

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

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 IIIQYEGHKK. 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.

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).

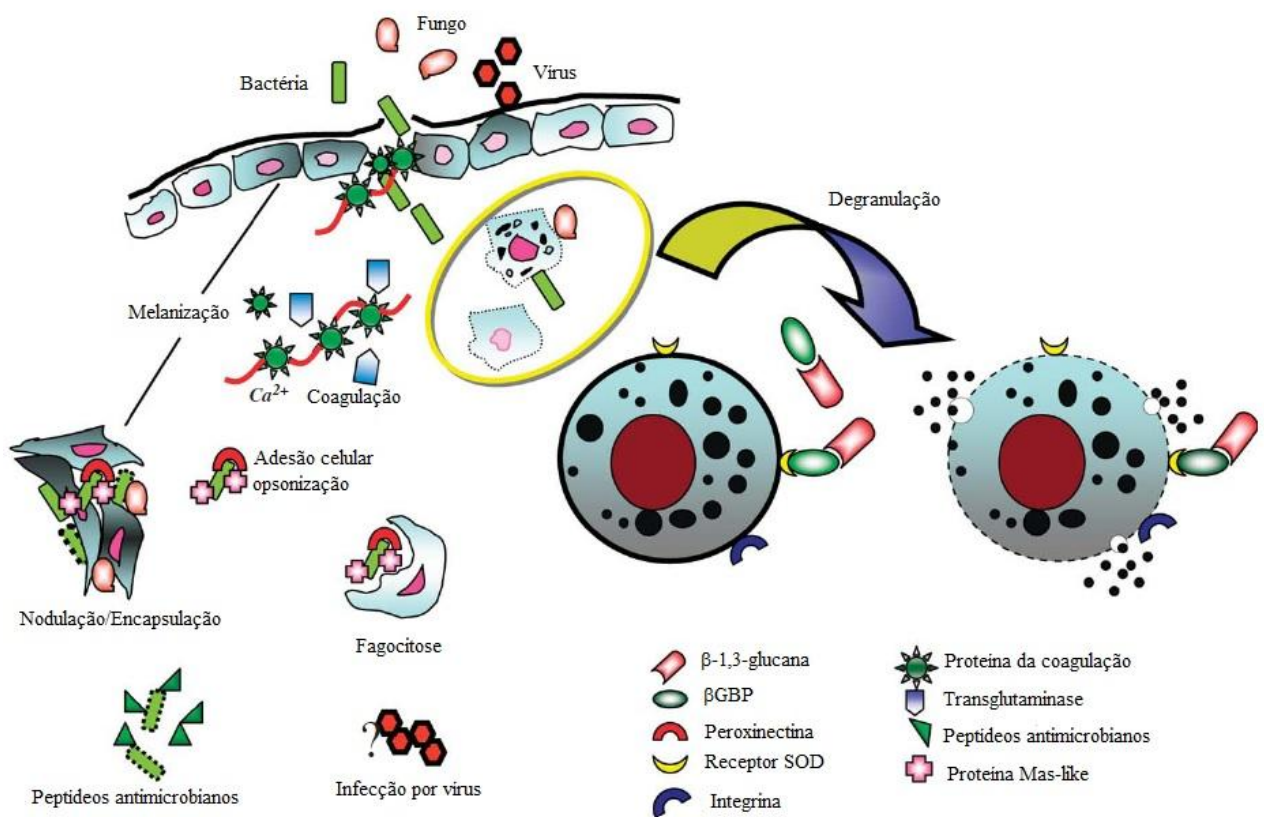


Figura 1 – Esquema representativo do sistema imune de artrópodes. Uma vez que patógenos entram na hemocele do hospedeiro, eles devem encontrar um mecanismo complexo de defesa do sistema imune inato (modificado de Jiravanichpaisal et al., 2006).

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).

