

**Fernanda Dias da Silva**

**Mecanismo de ação da microplusina, um  
peptídeo quelante de cobre com  
atividade antimicrobiana**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências.

Área de concentração:  
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sirlei Daffre**

São Paulo

2008

## RESUMO

SILVA, F. D. **Mecanismo de ação da microplusina, um peptídeo quelante de cobre com atividade antimicrobiana.** 122 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2007.

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) fazem parte de um dos mecanismos da imunidade inata contra infecções. A microplusina é um PAM de 10.204 Da, isolado da hemolinfa livre de células e dos ovos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. É um PAM aniônico em pH fisiológico, possui seis resíduos de cisteína, com formação de três pontes dissulfeto, além de sete resíduos de histidina concentrados principalmente na sua porção C-terminal. O presente trabalho teve como objetivo investigar o mecanismo de ação antimicrobiana da microplusina. A microplusina recombinante é ativa contra várias bactérias Gram-positivas e fungos, porém não apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas. Para avaliar o seu mecanismo de ação, foram utilizados dois modelos: a bactéria *Micrococcus luteus* e o fungo *Cryptococcus neoformans*. A microplusina é bacteriostática contra *M. luteus* e apresenta localização intracelular na bactéria. Além disso, observamos que a microplusina liga cobre e que a adição deste metal ao meio de cultivo reduz sua atividade antibacteriana. Bactérias *M. luteus* pré-incubadas com microplusina retomam o seu crescimento quando cobre é adicionado ao meio. Estes dados indicam que a atividade da microplusina está relacionada à sua habilidade de depletar cobre do meio extra ou intracelular, sugerindo um efeito nutricional para o peptídeo. A microplusina apresenta estrutura terciária com cinco  $\alpha$ -hélices e sua ligação ao cobre não induz mudanças conformacionais. Observou-se que as histidinas 1, 2 e 74 da microplusina podem estar envolvidas na formação de um sítio de ligação ao cobre. Quanto à *C. neoformans*, verificou-se que a microplusina inibe a melanização do fungo, um fator de virulência catalisado pela lacase, uma enzima cobre-dependente. Entretanto, a microplusina não afeta a atividade da

lacase, nem sua expressão gênica. O peptídeo também não inibe a auto-polimerização de substratos fenólicos que levam à melanização. Sendo assim, mais estudos são necessários a fim de avaliar o mecanismo pelo qual a microplusina inibe a melanização. Adicionalmente, a microplusina afeta a viabilidade do fungo e reduz o tamanho de sua cápsula, outro importante fator de virulência. As atividades da microplusina sobre *C. neoformans* sugerem o seu potencial terapêutico. Experimentos *in vivo* com modelo murino, mostraram que a microplusina reduz o processo inflamatório e a viabilidade de *C. neoformans* nos pulmões, indicando que em condições otimizadas, o peptídeo pode atuar no controle de infecções.

**Palavras-chave:** Carrapato; Peptídeo Antimicrobiano; Mecanismo de Ação; Quelante de Cobre; Antibacteriano; Antifúngico.

## ABSTRACT

SILVA, F. D. **Action mechanism of microplusin, a copper chelating peptide with antimicrobial activity.** 122 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2007.

Antimicrobial peptides (AMPs) take part of innate immune mechanisms against infections. Microplusin is a 10,204 Da AMP, isolated from cell-free hemolymph and eggs of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. It is an anionic AMP at physiological pH, with six cysteine residues forming three disulfide bridges and seven histidine residues clustered mainly at the carboxy end portion. The goal of the present work was investigate the antimicrobial action mechanism of microplusin. Recombinant microplusin is active against Gram-positive bacteria and fungi, however, no activity is detected for Gram-negative bacteria. Two models were used to evaluate the action mechanism of microplusin: the bacteria *Micrococcus luteus* and the yeast *Cryptococcus neoformans*. Microplusin is bacteriostatic against *M. luteus* and its localization is intracellular for these bacteria. Moreover, microplusin binds copper and the addition of this metal into the medium reduces its antibacterial activity. *M. luteus* bacteria pre-treated with microplusin recover its growth when copper is added. These data indicate that microplusin activity is related to its ability to deplete copper present in the extracellular or intracellular environment, suggesting a nutritional effect. Microplusin presents a tertiary structure with five  $\alpha$ -helix and the copper binding does not induce conformation changes. In addition, it was observed that histidines 1, 2 and 74 from microplusin may be involved in the formation of a copper binding site. About *C. neoformans*, it was verified microplusin inhibits its melanization, a virulence factor catalyzed by laccase, a copper dependent enzyme. However, microplusin does affect neither laccase activity nor its gene expression. The melanization caused by auto-polymerization of phenolic substrates, is also not inhibited by microplusin.

Hence, additional studies are required to evaluate the mechanism by which microplusin inhibits melanization. In addition, microplusin also affects the fungi viability and reduces the capsule size, another important virulence factor. The microplusin activities against *C. neoformans* suggest its therapeutic potential. *In vivo* experiments with murine model showed that microplusin reduces the inflammation and the viability of *C. neoformans* in the lungs, indicating that, in optimized conditions, the peptide may act in the infection control.

**Key-words:** Tick; Antimicrobial Peptide; Action Mechanism; Copper Chelating; Antibacterial; Antifungal.

# 1 INTRODUÇÃO

Todos os seres vivos possuem um sistema imune envolvido na detecção e eliminação de patógenos, que atua através de diversos mecanismos, incluindo barreiras físicas, células fagocitárias e moléculas efetoras circulantes tais como as pertencentes ao sistema complemento de mamíferos. A presença destes componentes é independente da presença do agente infeccioso, não é potencializada após uma primeira infecção e possui pouca ou nenhuma especificidade, o que caracteriza o mecanismo de imunidade inata. Por outro lado, outros mecanismos de defesa são altamente específicos, formando a chamada imunidade adquirida. Neste caso, além da especificidade, ocorre um processo denominado memória imunológica, no qual estímulos subseqüentes modulam as respostas contra um determinado antígeno. Através da imunidade adquirida é possível gerar um repertório praticamente infinito de receptores específicos para cada antígeno. Todos estes receptores são membros da superfamília das imunoglobulinas. Dentro desta família estão os anticorpos que são secretados pelos linfócitos B. A imunidade adquirida está presente apenas nos organismos vertebrados e, em conjunto com a imunidade inata, atua na eliminação de agentes infecciosos (ABBAS, 1998).

Ao contrário dos vertebrados, os animais invertebrados possuem apenas o sistema imune inato de defesa. Entre os mecanismos dos hospedeiros invertebrados para eliminação de patógenos estão: a coagulação da hemolinfa, a ativação da cascata da pró-fenoloxidase, com formação de melanina, a produção de espécies reativas de oxigênio, a fagocitose e a produção de moléculas antimicrobianas (IWANAGA e LEE, 2005).

## 1.1 Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) estão amplamente distribuídos entre os seres vivos, incluindo bactérias, fungos, plantas, animais invertebrados e vertebrados e representam um importante papel na imunidade inata

(MOOKHERJEE e HANCOCK, 2007). Estas moléculas foram inicialmente isoladas da hemolinfa de insetos, pele de sapos e grânulos de neutrófilo humano e, atualmente, mais de 1000 PAMs já foram descritos (TOSSI, A., 2008).

