

Nakajima Y, A van der Goes van Naters-Yasui K, Taylor D, Yamakawa M. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochem Mol Biol*. 2001; 31:747-51.

Nakajima Y, A van der Goes van Naters-Yasui K, Taylor D, Yamakawa M. Antibacterial peptide defensins is involved in midgut immunity of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Mol Biol*. 2002; 11:611-8

Nakajima Y, Ogihara K, Taylor D, Yamakawa M. Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *J. Med. Entomol.* 2003; 40:78-81.

Neufeld PM. Manual de Micologia Médica: Técnicas de Básicas de Diagnóstico. Programa Nacional de Qualidade, 1999; Rio de Janeiro, 1.214pp

Ng JH, Ilag LL. Cryptic protein fragments as an emerging source of peptide drug. *IDrugs*, 2006; 9:343-6.

Odds FC, Webster CE, Mayuranathan P, Simmons PD. *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidose. *J. Med. Med. Mycol*, 1988; 26(5):277-83

Oerke EC. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 2006; 144: 31-43.

Osaki T, Kawabata S. Structure and function of coagulogen, a clottable protein in horseshoe crabs. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004; 61:1257-65.

Park CB, Kim H S, Kim S C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 244, 253–57

Pelegriani P B, Franco O L. Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2005; 37:2239-53.

Pereira IS, Silva Jr PI, Miranda MTM, Almeida IC, Naoki H, Konno K, Daffre S. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Biochemical and Biophysical Research Communities*. 2007; 3(52) : 953 – 9.

Pham LN, Dionne MS, Shirasu-Hiza M, Schneider DS. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *Plos Pathogens* 2007; 3: e26

Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistr.* 1992. 31; 12416-12423.

Ratcliffe NA, Whitten, MMA. Vector Immunity. In: Gillespie, S.H.; L. et al (Ed.). *Microbe-vector Interactions in Vector-borne Diseases*. Cambridge: Cambridge University Press. 2004; 240-71.

Rehm P, Pick C, Borner J, Burmester, T. The diversity and evolution of chelicerate hemocyanin. *BMC Evol. Biol.* 2012; 12:19.

Ribas RC, Baeza LC, Ribeiro FHM. Isolation of *Cryptococcus* spp. in excrements of pigeons (*Columba* sp.) in the Maringa city, PR, Brazil. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 2011; 15:45-50,

Riciluca KCT. *Purificação e Caracterização de Peptídeos Antimicrobianos na hemolinfa de *Acanthoscurria rondoniae* (Mygalomorphae, Theraphosidae)*. [(Dissertação (Mestrado em Ciências)] São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Saúde do estado de São Paulo, Instituto Adolfo Lutz. 2011

Riciluca KCT, Sayegh RSR, Melo RL, Silva Jr PI. Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. *Results in Immunology*, 2012; 2:66-71.

Rippon JW. *Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. Philadelphia: Saunders; 1974. 587p.

Rommens CM, Kishore GM. Exploiting the full potential of disease resistance genes for agricultural use. *Current Opinion Biotechnology*. 2000; 11: 120-25.

Roth, O., Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P. & Kurtz, J. Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Proc. R. Soc. B* 2009; 276: 145–51.

Sadd BM, Schmid-Hempel P. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Curr. Biol.* 2006; 16: 1206–10

Sanggaard K, Dyrland TF, Bechsgaard JS, Scavenius C, Wang T, Bilde T, Enghild, J.J. The spider hemolymph clot proteome reveals high concentration of hemocyanin and von Willebrand factor-like proteins. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2016; 1864(2): 233-41.

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 da USP, Universidade de São Paulo 2011.

Schaden E, Kozek-Langenecker SA. Direct thrombin inhibitors: pharmacology and application in intensive care medicine. *Intensive Care Med.* 2010; 36(7):1127-37.

Schatz M, Orlova EV, Dube P, Jager J, van Heel M. Structure of *Lumbricus terrestris* Hemoglobin at 30 Å resolution Determined using Angular Reconstruction. *J. Struct. Biol.* 1995; 114(1): 28-40.

Schatz M, Orlova EV, Dube, P, Stark H, Zemlin F, van Heel M. Angular reconstitution in Three-dimensional Electron Microscopy: Practical and Technical Aspects. *Scanning Microscopy.* 1997; 11:179-3

Schnapp D, Kemp GD, Smith VJ. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur J Biochem.* 1996; 240:532–9.

Schneider HJ, Markl J, Schartau W, Linzen B. Subunit heterogeneity of *Eurypelma* (Dugesiella) hemocyanin, and separation of polypeptide chains. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem.* 1977; 358: 1133-41

Serrano SMT, Mentele R, Sampaio CA, Fink E. Purification, characterization and amino acid sequence of a serine protease, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*, 2005; 4(21):7786-93.

Serrao VHB. Caracterização das interações macromoleculares das proteínas envolvidas na síntese de selenocisteínas em *Escherichia coli*. [Relatório Técnico Científico – Ciências sem Fronteiras CNPq], São Carlos: Instituto de Física de São Carlos; 2015.

Serysheva I, Orlova EV, Chiu W, Sherman MB, Hamilton SL, van Heel M. Electron cryomicroscopy and angular reconstruction used to visualize the skeletal muscle calcium release channel, *Nature struct. Bio.* 1995; 2:18-24.

Shida CS. Estudo da Interação de Melatonina com membranas lipídicas. Dissertação de Mestrado, 1993.

Sidwel RW. Determination of antiviral activity. *Drugs Pharmaceutical Science.* 1986; 27, 433-0.