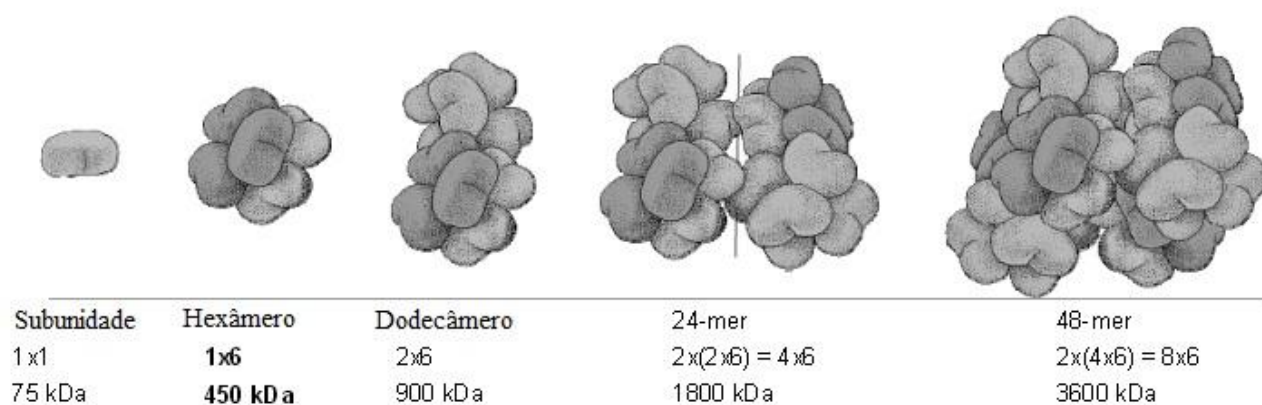


Figura 2 – Estrutura básica da hemocianina dos Chelicerata. Hemocianina construída hierarquicamente $2n$ ($n = 0, 1, 2, 3$) em hexâmeros.

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).

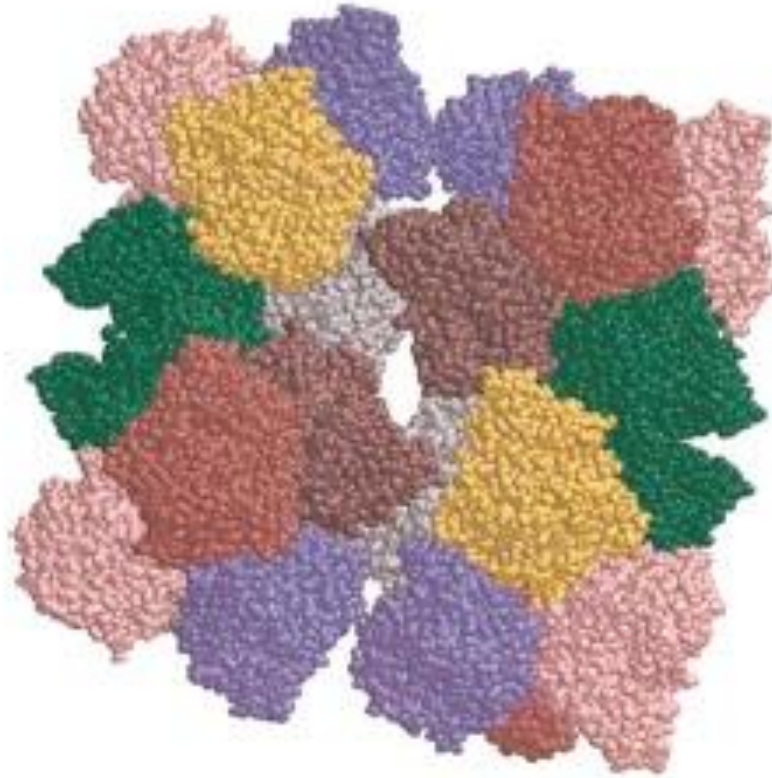


Figura 3 - Estrutura 24-mer da Hemocianina da tarantula *A. hentzi*. As diferentes cores se referem as diferentes subunidades: a -verde; b - cinza; c - marron; d - amarelo; e - rosa; f - azul; g – vermelho (Voit et al, 2000).

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 polipeptídeos 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 cripteinas e a proposta que muitas classes de cripteinas 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).