Diversos estudos têm demonstrado que os PAMs, além da participação direta na eliminação dos patógenos, podem atuar como reguladores de respostas do sistema imune. Eles podem regular respostas inflamatórias, como por exemplo, aquelas desencadeadas por endotoxinas tais como o lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas, e suprimir a expressão de genes pró-inflamatórios e assim, evitar a síndrome da inflamação sistêmica ou sepsis. Além disso, os PAMs podem induzir a produção de diferentes citocinas e quimocinas, agir como agente quimotrativo para determinados tipos de células como monócitos, neutrófilos, linfócitos T e eosinófilos, além de influenciar na diferenciação de células dendríticas imaturas. Como vários dos componentes da imunidade inata, os PAMs indiretamente possuem um papel no desenvolvimento dos linfócitos e disparo das respostas do sistema imune adaptativo (MOOKHERJEE e HANCOCK, 2007). Entre os PAMs com funções imunomodulatórias, foi demonstrado, *in vitro*, que a catelicidina humana LL-37 diminui a produção de mediadores inflamatórios induzidos pela presença de LPS e outros produtos bacterianos. Em adição a este efeito, ocorre um aumento da produção de quimocinas importantes para o recrutamento de células do sistema imune (SCOTT *et al.*, 2002). Quanto à expressão gênica, foi demonstrado que LL-37 inibe a expressão de genes para mediadores inflamatórios e aumenta a expressão de genes para quimocinas em macrófagos murinos (SCOTT *et al.*, 2002). Experimentos *in vivo* com camundongos mostraram que a administração de LL-37 aumenta a produção de moléculas quimotrativas tais como MCP1. Os autores propõem que LL-37 pode bloquear a inflamação induzida por produtos bacterianos e ao mesmo tempo, ajudar no recrutamento de fagócitos que podem auxiliar na eliminação do patógeno (SCOTT *et al.*, 2002). Para defensas de humanos foi demonstrado que estas atuam como agentes quimotáticos para linfócitos T CD4<sup>+</sup> “naive” e T CD8<sup>+</sup>, além de células dendríticas imaturas,

sugerindo que estes PAMs contribuem para a imunidade inata através do recrutamento de linfócitos T e células dendríticas (YANG *et al.*, 2000).

Os PAMs são produzidos por vários tipos celulares e, geralmente, são expressos como pró-peptídeos, com liberação da molécula biologicamente ativa após processamento proteolítico. Em humanos, são produzidos por monócitos/macrófagos, neutrófilos, células epiteliais, queratinócitos e mastócitos (MOOKHERJEE e HANCOCK, 2007). Em animais invertebrados, como os insetos, os PAMs podem ser encontrados no corpo gorduroso (órgão equivalente ao fígado humano), células da hemolinfa (sangue dos invertebrados) e epitélios do tubo digestório, sistema traqueal, entre outros (BULET e STOCKLIN, 2005). A expressão dos PAMs pode ser constitutiva ou induzida no momento da infecção por moléculas do patógeno (BULET e STOCKLIN, 2005). A ativação das vias de sinalização que estimulam a produção de PAMs como uma das respostas do sistema imune inato a infecções depende da ação de receptores específicos para padrões moleculares presentes na superfície dos patógenos tais como LPS, ácidos lipoteicóicos, peptideoglicanos e  $\beta$  1-3 glicanas. Em *Drosophila*, por exemplo, a secreção de PAMs é mediada por duas vias distintas denominadas “Toll” e “Imd” que, funcionalmente, são similares à via dos receptores “Toll-like” e do receptor do fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) de mamíferos, respectivamente (KURATA *et al.*, 2006). *Drosophila* possui mecanismos para distinguir diferentes patógenos, a via “Toll” ativa genes para PAMs em resposta a infecções causadas por bactérias Gram-positivas e fungos e a via “Imd” responde a infecções causadas por bactérias Gram-negativas. Uma série de moléculas estão envolvidas no reconhecimento e ativação dos genes para PAMs. Ao contrário dos receptores “Toll-like” de mamíferos que reconhecem diretamente as moléculas dos patógenos, em *Drosophila* o reconhecimento ocorre através de um receptor solúvel (Spätzle), produzido pela proteólise de uma proteína endógena após infecção, que então se liga ao receptor “Toll” (KURATA *et al.*, 2006).



### 1.1.1 Estrutura e modo de ação

Em sua maioria, os PAMs apresentam baixa massa molecular (menos de 100 aminoácidos) e com predominância de aminoácidos básicos que lhes conferem uma carga líquida positiva (+2 a +9) em pH fisiológico. Além disso, os PAMs também apresentam uma região rica em aminoácidos hidrofóbicos. A separação espacial entre aminoácidos básicos e hidrofóbicos torna os PAMs moléculas anfipáticas (BULET e STOCKLIN, 2005).

Apesar de os estudos com PAMs catiônicos serem os mais abundantes na literatura, PAMs com predominância de aminoácidos acídicos em sua seqüência primária também têm sido descritos. Entre os exemplos de PAMs aniônicos estão os derivados da pró-encefalina, denominados peptídeo B e enkeletina (STERN *et al.*, 1981; GOUMON *et al.*, 1996) os derivados da proteína presente no suor humano dermcidina DCD-1L e DCD-1 (SCHITTEK *et al.*, 2001), o peptídeo de sapo maximina H5 (LAI *et al.*, 2002) e os peptídeos presentes no fluído bronco-alveolar de ovinos (BROGDEN *et al.*, 1996; HEIDARI *et al.*, 2002).

Em geral, os PAMs são divididos em dois grupos principais (BULET *et al.*, 2004):

- **PAMs lineares:**

São peptídeos que não apresentam pontes dissulfeto em sua estrutura. Em solução aquosa ou ambiente que mimetize a membrana celular, costumam adotar uma estrutura  $\alpha$ -hélice anfipática. Como exemplos podemos citar a catelicidina LL-37 (JOHANSSON *et al.*, 1998), as cecropinas (BOMAN *et al.*, 1993) e a magainina (MATSUZAKI, 1999).

Além dos peptídeos  $\alpha$ -hélice, existe uma outra subclasse de peptídeos lineares que possuem predominância de um ou dois resíduos de aminoácidos tais como prolina, arginina, triptofano, histidina e glicina. Entre estes estão a indolicidina (FRIEDRICH *et al.*, 2001), rica em triptofano e as histatinas (KAVANAGH e DOWD, 2004), ricas em histidinas.

- **PAMs cíclicos:**

São peptídeos que contêm um ou mais pares de cisteínas envolvidas na formação de pontes de dissulfeto intramoleculares. Os PAMs cíclicos podem apresentar as suas extremidades amino e carboxi-terminal abertas ou fechadas e podem formar estruturas tais como: grampos tipo  $\beta$ , folhas  $\beta$ -pregueadas ou uma mistura de  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ -pregueadas. Entre os exemplos mais conhecidos estão as  $\alpha$ -e  $\beta$ -defensinas (SELSTED *et al.*, 1985), as protegrinas (FAHRNER *et al.*, 1996) e a gomesina (SILVA *et al.*, 2000; MANDARD *et al.*, 2002).

