ELISA CHAPARRO AGUIRRE

ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE INATA EM QUILÓPODES (SCOLOPENDROMORPHA, MYRIAPODA).

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

São Paulo
2017

ELISA CHAPARRO AGUIRRE

ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE INATA EM QUILÓPODES (SCOLOPENDROMORPHA, MYRIAPODA).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan / IPT, Para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.
Área de concentração: Biotecnologia
Orientador: Dr. Pedro Ismael da Silva Junior
Versão Original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Chaparro Aguirre, Elisa
ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE INATA EM QUILÓPODES (SCOLOPENDROMORPHA, MYRIAPODA). / Elisa Chaparro Aguirre; orientador Pedro Ismael da Silva Junior. -- São Paulo, 2017.
100 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Centípede . 2. Peptídeo Antimicrobiano. 3. Sistema Imune. 4. Transcriptoma. I. da Silva Junior, Pedro Ismael , orientador. II. Título.

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

---

Candidata: Elisa Chaparro Aguirre

Título da Tese: Estudo da resposta imune inata em quilópodes (Scolopendromorpha, Myriapoda).

Orientador: Dr. Pedro Ismael da Silva Junior

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Dr. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 15 de abril de 2013

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Estudo da resposta imune inata em quilópodes (*Scolopendromorpha, Myriapoda*)", protocolo nº. I-1043/13, sob a responsabilidade de Pedro Ismael da Silva Jr. e Elisa Chaparro Aguirre, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

À minha Família, que me ensinou a voar

Aos meus irmãos que me protegem desde o céu

E a todos aqueles que se dão ao luxo de se perguntar porque?

AGRADECIMENTOS

Obrigada sempre me pareceu uma palavra pequena quando o que você tem recebido das pessoas transborda a alma. Sei que se hoje estou concluindo esta nova etapa da minha vida, não é por mérito próprio, e sim, por que no caminho inúmeras pessoas me emprestaram sua força quando eu já não tinha, fizeram que eu não abandonasse a luta, me encheram de sorrisos, me escutaram quando precisava chover os sentimentos e fizeram destes anos uma das melhores experiências da minha vida.... Com tudo isso, como a palavra obrigada vai ser suficiente?

Pai, mãe, obrigada por serem meu exemplo. O colo no qual repousei mesmo na distância, pelo amor recebido em cada mensagem, porem principalmente, por terem me ensinado que o mundo é meu para ser conquistado.

Mery Mer, obrigada por ser o meu sorriso. Você sempre me inspira a ser melhor. Não poderia ter pedido uma melhor irmã... Também obrigada por sempre me ajudar a melhorar as imagens quando precisei hahaha.

Brawn, obrigada por me lembrar a importância de ter um coração gigante. A lembrança da sua gargalhada é meu maior tesouro. A sua força sempre me segura. Sinto infinitamente sua falta.

Pedro, quem diria que 11 anos depois ainda estaria aqui em São Paulo? Obrigada pela sua amizade, conselho, orientação, paciência, por ter-me acolhido no seu laboratório e ter feito não só possível meus sonhos virarem realidade, como também, tê-los adotados como próprios, a vida vai ser muito curta para te agradecer por tanto.

A Soraia, Thiago, Laura, Debora, Sandra, Katie, Andrea, Patty, Rosa, Bruna e todos os que tem passado pelo Química de Proteínas... Não é possível fazer ciência sozinho, e vocês me ensinaram isso, agradeço pela ajuda sempre que precisei, os NÃO abraços e até pelo barulho que encheu o lab sempre de boa energia e alegria. Obrigada!!

Ao Professor Antônio Miranda da UNIFESP obrigada por ter me acolhido quase como uma orientanda adotiva. Seus ensinamentos me ajudaram a crescer não só a ser uma melhor profissional como também uma melhor pessoa.

Ao Pessoal do laboratório de Biofísica da UNIFESP, obrigada pela ajuda quando não sabia o que estava fazendo, pelos almoços cheios de risadas e por ter-me recebido de braços abertos.

A Dra. Ursula Oliveira do laboratório de Genômica e Transcriptômica ao outro lado do corredor. Obrigada pela ajuda na obtenção do transcriptoma, por sempre estar disposta a responder minhas perguntas e por atualizar minhas versões de “sopas de letras”.