Silva Jr PI. Sistema Imune de Aracnídeos: Estrutura química e atividade de peptídeos antimicrobianos da Hemolinfa de *Acanthoscurria gomesiana*. [tese (doutorado em Parasitologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2000.

Silva Jr PI, Daffre S, Bulet P. Isolation and Characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich Defense Peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* Hemocytes with Sequence Similarities to Horseshoe Crab Antimicrobial Peptides of the Tachyplesin Family. *The Journal of Biological Chemistry.* 2000; 275(45): 33464-70.

Singer SJ, Nicolson GL The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972; 175: 720-31.

Söderhall K., Cerenius L. Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunol.* 1998; 10:23-8

Söderhäll K, Smith V J. Separation of the hemocyte population of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* 1983; 7(2):229-39.

Stone KL, Willians KR. Enzymatic digestion of proteins in solution and in SDS polyacrylamide gel. In: Walker, J.M.(ed). *The protein protocol handbook*. Humana Press Inc, Totowa, N.J. 1996; 415 – 21.

Su XD, Gastinel NG, Vaughn DE, Faye I, Poon P, Björkman P J. Crystal structure of hemolin; A horseshoe shape with implication for homophilic adhesion. *Science*, 1998; 281: 991-5.

Subbalakshmi C, Sitaram N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998; 160, 91–6

Sun SC, Lindström I, Boman HG, Faye I., Schmidt O. Hemolin: An insect – immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science*, 1990; 250: 1729 -32.

Suzuki LC. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo de terapia fotodinâmica. [tese (doutorado em microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares; 2009.

Tanford C. *The hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2a. Edição, Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, 1980, New York.

Thomas AM, Rudolf, VHW Challenges of metamorphosis in invertebrate hosts: maintaining parasite resistance across life-history stages. *Ecol. Entomol.* 2010; 35: 200–05.

Thomma BPHJ, Penninckx IAMA., Broekaert WF, Cammue BPA. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology*, 2001; 13:63-68.

van Heel M, Stöffler-Meilicke M. The characteristic views of *E. coli* and *B. stearothermophilus* 30S ribosomal subunit in the electron microscope. *EMBO J.* 1985; 4: 2389-95.

van Heel M. Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction. *Ultramicroscopy*. 1987; 21:111-24

van Heel M. Detection of objects in quantum-noise-limited images. *Ultramicroscopy*. 1982; 8:331-42

van Heel M, Portugal R, Schatz M. Multivariate Statistical Analysis in Single Particle (Cryo) electron Microscopy IN: *Electron microscopy in Life Science. 3D-EM Network of Excellence*, Editors: A. Verkley and E. Orlova. 2009.

van Heel M, Frank L. Use of multivariate statistical in analysis the images of biological macromolecules. *Ultramicroscopy*, 1981; 6; 987194

van Heel M, Portugal, R, Rohou A, Linnemayr C, Bebeacua C, Schmidt R, Gran T, Schatz M. Four-dimensional cryo-electron microscopy at quas-atomic resolution IMAGIC 4D. IN: *International Tables for Crystallography*. 2012 F:624-28

van Heel M, Schatz M, Orlova E. Correlation functions revisited. *Ultramicroscopy*. 1992; 46: 307-16.

van Heel M, Gowen B, Matadeen R, Orlova EV, Finn R, Pape T, Cohen D, Stark H, Schmidt R, Schats M, Patwardhan A. Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2000; 33(4) 307-69.

van Holde KE, Miller, KI, Decker H. Hemocyanins and Invertebrate Evolution. *J Biol Chem*, 2001; 15563-66.

van Holde KE, Miller, KI. Hemocyanins. *Adv. Protein. Chem.* 1995; 47: 1-81.

Vega RCR, García BI, D'Ambrosio C, Diego-García E, Scaloni A, Possani LD. Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury. *CLMS,Cell. Mol. Life Sci.* 2004; 1507-19.

Villén J, Gygu SP. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 2008; 3(10):1630-38.

Vilmos P, Kurucz E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol Lett.* 1998; 62(2):59-66.

Voit R, Feldmaier-Fuchs G, Schweikardt T, Decker H, Burmester T. Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*. Structure and intramolecular evolution of the subunits. *J. Biol. Chem.* 2000. 275; 39339-44

Volbeda A, Hol WJG. Crystal structure of hexameric hemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1989. 209:249-79.

Wang Y, Willott E, Kanost MR. Organization and expression of the *hemolin* gene, a member of the immunoglobulin superfamily in an insect, *Manduca sexta*. *Insect Molecular Biology* 1995; 4: 113-23.

Wilson R, Chen C, Ratcliffe NA. Innate Immunity in Insects: The role of Multiple, Endogenous Serum Lectins in the Recognition of Foreign Invaders in the Cockroach, *Blaberus discoidales*. *The Journal of Immunology*, 1990; 162: 1590 -56.

Yasumura Y, Buonassisi V, Sato G. Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. *Cancer Res* 1966; 26(3):529-35.

Yonezawa A, Kuwahara J, Fujii N., Sugiura Y. Binding of tachyplesin I to DNA revealed by footprinting analysis: significant contribution of secondary structure to DNA binding and implication for biological action. *Biochemistry* 1992; 31: 2998–3004.

Zaio M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J.Mol. Med.*,2007; 85: 317-29.

Zaslof M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002; 415:398-95.

Zhang X, Huang C, Qin Q. Anti-viral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. *Antivir. Res.*, 2004; 61:93-99.

Zhao L and Kanost MR In search of a function for hemolin, a hemolymph protein from the immunoglobulin superfamily. *J. Insect Physiol.* 1996; 42: 73-79.

Ziarrusta, GB Vulvovaginitis candidiásica. *Rev Iberoam Micol*, 2002. 19:22-24