Além da cationicidade, os PAMs freqüentemente adotam uma estrutura anfipática caracterizada por uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica separadas espacialmente. Os mecanismos de ação dos PAMs ainda não são totalmente conhecidos, porém, sabe-se que o seu caráter catiônico e a sua tendência à anfipaticidade facilitam sua interação com a superfície celular de bactérias e inserção na membrana. As interações eletrostáticas entre PAMs e superfície celular de bactérias são facilitadas pela presença de fosfolipídios com carga líquida negativa na face externa da membrana, grupos fosfato de moléculas de LPS e ácidos teicóicos. A membrana citoplasmática de células de mamíferos, ao contrário das bactérias, apresenta na sua face externa uma predominância de fosfolipídios com carga líquida neutra, o que contribui para que a ação de diversos PAMs seja seletiva para membrana de bactérias (ZASLOFF, 2002; BROGDEN, 2005).

Como já mencionado, a anfipaticidade dos AMPs facilita a sua inserção na membrana através da interação de sua região hidrofóbica com a região hidrofóbica dos fosfolipídios de membrana e como conseqüência, podem ocorrer permeabilização da membrana, vazamento de conteúdo intracelular e morte do patógeno (BROGDEN, 2005; HANCOCK e SAHL, 2006; YOUNT *et al.*, 2006). Para ilustrar a inserção na membrana e os resultantes danos causados à célula, três modelos são propostos:

- **Modelo “Carpete”** - 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 desintegração e

formação de micelas, o que leva à morte da bactéria. A ovispirina é um exemplo de PAM com este tipo de ação (BROGDEN, 2005).

- **Modelo “Barril”** - Neste, os PAMs anfipáticos  $\alpha$ -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 à morte celular. A alameticina é um exemplo de PAM que induz este tipo de poro (BROGDEN, 2005).

- **Modelo dos “Poros Toroidais” ou “Canais Agregados”** - Após 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 fosfolipídios, mesmo quando inseridos perpendicularmente à bicamada lipídica. Este tipo de poro transmembrânico é induzido pelas magaininas, protegrinas e melitinas (BROGDEN, 2005).

Estudos sobre o mecanismo de ação dos peptídeos aniônicos ainda são escassos na literatura. Um estudo mais aprofundado foi realizado com os derivados da dermcidina por Steffen e colaboradores (STEFFEN *et al.*, 2006). Os autores demonstraram que estes PAMs formam poros ou desestabilizam as membranas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Também foi observado que os derivados da dermcidina ligam-se à superfície de *S. aureus* e formam aglomerados de peptídeos em pontos específicos, o que, segundo os autores, pode ser um indicativo da presença de receptores específicos na membrana.

A correlação entre permeabilização da membrana e morte do patógeno nem sempre é observada. Em um estudo envolvendo várias classes de PAMs, foi demonstrado com a utilização de lipossomos que mimetizavam a membrana bacteriana, que a polifemusina I causava permeabilização em uma concentração que não causava efeito na viabilidade das bactérias (ZHANG *et al.*, 2001). Outro resultado interessante foi o obtido com o derivado do híbrido cecropina-melitina (V25p), onde concentrações oito vezes maiores que sua mínima concentração inibitória (MCI) para *E. coli* não foram suficientes para causar permeabilização na membrana. Estes estudos indicaram que os PAMs poderiam possuir outros alvos além da membrana citoplasmática. De fato, nos últimos anos, vários PAMs com habilidade para atravessar a membrana citoplasmática sem causar grandes danos a esta e atingir o meio intracelular têm sido descritos. Estes PAMs agem através de diversas maneiras tais como inibição de síntese de DNA, RNA e/ou proteínas, produção de peróxido de hidrogênio, ativação de autolisinas e fosfolipases, inibição de atividade enzimática, inibição de formação de septo de membrana e inibição do arranjo correto das proteínas, entre outros (CUDIC e OTVOS, 2002).

Vários exemplos de PAMs com ação intracelular podem ser mencionados: a pirrocoricina (KRAGOL *et al.*, 2001), um peptídeo que se liga à proteína de choque térmico DnaK de *E. coli* e inibe sua função de ATPase, com prejuízo do arranjo correto das proteínas. A buforina II (PARK *et al.*, 1998), um PAM isolado de estômago de sapo, atravessa a membrana celular e interage com moléculas de RNA e DNA. Hsu e colaboradores observaram que a indolicidina, um PAM isolado de neutrófilo bovino, inibe rapidamente a síntese de DNA em *E. coli* (HSU *et al.*, 2005). Outro exemplo é o da lactoferricina B que inibe a biossíntese de DNA, RNA e proteínas em bactérias (ULVATNE *et al.*, 2004).

Diversos estudos têm sido realizados com PAMs ricos em histidinas e capazes de ligar metais. Foi demonstrado que as histatinas, PAMs presentes na saliva humana, interagem com vários íons metálicos tais como cobre, níquel e zinco (BREWER e LAJOIE, 2000; GROGAN *et al.*, 2001; GUSMAN *et al.*, 2001). Outra molécula que liga cobre e zinco e possui ampla atividade antimicrobiana é

o polipeptídeo produzido pelo fungo *Verticillium kibiense*, um poli(arginil-histidina) (NISHIKAWA e OGAWA, 2004). Alguns trabalhos demonstram que a ligação a metais está diretamente relacionada à atividade antimicrobiana destes PAMs e muitas vezes, potencializa a atividade dos mesmos. Em um estudo com a bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis*, foi demonstrado que seqüências peptídicas ligantes de heparina (motivos Cardin e Weintraub), ricas em resíduos de arginina (R) e lisina (K), perdiam a sua atividade antimicrobiana e capacidade de ligação à heparina, quando estes aminoácidos eram substituídos por resíduos de histidina (H). As atividades foram recuperadas quando zinco foi adicionado ao meio. Segundo os autores, quando K e R foram substituídos por H, os peptídeos perderam a sua capacidade de interagir com a membrana das bactérias e heparina, ambos carregados negativamente. A presença de zinco ofereceu cargas positivas aos peptídeos ricos em H e assim, a sua capacidade de ligação foi restituída. No mesmo trabalho, a histatina 5, antes inativa para esta bactéria, apresentou 100% de letalidade na concentração de 0,3 µM, quando zinco foi adicionado ao meio. Também foi demonstrado que atividade dos peptídeos derivados do domínio 5 do quininogênio humano foi potencializada na presença de zinco. Vale destacar que a concentração de zinco utilizada nestes experimentos não era tóxica para as bactérias (RYDENGARD *et al.*, 2006). Em um outro estudo, foi demonstrado que o polipeptídeo poli(arginil-histidina) perde a sua atividade contra *E. coli* em condições de alta força iônica. Entretanto, a capacidade antimicrobiana é restituída quando íons zinco e cobre são adicionados ao meio. Em condições de baixa força iônica, a presença de metais é indiferente (NISHIKAWA e OGAWA, 2004).

Alguns estudos realizados com proteínas humanas capazes de se ligar a metais mostraram que esta propriedade pode interferir nas concentrações de elementos-traço importantes para o metabolismo dos microorganismos. As atividades fungistática e bacteriostática da calprotectina, uma proteína presente em neutrófilos humanos, estão diretamente relacionadas à sua capacidade de ligar zinco e magnésio (LULLOFF *et al.*, 2004; CORBIN *et al.*, 2008). Segundo os autores, a ligação da calprotectina aos metais provoca uma deficiência

nutricional no meio e, assim, interfere no crescimento dos microorganismos, provavelmente devido ao mau funcionamento de proteínas e enzimas importantes para o metabolismo e que dependem de metais para a sua atividade. Este tipo de efeito bacteriostático também foi descrito para a proteína lactoferrina, cuja ação sobre *S. aureus* é uma função de sua capacidade quelante de ferro (AGUILA *et al.*, 2001). Não existem dados comprovados na literatura mostrando que PAMs ligantes de metais também possam apresentar atividade semelhante.