Ao Dr. Alessandro Giupponi, obrigada pelas inúmeras coletas, por sempre estar disposto a me ajudar, mesmo quando seu joelho doía. As minhas lembranças no Rio estão acompanhadas por um SINISTRO saindo da sua boca.

A todo o pessoal do CETICS e antigo CAT, por terem me acompanhado durante todo este processo de crescimento. Esta conquista não seria possível sem a sua acolhida e ajuda.

A Carol e Cae, meus pais brasileristicos. Acreditar nas amizades atemporais é possível para mim, por ter pessoas que nem vocês na minha vida. Vocês são minha família, e estão tatuados na minha alma. Obrigada por existir.

A minha avó, a mulher coração. Obrigada por me ensinar que o coração não tem limite para amar.

Tio Hugo e Tia Genoveva. Falam que os amigos são a família que escolhemos. Eu agradeço todos os dias por encontrar em vocês as duas coisas. Obrigada por tanto.

Paula... O que dizer? Obrigada por sempre me ajudar quando do desespero não consigo pensar direito, pela ajuda entendendo o PEAKS, porem principalmente por cada risada e pela sua amizade fantástica.

Rogerio, sua amizade é o mais improvável que deu certo nestes anos. Cada lembrança será guardada no coração, durante o mais infinito instante. Obrigada!

Rafa e Ju, obrigada pelos almoços e discussões que nutriram meu ser e pela amizade que surgiu para virar indispensáveis.

Mariana, obrigada por ser meu exemplo de caráter, realmente espero me parecer um pouco a você quando eu crescer.

A Ana Paula, Camilla, Vivian, Andrea, Cintia, Davi, Andre, Sara, Guilherme, por que mesmo depois de tanto tempo e distancia, ao pensar em vocês, sempre confirmo, como é bom estar entre irmãos.

Maita e Yeimy, obrigada por me aturarem, sei que não sempre foi fácil, e por estarem quando mais precisei de vocês. Cada uma de vocês com seu jeito virou uma parte de mim e me fez melhor pessoa. Obrigada!

E a todos que direta ou indiretamente, contribuíram na produção deste trabalho, e na minha caminhada... Obrigada.

Gracias Totales!

APOIO FINANCEIRO

A autora quer agradecer pelo apoio financeiro às diferentes instituições que permitiram o desenvolvimento deste trabalho

FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (2013/07467-1),
CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)
CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico) (472744/2012-7).

"Creio que, desde muito pequeno, minha infelicidade, e ao mesmo tempo minha felicidade, foi não aceitar as coisas com facilidade. Não me bastava que explicassem ou afirmassem algo. Para mim, ao contrário, em cada palavra ou objeto começava um itinerário misterioso que às vezes me esclarecia e às vezes chegava a me estilhaçar...

...Em suma, desde pequeno, minha relação com as palavras, com a escrita, não se diferencia de minha relação com o mundo no geral. Eu pareço ter nacido para não aceitar as coisas tal como me são dadas."