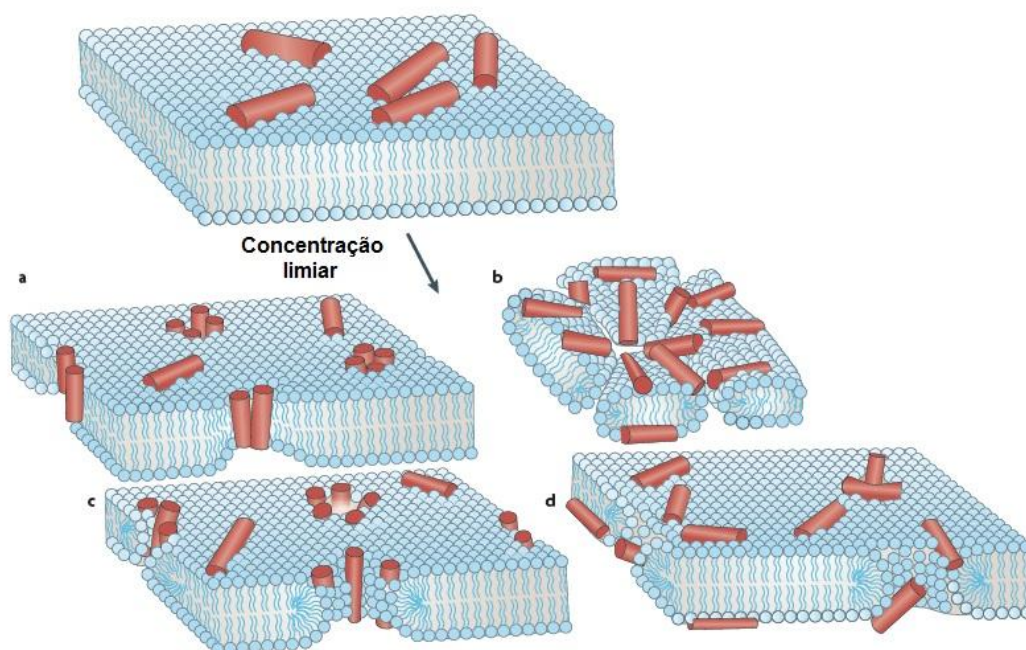


Figura 4 - Mecanismos propostos de peptídeos antimicrobianos mediados pela ruptura da membrana. a) Modelo “Barrel-stave”, b) Modelo “Carpet”, c) Formação Poro Toroidal, d) Formação Poro Toroidal desordenado (Melo et al., 2009).

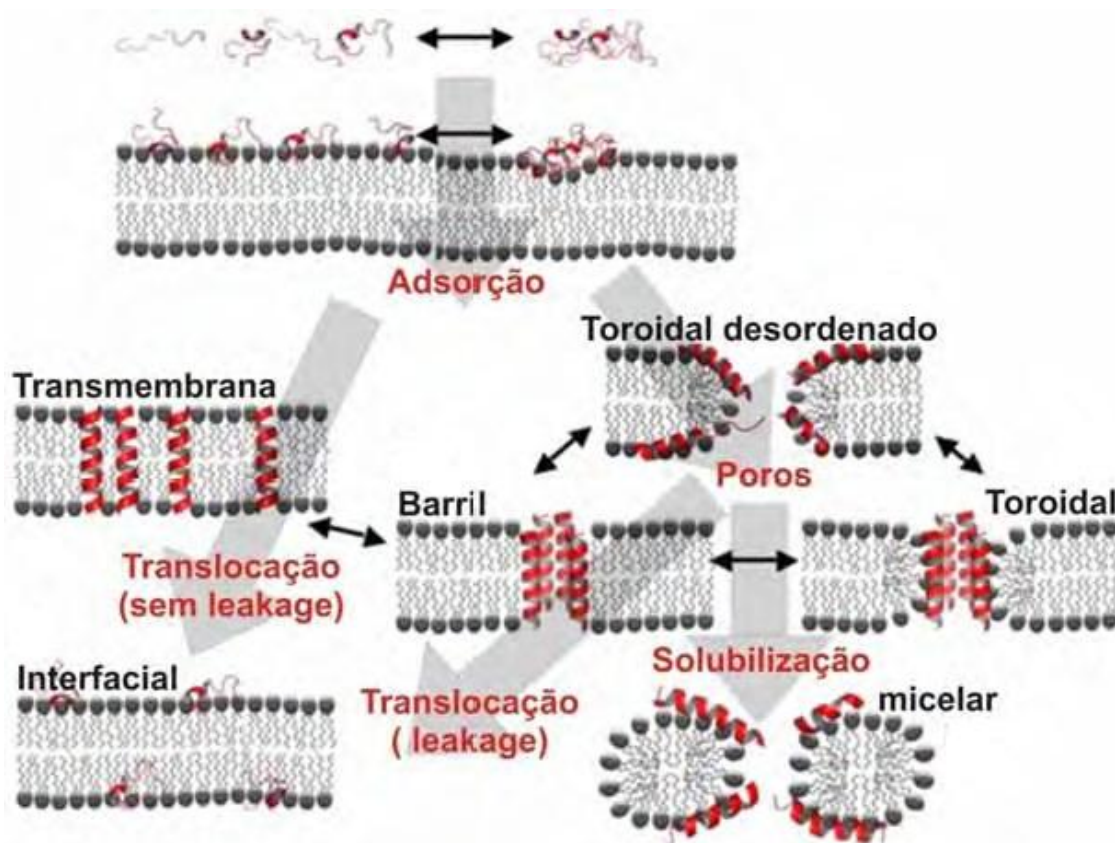


Figura 5 – Esquema das possíveis vias de interação de peptídeos antimicrobianos com lipídios. Monômeros e pequenas agregações de peptídeos, em contato com a membrana, que acabam se ligando na interface (adsorção). Eventualmente os peptídeos distribuem-se equitativamente entre as duas camadas lipídicas. 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).