### 1.1.2 Espectro de atividade antimicrobiana

A maioria dos PAMs apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana. Os PAMs de humanos pertencentes às classes das  $\alpha$  e  $\beta$ -defensinas, catelicidinas e histatinas são ativos contra diferentes espécies microorganismos, incluindo bactérias resistentes a antibióticos de uso clínico (DE SMET e CONTRERAS, 2005). Podemos ainda citar a magainina de sapos, a cecropina de insetos, as defensinas de humanos e insetos e as protegrinas que atuam sobre bactérias, fungos e vírus (JENSSEN *et al.*, 2006). Além das moléculas descritas acima, podemos citar em maior detalhe o exemplo da gomesina, um PAM presente na hemolinfa da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*, isolado em nosso laboratório (SILVA *et al.*, 2000). A gomesina é ativa contra um grande número de patógenos, incluindo isolados clínicos de bactérias multi-resistentes aos antibióticos convencionais tais como *E. cloacae* resistente à vancomicina (VREC), *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) entre outros, com MICs entre 6,25 e 25  $\mu$ M (SOUZA *et al.*, 2004; MIRANDA *et al.*, 2008). Além das bactérias, a gomesina também é um potente antifúngico, com maioria das MICs < 6,25  $\mu$ M, sendo ativa contra diversos fungos de importância médico-hospitalar como, por exemplo, a levedura *Cryptococcus neoformans* (SILVA *et al.*, 2000; BARBOSA *et al.*, 2007). A gomesina apresenta também atividade antiparasitária contra o agente etiológico da doença de Chagas *Trypanosoma cruzi*, os agentes etiológicos da leishmaniose *Leishmania amazonensis* e *L. major* (SILVA

et al., 2000; BURGIERMAN, 2003) e *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária (MOREIRA *et al.*, 2007).

### 1.1.3 Potencial terapêutico

O crescente problema de resistência dos microorganismos aos antibióticos convencionais tem estimulado a busca por novas drogas para combate às infecções. Bactérias tais como *S. aureus* tornaram-se resistentes à penicilina e a sulfonamidas no início da década de 40 (DOMIN, 1998). Na década de 70 elas tornaram-se resistentes à metilina e mais recentemente à vancomicina (MIRANDA *et al.*, 2008). Estima-se que três milhões de pacientes irão adquirir infecções nosocomiais e destas, 50-60% envolverão bactérias resistentes a antibióticos (MIRANDA *et al.*, 2008). A busca por novos fármacos, portanto, torna-se emergencial e, nesse sentido, os PAMs representam uma classe promissora para o desenvolvimento de drogas alternativas. Estudos da relação-estrutura atividade destas moléculas têm permitido o desenho de moléculas com alta especificidade para patógenos, baixa toxicidade para células eucarióticas e estabilidade no soro (MIRANDA *et al.*, 2008). Os PAMs, além de sua capacidade antimicrobiana direta, podem também atuar como moduladores do sistema imune (MOOKHERJEE e HANCOCK, 2007). Outras aplicações incluiriam a utilização destas moléculas para impedir a colonização e o crescimento de microorganismos em materiais poliméricos sintéticos, tais como os cateteres intravenosos de uso médico. Já foi demonstrado que a magainina liga-se covalentemente a esferas poliméricas insolúveis e impede o crescimento bacteriano (ZASLOFF, 2002).

Alguns exemplos de PAMs em desenvolvimento para uso clínico são os derivados da magainina (MSI-78; Pexiganan), para tratamento de úlcera do pé de diabéticos; os derivados da protegrina (IB-367; Isegran), para tratamento de inflamações nas mucosas, infecções respiratórias em pacientes com fibrose cística e prevenção de pneumonia; e um derivado da indolicidina bovina, para tratamento de pacientes com hepatite C crônica, doenças dermatológicas e

prevenção de infecções de cateteres, entre outros (HANCOCK e SAHL, 2006; MIRANDA *et al.*, 2008).

## **1.2 Fatores antimicrobianos de *Acanthoscurria gomesiana* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Ao contrário dos PAMs de insetos, que têm sido amplamente estudados, poucas espécies de aracnídeos têm sido investigadas como fonte de PAMs. A maioria dos estudos disponíveis referem-se a PAMs isolados do veneno de algumas espécies de aracnídeos (MIRANDA *et al.*, 2008).

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando nos últimos anos na identificação e caracterização de moléculas antimicrobianas presentes em duas espécies de aracnídeos: a aranha caranguejeira *A. gomesiana* e o carrapato de boi *R. (B.) microplus*.

### **1.2.1 *A. gomesiana***

De *A. gomesiana* foram purificados do plasma o PAM theraphosinina e dos hemócitos os PAMs gomesina, acanthoscurrina e a acilpoliamina migalina (SILVA *et al.*, 2000; LORENZINI *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2007). A gomesina, como já mencionado, possui amplo espectro de atividade e uma série de estudos tem demonstrado como este PAM age contra os microorganismos. Estudos realizados com as bactérias *Micrococcus luteus* e *E. coli* mostraram que a gomesina a 10 µM foi letal para estes microorganismos após 5min de incubação (SILVA *et al.*, 2000). O mecanismo de ação antibacteriana da gomesina foi investigado por microscopia de fluorescência, utilizando-se corantes específicos para detecção de permeabilização de membrana. Observou-se que a gomesina (10 µM; 5min) causou forte permeabilização de membrana em bactérias *E. coli*, um resultado que comprovou ser este o mecanismo de ação antibacteriana do peptídeo (MIRANDA *et al.*, 2008).

Análises por ressonância magnética nuclear (RMN) avaliando a interação da gomesina com misturas de duodecil sulfato de sódio (SDS) indicaram que o peptídeo poderia permeabilizar a membrana através da formação de poros ou de um efeito semelhante a detergente, dependendo da concentração do peptídeo (FAZIO *et al.*, 2007).

Como mencionado anteriormente, o espectro antimicrobiano da gomesina também inclui atividades antifúngicas. Em *Neurospora crassa*, foi observado que a exposição do fungo ao PAM por 1min é suficiente para inibir totalmente a



germinação de esporos (SILVA *et al.*, 2000). Entretanto, foi com o fungo *C. neoformans* que estes estudos foram mais aprofundados. Conforme observado para *E. coli*, concentrações letais de gomesina também causaram forte permeabilização de membrana (BARBOSA *et al.*, 2007). A gomesina também causou redução no tamanho da cápsula do fungo, tornando-o mais susceptível a ingestão e morte por fagócitos de cérebro humano. Além da ação direta sobre o fungo, foi demonstrado que doses sub-letais de gomesina apresentaram um efeito sinérgico com fluconazol, um antifúngico de uso clínico. Supõe-se que baixas concentrações de gomesina causariam moderada permeabilização da membrana, facilitando assim a entrada do fluconazol na célula (BARBOSA *et al.*, 2007).