Julio Cortáza

RESUMO

Aguirre, EC. Estudo da Resposta imune inata em quilópodes (Scolopendoromorpha, Myriapoda). [Tese de Doutorado (Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Os peptídeos antimicrobianos são elementos fundamentais do Sistema Imune Inato (SII), já que eles ajudam a combater patógenos e fornecem informações sobre o SII e seu funcionamento. Os peptídeos também podem ser uma nova alternativa na luta contra doenças infecciosas. Dentro dos artrópodes, um grupo se destaca devido à falta de estudos dos seus mecanismos de defesa: Os miriápodes. Na medicina tradicional oriental e na medicina alternativa da Latino América, o extrato do corpo das centopeias é conhecido pelas suas diversas propriedades de cura. De fato, atualmente, as centopéias são o animal mais consumido nestas práticas. O objetivo deste trabalho é caracterizar os componentes e as reações que constituem o sistema imune inato dos Miriápodes da ordem Chilopoda. Para isto, analisamos o transcriptoma dos hemócitos de adultos não estimulados de *Scolopendra subspinipes subspinipes*. Também extraímos, purificamos por cromatografia liquida de alta eficiência e caracterizamos por espectrometria de massa os peptídeos antimicrobianos presentes na exúvia, no extrato total e na hemolinfa de *S. s. subspinipes* e *S. viridicornis*. Finalmente, foi comparado o extrato total de espécimenes adultos e jovens de *S. s. subspinipes* para avaliar a produção de moléculas bioativas em diferentes estágios do desenvolvimento do animal. Várias frações apresentando atividade antimicrobiana foram isoladas e purificadas do plasma e dos hemócitos. Além disso, dois peptídeos antimicrobianos novos foram caracterizados e sintetizados. Um deles, nomeado Pinipesina, isolado da exúvia de *S. s. subspinipes*, apresentou uma estrutura primaria com onze amino ácidos (VAEARQGSFSY), um peso molecular de 1214.3 Da e apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positiva e Gram negativa assim como também contra leveduras e fungos. O segundo peptídeo, nomeado Lacraina, foi isolado do estrato total de *S. viridicornis*, apresentou uma estrutura primaria de oito amino ácidos (RYPAVGYT), um peso molecular de 925,5 Da, e uma atividade antimicrobiana especifica contra bactérias Gram negativas. A análise preliminar do transcriptoma apresentou que os “contigs” relacionados ao SII foram transcritos com mais frequência moléculas com atividade regulatória (33,7%) e de reconhecimento (11,6%), e as relacionadas a cascata de coagulação (21,4%), indicando a importância desta resposta humoral nestes animais. A comparação entre espécimens adultos e jovens mostrou a presença de diferentes peptídeos em cada grupo, sugerindo uma diferenciação durante o crescimento do ISS nestes animais. Uma análise mais completa do transcriptoma e das moléculas bioativas é apresentado.

Palavras chave: Centípede. Peptídeo Antimicrobiano. Sistema Imune. Transcriptoma.

ABSTRACT

Aguirre, EC. Study of the innate immune response in Chilopoda (Scolopendoromorpha, Myriapoda). [PhD thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Bioactive peptides are significant e lements of the innate immune system (IIS). Not only because they help fight pathogens, but also provide information about the IIS and its functioning. Peptides also could be an enthralling new alternative of defense (in the fight) against infectious diseases. Within arthropods, a group draws especial attention because there is a lack of studies on their defense mechanisms: the Myriapods. In the Traditional Eastern and Latin American alternative Medicine, the centipedes body extract is known for its widespread healing properties. In fact, currently, the centipedes are the most consumed animals in these historic practices. This study aims to characterize the components and reactions that constitute the innate immune system of Myriapods from the Chilopoda Order. To accomplish this, we analyzed the hemocytes transcriptome from *Scolopendra subspinipes subspinipes* non-stimulated adults. We also extracted, purified, by high performance liquid chromatography, and characterized by mass spectrometry the bioactive peptides presents in the exuviae, in the body extract and in the hemolymph from *S. s. subspinipes* and *S. viridicornis*. Furthermore, we compare the body extract of adults and young specimens of *S. s. subspinipes* to evaluate the production of antimicrobial molecules in different stages of the animal development. Several fractions showing antimicrobial activity from the plasma and the hemocytes were isolated and purified. In addition, two new antimicrobial peptides were characterized and synthetized. One of them, named Pinipesin, was isolated from the exuviae of *S. s. subspinipes*, presented a primary structure of eleven amino acids (VAEARQGSFSY) a molecular weight of 1214.3 Da, displayed activity against the Gram-positive and Gram-negative bacteria, as against yeast. The second one, named Lacrain, isolated from the body extract of *S. viridicornis*, presented a primary structure of eight amino acids (RYPAVGYT) a molecular weight of 925.5 Da,. As well, presented specific activity against Gram-negative bacteria. The preliminary analysis from the transcriptome indicate that the "contigs" related to the IIS were transcribed more frequently, [molecules with regulatory (33,7%) and recognition (11,6%) activities, and those involved in the coagulation cascade (21,4%)] indicating the importance of this humoral response in these animals. The comparison between adults and the young specimens, show different peptides present in each group that was analyzed,. This suggests / suggesting a differentiation during the growth in the ISS of these animals. A more complete analysis of the transcriptome and the bioactive molecules will be furtherly presented.