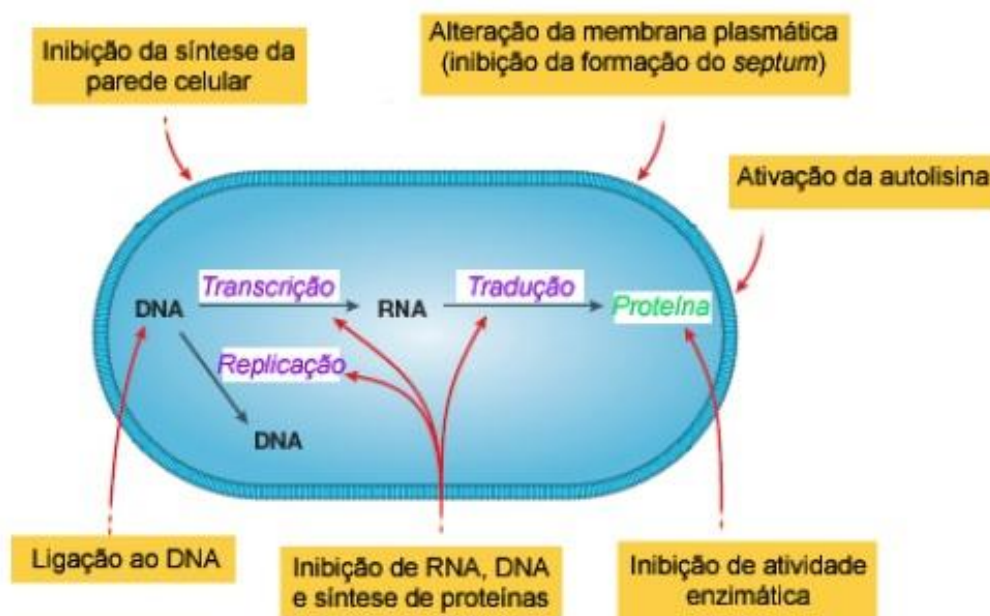


Figura 6 - Esquema simplificado do modo de ação intracelular de peptídeos antimicrobianos (modificado de Brogden, 2005)

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).

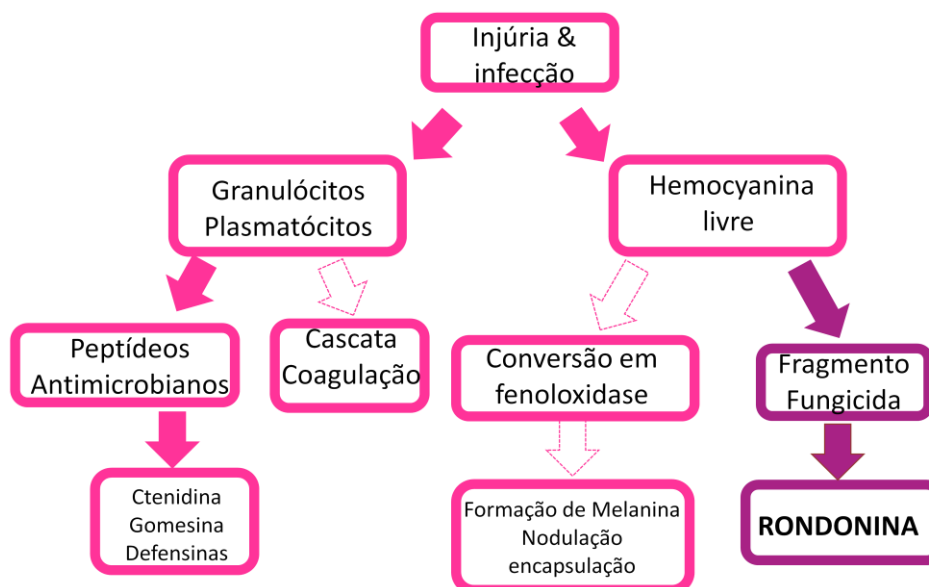


Figura 7 – Esquema do sistema imune das aranhas. Processo de injúria e infecção por microrganismos. O processo de injúria e infecção das aranhas ainda não é bem conhecido e somente os componentes nas caixas tem sido detectado nos hemócitos ou hemolinfa, enquanto a via da cascata de coagulação e formação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

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 hemocyanina 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 os 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, Muceli 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, Forsy 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 lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem Mol Biol*. 1999; 29: 989-97

Krop C. Hydraulic 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, Geb uer 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 adaptative 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