A membrana citoplasmática também é o principal alvo da gomesina em protozoários. Uma perda de integridade da membrana dos parasitas *Leishmania* spp e *T. cruzi* foi observada após 3h de incubação com gomesina (BURGIERMAN, 2003).

A migalina, um outro fator antimicrobiano de *A. gomesiana* que não é um PAM, mas uma acilpoliamina, também foi investigada quanto ao seu mecanismo de ação. Foi demonstrado que a sua atividade contra *E. coli* estava relacionada à sua capacidade de gerar peróxido de hidrogênio (PEREIRA *et al.*, 2007).

### **1.2.2 R. (B.) microplus**

Um peptídeo de 4.245 Da, pertencente à família das defensinas de insetos, foi purificado dos hemócitos do carrapato bovino *R. (B.) microplus* (FOGAÇA *et al.*, 2004). A expressão de PAMs da família das defensinas, como a defensina A, já havia sido identificada no intestino do carrapato *Ornithodoros moubata* (NAKAJIMA *et al.*, 2002). Foi demonstrado que a defensina A recombinante, causou forte alteração no potencial de membrana de *M. luteus* após 30-60min de incubação (NAKAJIMA *et al.*, 2003). Por microscopia eletrônica, foi verificado que este peptídeo provocou uma divisão celular incompleta das bactérias, o que, segundo os autores, seria um indicativo de que além da membrana, poderiam existir outros alvos de ação para a defensina A (NAKAJIMA *et al.*, 2003).

Também dos hemócitos, foi purificado um PAM de 7.103 Da, denominado ixodidina. A ixodidina possui 10 cisteínas em sua seqüência primária, com provável formação de cinco pontes de dissulfeto. Possui similaridade com inibidores de serino-proteinases tais como o inibidor de catepsina G/quimotripsina de *Apis mellifera*, dois inibidores de quimotripsina/elastase de *Ascaris* spp. e um inibidor de tripsina de *Bombina bombina*. Além da similaridade estrutural com esses inibidores, a ixodidina apresentou um efeito inibidor para elastase e quimotripsina. Em adição a esta atividade, foi demonstrado que a ixodidina é ativa contra a bactéria *M. luteus* (FOGAÇA *et al.*, 2006).

Do conteúdo intestinal do carrapato foi purificado um peptídeo de 3.205 Da, correspondente ao fragmento 33-61 da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina bovina (Hb 33-61) (FOGAÇA *et al.*, 1999). A forma amidada do peptídeo (Hb 33-61a) foi ativa contra fungos e bactérias Gram-positivas (FOGAÇA *et al.*, 1999). Hb 33-61a causou forte permeabilização de membrana em *M. luteus* (SFORCA *et al.*, 2005). Este PAM possui afinidade por membranas carregadas negativamente, devido à predominância de aminoácidos básicos. Estudos com micelas de SDS e análises por RMN mostraram que a  $\alpha$ -hélice C-terminal de Hb 33-61a fica embebida na micela e a sua porção N-terminal fica próxima à superfície, totalmente exposta. Ambas as estruturas contribuem para a desestabilização da micela. Segundo os autores, Hb 33-61a poderia agir de forma semelhante na membrana dos microorganismos (MACHADO *et al.*, 2007).

A microplusina é um PAM com massa molecular de 10.204 Da, isolado da hemolinfa livre de células e dos ovos de *B. microplus* (FOGAÇA *et al.*, 2004; ESTEVES *et al.*, 2008). Sua expressão ocorre nos hemócitos, corpo gorduroso e ovários do carrapato. A presença de microplusina foi detectada em ovários de fêmeas ingurgitadas do carrapato e, por microscopia de fluorescência, o peptídeo foi localizado na superfície celular e entre os grânulos de vitelo dos oócitos, além de estar presente nos tubos conectivos dos ovários. A presença de microplusina no trato reprodutivo de fêmeas do carrapato indica que este PAM pode ter uma função protetora para os embriões (ESTEVES *et al.*, 2008).

A seqüência primária da microplusina é formada por seis resíduos de cisteína com envolvimento na formação de três pontes de dissulfeto. Além das cisteínas, a microplusina apresenta sete resíduos de histidina, com localização predominante na sua porção C-terminal (FOGAÇA *et al.*, 2004). O seu pI estimado corresponde a 5,2, o que caracteriza a microplusina como um peptídeo ácido em pH fisiológico. A microplusina nativa foi ativa contra a bactéria *M. luteus* (MCI = 0,78 µM) (FOGAÇA *et al.*, 2004), além de reduzir drasticamente o número de esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum* nas glândulas salivares de *Aedes aegypti* (RODRIGUES, 2005).

A microplusina possui alta identidade (62 %) com a hebraína, um PAM isolado dos gânglios nervosos do carrapato *Amblyomma hebraeum*, com perfeita correspondência entre suas seis cisteínas (LAI *et al.*, 2004). Em adição às cisteínas, parte das histidinas também possuem correspondência entre estes dois peptídeos (FOGAÇA *et al.*, 2004; LAI *et al.*, 2004). Além da hebraína, a microplusina também possui identidade (cerca de 40%) com PAMs isolados da glândula salivar de outras espécies de carrapatos tais como *Ornithodoros coriaceus*, *O. parkeri* e *Argas monolakensis* (MANS *et al.*, 2008). Um PAM similar à microplusina também foi encontrado nas glândulas salivares do carrapato *A. americanum* (MULENGA *et al.*, 2007). Estes dados indicam a existência de uma nova família de PAMs.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados nos permitem concluir que a microplusina é um peptídeo quelante de cobre. A ausência de cobre no meio provocada pela microplusina, seja intra ou extracelular, impede o crescimento das bactérias. Até o momento, não temos conhecimento de nenhum peptídeo aniônico descrito na literatura cuja atividade está relacionada a uma ação de seqüestro de cobre. Efeito semelhante pode ocorrer com os outros microorganismos testados, incluindo *C. neoformans*. A alteração causada pela microplusina nos níveis de cobre pode interferir em enzimas importantes para a virulência e a sobrevivência de *C. neoformans*, como por exemplo, a lacase. Até o momento não podemos afirmar, diante dos dados obtidos, que a inibição da melanização é devido à alteração na atividade da lacase. Como discutido, estudos adicionais são necessários, possivelmente incluindo análises estruturais de complexos potencialmente formados envolvendo o peptídeo, íons cobre e a enzima purificada. A microplusina também afeta outro importante fator de virulência para *C. neoformans*, formação de cápsula de polissacarídeos, o que indica que, além de efeitos antimicrobianos diretos, o peptídeo poderia atuar em favor do hospedeiro modulando negativamente a expressão de determinantes de patogênese. Com relação à sua atividade *in vivo*, a diminuição da carga fúngica e inflamação nos pulmões indica que o peptídeo, em condições otimizadas, poderia ter aplicação no controle de infecções, agindo, inclusive, como modulador do sistema imune. Os efeitos bacteriostático e fungistático da microplusina são discrepantes do efeito letal que foi observado para esporozoítas de *P. gallinaceum* (RODRIGUES, 2005), o que pode ser um indicativo de que a microplusina age por diferentes vias dependendo do microorganismo. O fato de que a microplusina não foi citotóxica contra células de mamífero, aliado aos outros resultados apresentados, indica que a microplusina tem um grande potencial para uso como agente antimicrobiano. Moléculas que inibem a tomada de nutrientes pelos microorganismos parecem exibir um papel real em situações *in vivo*, como demonstrado para a calprotectina que inibe a proliferação de *S. aureus* em abscessos de camundongos, através da ligação ao zinco disponível

nestes sítios (CORBIN *et al.*, 2008). Além disso, drogas que funcionam como quelantes de cobre podem ser interessantes, como por exemplo, no tratamento da doença de Wilson, cujos pacientes apresentam níveis elevados de cobre no organismo (DAS e RAY, 2006).

Por fim, apesar de não ser o escopo deste trabalho, devemos destacar as possíveis funções da microplusina em seu organismo de origem, o carrapato bovino *R. (B.) microplus*. O fato da microplusina e de seus similares serem expressos em uma variedade de tecidos (hemócitos, ovários, gânglios nervosos e glândulas salivares) (FOGAÇA *et al.*, 2004; LAI *et al.*, 2004; MANS *et al.*, 2008) evidenciam o papel deste PAM na defesa contra infecção por patógenos. Em experimentos de imunolocalização, foi demonstrado que a microplusina está presente nos ovários, no tubo conector e nos ovócitos de fêmeas de *B. microplus*, o que sugere um papel determinante da microplusina na proteção do embrião (ESTEVES *et al.*, 2008). Em nosso laboratório, estudos conduzidos pela aluna de doutorado Eliane Esteves tem avaliado o papel da microplusina nas infecções, através do silenciamento do gene do peptídeo em células embrionárias do carrapato (BME26) infectadas com *Anaplasma marginale*.

O fato da microplusina quelar ferro pode sugerir um importante papel fisiológico no carrapato *B. microplus*. A digestão da hemoglobina (Hb) no intestino de artrópodes que se alimentam de sangue, como o carrapato bovino, resulta na produção de uma grande quantidade de heme, grupo prostético da Hb. O heme é uma molécula citotóxica devido à sua habilidade de gerar espécies reativas de oxigênio, a partir de reações envolvendo o ferro presente na molécula e peróxidos de hidrogênio orgânicos. Dessa forma, uma série de mecanismos foram desenvolvidos por estes animais para proteção contra os efeitos deletérios do heme (GRACA-SOUZA *et al.*, 2006). Neste contexto, a microplusina poderia atuar como um agente antioxidante ao seqüestrar ferro do heme, evitando assim a formação de espécies reativas altamente tóxicas, tais como o radical hidroxil ( $\text{OH}^\cdot$ ) através das reações de Fenton. Além disso, a microplusina poderia também atuar como um agente quelante de heme. Proteínas apresentando esta função já foram relatadas para o inseto triatomíneo

*Rhodnius prolixus* (proteína ligante de heme -RHBP) e para carrapatos (hemelipoproteína – HeLp) (GRACA-SOUZA *et al.*, 2006).

## REFERÊNCIAS\*

ABBAS, A. K. L.; ANDREW, H.; POBER, J, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. 469 p.

ADAMCZYK, M.; FISHPAUGH, J. R.; HEUSER, K. J. Preparation of succinimidyl and pentafluorophenyl active esters of 5- and 6-carboxyfluorescein. **Bioconjug. Chem.**, v.8, n.2, p.253-5. 1997.

AGUILA, A.; HERRERA, A. G.; MORRISON, D.; COSGROVE, B.; PEROJO, A.; MONTESINOS, I.; PEREZ, J.; SIERRA, G.; GEMMELL, C. G.; BROCK, J. H. Bacteriostatic activity of human lactoferrin against *Staphylococcus aureus* is a function of its iron-binding properties and is not influenced by antibiotic resistance. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.31, n.2, p.145-52. 2001.

BARBOSA, F. M.; DAFFRE, S.; MALDONADO, R. A.; MIRANDA, A.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L. Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anticryptococcal agent that acts in synergism with fluconazole. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.274, n.2, p.279-86. 2007.

BERGERON, R. J.; ELLIOTT, G. T.; KLINE, S. J.; RAMPHAL, R.S.T.; JAMES, L. 3RD. Bacteriostatic and fungostatic action of catecholamide iron chelators. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.24, n.5, p.725-30. 1983.

BOMAN, H. G.; AGERBERTH, B.; BOMAN, A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. **Infect. Immun.**, v.61, n.7, p.2978-84. 1993.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-54. 1976.

BREWER, D.; LAJOIE, G. Evaluation of the metal binding properties of the histidine-rich antimicrobial peptides histatin 3 and 5 by electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid. Commun. Mass Spectrom.**, v.14, n.19, p.1736-45. 2000.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat. Rev. Microbiol.**, v.3, n.3, p.238-50. 2005.

---

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BROGDEN, K. A.; DE LUCCA, A. J.; BLAND, J.; ELLIOTT, S. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.93, n.1, p.412-6. 1996.

BURGIERMAN, M.; MALDONADO, R.; ULIANA, S.; FÁZIO, M. A.; MIRANDA, M. T.; DAFFRE, S. Gomesin activity against *Leishmania sp* and *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 44, p. 110. 2002.

BULET, P.; STOCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein Pept. Lett.**, v.12, n.1, p.3-11. 2005.

BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunol. Rev.**, v.198, p.169-84. 2004.

CASADEVALL, A.; CLEARE, W.; FELDMESSER, M.; GLATMAN-FREEDMAN, A.; GOLDMAN, D. L.; KOZEL, T. R.; LENDVAI, N.; MUKHERJEE, J.; PIROFSKI, L. A.; RIVERA, J.; ROSAS, A. L.; SCHARFF, M. D.; VALADON, P.; WESTIN, K.; ZHONG, Z. Characterization of a murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, n.6, p.1437-46. 1998.

CHEN, Y. H.; YANG, J. T.; CHAU, K. H. Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. **Biochemistry**, v.13, n.16, p.3350-9. 1974.

CORBIN, B. D.; SEELEY, E. H.; RAAB, A.; FELDMANN, J.; MILLER, M. R.; TORRES, V. J.; ANDERSON, K. L.; DATTILO, B. M.; DUNMAN, P. M.; GERADS, R.; CAPRIOLI, R. M.; NACKEN, W.; CHAZIN, W. J.; SKAAR, E. P. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. **Science**, v.319, n.5865, p.962-5. 2008.

CUDIC, M.; OTVOS, L., JR. Intracellular targets of antibacterial peptides. **Curr. Drug Targets**, v.3, n.2, p.101-6. 2002.

EHRET-SABATIER, L.; LOEW, D.; GOYFFON, M.; FEHLBAUM, P.; HOFFMANN, J. A.; VAN DORSSELAER, A.; BULET, P. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. **J. Biol. Chem.**, v.271, n.47, p.29537-44. 1996.

DAS, S. K.; RAY, K. Wilson's disease: an update. **Nat. Clin. Pract. Neurol.**, v.2, n.9, p.482-93. 2006.

DE SMET, K.; CONTRERAS, R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. **Biotechnol. Lett.**, v.27, n.18, p.1337-47. 2005.



DOMIN, M. A. Highly virulent pathogens - a post antibiotic era? **Br. J. Theatre Nurs.**, v.8, n.2, p.14-8. 1998

ELLISON, R. T. 3<sup>rd</sup>; GIEHL, T. J. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. **J. Clin. Invest.**, v.88, n.4, p.1080-91. 1991.

ESTEVEES, E.; MALDONADO, R.; FOGAÇA, A. C.; SILVA, D. F.; MANSO, P. P. A.; PELAJO-MACHADO, M.; VALLE, D.; DAFFRE, D. Protective factors of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: following microplusin gene expression. **Vet. Parasitol.** 2008 (prelo)

FAHRNER, R. L.; DIECKMANN, T.; HARWIG, S. S.; LEHRER, R. I.; EISENBERG, D.; FEIGON, J. Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. **Chem. Biol.**, v.3, n.7, p.543-50. 1996.

FAZIO, M. A.; JOUVENSAL, L.; VOVELLE, F.; BULET, P.; MIRANDA, M. T.; DAFFRE, S.; MIRANDA, A. Biological and structural characterization of new linear gomesin analogues with improved therapeutic indices. **Biopolymers**, v.88, n.3, p.386-400. 2007.

FOGAÇA, A. C.; ALMEIDA, I. C.; EBERLIN, M. N.; TANAKA, A. S.; BULET, P.; DAFFRE, S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**, v.27, n.4, p.667-74. 2006.

FOGAÇA, A. C.; DA SILVA, P. I.; JR., MIRANDA, M. T.; BIANCHI, A. G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P. E.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.36, p.25330-4. 1999.

FOGAÇA, A. C.; LORENZINI, D. M.; KAKU, L. M.; ESTEVEES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Dev. Comp. Immunol.**, v.28, n.3, p.191-200. 2004.

FRIEDRICH, C. L.; ROZEK, A.; PATRZYKAT, A.; HANCOCK, R. E. Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.26, p.24015-22. 2001.

GOUMON, Y.; STRUB, J. M.; MONIATTE, M.; NULLANS, G.; POTEUR, L.; HUBERT, P.; VAN DORSSELAER, A.; AUNIS, D.; METZ-BOUTIGUE, M. H. The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. **Eur. J. Biochem.**, v.235, n.3, p.516-25. 1996.

GRACA-SOUZA, A. V.; MAYA-MONTEIRO, C.; PAIVA-SILVA, G. O.; BRAZ, G. R.; PAES, M. C.; SORGINE, M. H.; OLIVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, P. L. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.36, n.4, p.322-35. 2006.

GROGAN, J.; MCKNIGHT, C. J.; TROXLER, R. F.; OPPENHEIM, F. G. Zinc and copper bind to unique sites of histatin 5. **FEBS Lett.**, v.491, n.1-2, p.76-80. 2001.

GUSMAN, H.; LENDENMANN, U.; GROGAN, J.; TROXLER, R. F.; OPPENHEIM, F. G. Is salivary histatin 5 a metalloprotein? **Biochim. Biophys. Acta**, v.1545, n.1-2, p.86-95. 2001.

HANCOCK, R. E.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat. Biotechnol.**, v.24, n.12, p.1551-7. 2006.

HARWOOD, C. R.; ARCHIBALDI, R. Growth, maintenance and general techniques in molecular biology methods for *Bacillus*. 1990.

HEIDARI, M.; HAMIR, A.; CUTLIP, R. C.; BROGDEN, K. A. Antimicrobial anionic peptide binds in vivo to Mannheimia (Pasteurella) haemolytica attached to ovine alveolar epithelium. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.20, n.1, p.69-72. 2002.

HSU, C. H.; CHEN, C.; JOU, M. L.; LEE, A. Y.; LIN, Y. C.; YU, Y. P.; HUANG, W. T.; WU, S. H. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. **Nucleic Acids Res.**, v.33, n.13, p.4053-64. 2005.

IWANAGA, S.; LEE, B. L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v.38, n.2, p.128-50. 2005.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clin Microbiol. Rev.**, v.19, n.3, p.491-511. 2006.

JOHANSSON, J.; GUDMUNDSSON, G. H.; ROTTENBERG, M. E.; BERNDT, K. D.; AGERBERTH, B. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. **J. Biol. Chem.**, v.273, n.6, p.3718-24. 1998.

KAVANAGH, K.; DOWD, S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.56, n.3, p.285-9. 2004.

KRAGOL, G.; LOVAS, S.; VARADI, G.; CONDIE, B. A.; HOFFMANN, R.; OTVOS, L., JR. The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. **Biochemistry**, v.40, n.10, p.3016-26. 2001.

LAI, R.; LIU, H.; HUI LEE, W.; ZHANG, Y. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.295, n.4, p.796-9. 2002.

LAI, R.; TAKEUCHI, H.; LOMAS, L. O.; JONCZY, J.; RIGDEN, D. J.; REES, H. H. ; TURNER, P. C. A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. **FASEB J.**, v.18, n.12, p.1447-9. 2004.

LEVITZ, S. M.; DIBENEDETTO, D. J. Differential stimulation of murine resident peritoneal cells by selectively opsonized encapsulated and acapsular *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v.56, n.10, Oct, p.2544-51. 1988.

LIN, X.; NIELSEN, K.; PATEL, S.; HEITMAN, J. Impact of mating type, serotype, and ploidy on the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v.76, n.7, p.2923-38. 2008.

LIU, L.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; WILLIAMSON, P. R. Catecholamine oxidative products, but not melanin, are produced by *Cryptococcus neoformans* during neuropathogenesis in mice. **Infect. Immun.**, v.67, n.1, p.108-12. 1999.

LORENZINI, D. M.; DA SILVA, P. I. JR.; FOGAÇA, A. C.; BULET, P.; DAFFRE, S. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Dev. Comp. Immunol.**, v.27, n.9, p.781-91. 2003.

LULLOFF, S. J.; HAHN, B. L.; SOHNLE, P. G. Fungal susceptibility to zinc deprivation. **J. Lab. Clin. Med.**, v.144, n.4, p.208-14. 2004.

MACHADO, A.; SFORCA, M. L.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; PERTINHEZ, T. A.; SPISNI, A.; MIRANDA, M. T. Truncation of amidated fragment 33-61 of bovine alpha-hemoglobin: effects on the structure and anticandidal activity. **Biopolymers**, v.88, n.3, p.413-26. 2007.

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.**, v.9, n.1, p.34-9. 2001.

MANDARD, N.; BULET, P.; CAILLE, A.; DAFFRE, S.; VOVELLE, F. The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider. **Eur. J. Biochem.**, v.269, n.4, p.1190-8. 2002.

MANS, B. J.; ANDERSEN, J. F.; FRANCISCHETTI, I. M.; VALENZUELA, J. G.; SCHWAN, T. G.; PHAM, V. M.; GARFIELD, M. K.; HAMMER, C. H.; RIBEIRO, J. M. Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.38, n.1, p.42-58. 2008.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1462, n.1-2, p.1-10. 1999.

MARLEY, J.; LU, M.; BRACKEN, C. A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. **J. Biomol. NMR**, v.20, n.1, p.71-5. 2001.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.50, n.3, p.1021-33. 2006.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.50, n.3, Mar, p.1021-33. 2006.

MARTINEZ, L. R.; NTIAMOAH, P.; GACSER, A.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Voriconazole Inhibits Melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.51, n.12, p.4396-400. 2007.

MCFADDEN, D.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol.**, v.14, n.11, p.497-505. 2006.

MELINO, S.; RUFINI, S.; SETTE, M.; MORERO, R.; GROTTESI, A.; PACI, M.; PETRUZZELLI, R. Zn(2+) ions selectively induce antimicrobial salivary peptide histatin-5 to fuse negatively charged vesicles. Identification and characterization of a zinc-binding motif present in the functional domain. **Biochemistry**, v.38, n.30, p.9626-33. 1999.

MIRANDA, A.; MIRANDA, M. T. M.; JOUVENSAL, L.; VOVELLE, F.; BULET, P.; DAFFRE, S. Gomesin: a powerful antimicrobial peptide isolated from the Brazilian tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. In: KERALA, (Ed.). **Animal toxins: state of the art. Perspectives in Health and Biotechnology**. India: Research Signpost, 2008. In press.

MOOKHERJEE, N.; HANCOCK, R. E. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. **Cell Mol. Life Sci.**, v.64, n.7-8, p.922-33. 2007.

MOREIRA, C. K.; RODRIGUES, F. G.; GHOSH, A.; VAROTTI, F. D. E. P.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; JACOBS-LORENA, M.; MOREIRA, L. A. Effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of *Plasmodium* spp. **Exp. Parasitol.**, v.116, n.4, p.346-53. 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, p.55-63. 1983.

MULENGA, A.; KHUMTHONG, R.; BLANDON, M. A. Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma americanum* tick Lospins. **J. Exp. Biol.**, v.210, n.Pt 18, p.3188-98. 2007.

NAKAJIMA, Y.; ISHIBASHI, J.; YUKUHIRO, F.; ASAOKA, A.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1624, n.1-3, p.125-30. 2003.

NAKAJIMA, Y.; VAN DER GOES VAN NATERS-YASUI, A.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. **Insect Mol. Biol.**, v.11, n.6, p.611-8. 2002.

NIMRICHTER, L.; FRASES, S.; CINELLI, L. P.; VIANA, N. B.; NAKOUZI, A.; TRAVASSOS, L. R.; CASADEVALL, A.; RODRIGUES, M. L. Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. **Eukaryot. Cell**, v.6, n.8, p.1400-10. 2007.

NISHIKAWA, M.; OGAWA, K. Antimicrobial activity of a chelatable poly(arginyl-histidine) produced by the ergot fungus *Verticillium kibiense*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, n.1, p.229-35. 2004.

OLIVA, B.; O'NEILL, A.; WILSON, J. M.; O'HANLON, P. J.; CHOPRA, I. Antimicrobial properties and mode of action of the pyrroline holomycin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, n.2, p.532-9. 2001.

PARK, C. B.; 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.**, v.244, n.1, p.253-7. 1998.

PEREIRA, L. S.; SILVA, P. I., JR.; MIRANDA, M. T.; ALMEIDA, I. C.; NAOKI, H.; KONNO, K.; DAFFRE, S. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurria gomesiana*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.352, n.4, p.953-9. 2007.

RODRIGUES, D. G. **Efeito de peptídeos antimicrobianos em esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum***. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. **Microbes Infect.**, v.1, n.4, p.293-301. 1999.

RYDENGARD, V.; ANDERSSON NORDAHL, E.; SCHMIDTCHEN, A. Zinc potentiates the antibacterial effects of histidine-rich peptides against *Enterococcus faecalis*. **FEBS J.**, v.273, n.11, p.2399-406. 2006.

SCHITTEK, B.; HIPFEL, R.; SAUER, B.; BAUER, J.; KALBACHER, H.; STEVANOVIC, S.; SCHIRLE, M.; SCHROEDER, K.; BLIN, N.; MEIER, F.; RASSNER, G.; GARBE, C. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. **Nat. Immunol.**, v.2, n.12, p.1133-7. 2001.

SCOTT, M. G.; DAVIDSON, D. J.; GOLD, M. R.; BOWDISH, D.; HANCOCK, R. E. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. **J. Immunol.**, v.169, n.7, p.3883-91. 2002.

SELSTED, M. E.; HARWIG, S. S.; GANZ, T.; SCHILLING, J. W.; LEHRER, R. I. Primary structures of three human neutrophil defensins. **J. Clin. Invest.**, v.76, n.4, p.1436-9. 1985.

SFORCA, M. L.; MACHADO, A.; FIGUEREDO, R. C.; OYAMA, S. JR.; SILVA, F. D.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; MIRANDA, M. T.; SPISNI, A.; PERTINHEZ, T. A. The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the alpha-chain of bovine hemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*. **Biochemistry**, v.44, n.17, p.6440-51. 2005.

SILVA, P. I., JR.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.43, p.33464-70. 2000.

SOHNLE, P. G.; HAHN, B. L.; KARMARKAR, R. Effect of metals on *Candida albicans* growth in the presence of chemical chelators and human abscess fluid. **J. Lab. Clin. Med.**, v.137, n.4, p.284-9. 2001.

SOUZA, A.; BEVILACQUA, V.; PASTERNAK, J.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; MAGALHÃES, V. Strong in vitro activity of gomesin against multiresistant bacteria. In: ANNUAL INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 44., 2004. Washington, DC. F-1930 p.

STEFFEN, H.; RIEG, S.; WIEDEMANN, I.; KALBACHER, H.; DEEG, M.; SAHL, H. G.; PESCHEL, A.; GOTZ, F.; GARBE, C.; SCHITTEK, B. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.50, n.8, p.2608-20. 2006.

STERN, A. S.; JONES, B. N.; SHIVELY, J. E.; STEIN, S.; UNDEFRIEND, S. Two adrenal opioid polypeptides: proposed intermediates in the processing of proenkephalin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.78, n.3, p.1962-6. 1981.

SUGARMAN, B. Zinc and infection. **Rev. Infect. Dis.**, v.5, n.1, p.137-47. 1983.

ULVATNE, H.; SAMUELSEN, O.; HAUKLAND, H. H.; KRAMER, M.; VORLAND, L. H. Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in Escherichia coli and Bacillus subtilis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.237, n.2, p.377-84. 2004.

YANG, D.; BIRAGYN, A.; KWAK, L. W.; OPPENHEIM, J. J. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. **Trends Immunol.**, v.23, n.6, p.291-6. 2002.

YANG, D.; CHEN, Q.; CHERTOV, O.; OPPENHEIM, J. J. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. **J. Leukoc. Biol.**, v.68, n.1, p.9-14. 2000.

YASUOKA, A., *et al.* Influence of molecular sizes of Cryptococcus neoformans capsular polysaccharide on phagocytosis. **Microbiol. Immunol.**, v.38, n.11, p.851-6. 1994.

YOUNT, N. Y.; BAYER, A. S.; XIONG, Y. Q.; YEAMAN, M. R. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. **Biopolymers**, v.84, n.5, p.435-58. 2006.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v.415, n.6870, p.389-95. 2002.

ZEBEDEE, S. L., *et al.* Mouse-human immunoglobulin G1 chimeric antibodies with activities against Cryptococcus neoformans. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.38, n.7, Jul, p.1507-14. 1994.

ZHANG, L.; ROZEK, A.; HANCOCK, R. E. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.38, p.35714-22. 2001.

ZHU, X.; GIBBONS, J.; ZHANG, S.; WILLIAMSON, P. R. Copper-mediated reversal of defective laccase in a Deltavph1 avirulent mutant of Cryptococcus neoformans. **Mol. Microbiol.**, v.47, n.4, p.1007-14. 2003.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. Role of laccase in the biology and virulence of Cryptococcus neoformans. **FEMS Yeast Res.**, v.5, n.1, p.1-10. 2004.