Keywords: Centipede. Antimicrobial Peptides. Immune system. Transcriptome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Hemócitos presentes no sistema imune e suas funções. 23
Figura 2- Mecanismos da ação peptídica em interação com a membrana plasmática. 30
Figura 3- Centopeias a venda nos mercados de medicina tradicional. 32
Figura 4- Modelos Experimentais. A- *Scolopendra viridicornis* B- *Scolopendra subspinipes subspinipes Fonte: Guilherme Castoldi 2015.* 35
Figura 5- Extração de hemolinfa. 36
Figura 6- Cria e Adulto da espécie *Scolopendra subspinipes subspinipes* 40
Figura 7- Ecdise da *Scolopendra subspinipes subspinipes* 41
Figura 8- Ciclo para a Síntese Peptídica em fase solida. 45
Figura 9- Porcentagens de expressão dos transcritos dos hemócitos de *Scolopendra subspinipes*. 50
Figura 10- Porcentagens de expressão dos transcritos relacionados ao Sistema Imune da *Scolopendra subspinipes*. 52
Figura 12- Modelos Filogenéticos de Artrópodes: Paraxopoda e Mandibulata. 54
Figura 13- Perfil cromatográfico da eluição de 40% de ACN após primeira etapa de purificação da estração acida do estrato da ecdise de *Scolopendra subspinipes* 55
Figure 14- Cromatograma da segunda etapa de purificação por FR-CLAE da fração ativa da Ecdise de *S. s. subspinipes* 56
Figura 15- Estrutura de Pinipesina. 59
Figura 16- Alinhamento múltiplo da sequência de amino ácidos da Pinipesina com fragmentos de proteínas cuticulares de insetos. 60
Figura 17- Degradação em plasma da Pinipesina e PinipesinaAC. 61
Figura 18- Espectro obtido por Dicroísmo Circular (DC) da Pinipesina nativa e da PinipesinaAc. 64
Figura 19- Perfil cromatográfico da eluição de 40% de ACN após primeira etapa de purificação da extração acida do estrato total do corpo de *Scolopendra viridicornis* 66
Figure 20- Cromatograma da segunda etapa de purificação por FR-CLAE da fração 4 ativa do extrato total de *S.viridicornis* 67
Figura 21- Estrutura da Lacraina. 70
Figura 22- Atividade da Lacraina contra eritrócitos humanos. 73
Figura 23- Espectros do Dicroísmo Circular da Lacraina. 74
Figura 24- Comparação dos perfis cromatográficos entre Filhotes e Adultos. 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características estruturais das principais classes de peptídeos catiônicos. 29
Tabela 2- Estrutura Primária e outros parâmetros moleculares da Pinipesina. 58
Tabela 3- Atividade antimicrobiana da Pinipesina e da PinipesinaAc 63
Tabela 4- Estrutura Primária e outros parâmetros moleculares da Lacraina. 69
Tabela 5- Atividade antimicrobiana da Lacraina 72
Tabela 6- Atividade antimicrobiana apresentada pelas diferentes das frações isoladas do estrato acido do corpo dos Adultos e Filhotes da *S. s. subspinipes.* 76
Tabela 7- Estrutura primaria das fracções isoladas de filhotes e adultos com atividade..... 76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Micro Litros
µM	Micro Molar
Å	Ansgtrom
ACN	Acetonitrila
Ar	Árgon
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
cels	Células
CLAE	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CO_2	Dióxido de Carbono
Da	Dalton
DC	Dicroísmo Circular
DCM	Diclorometano
DIC	Dissociação Induzida por Colisão
DMF	Dimetilformina
DTT	Ditiotreitol
Ecol	Energias de colisão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
FPKM	Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped
FR-CLAE	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência de Fase Reversa
g	Gramos
GRAVY	Grand average of hydropathicity
GRs	Granulócitos
h	Hora
H_2O	Agua
HCl	Ácido Clorídrico
He	Helio
HoBT	1-HidroxiBenzoTriazol
Hz	Hertz
IMD	Via de Deficiência Imune
kDa	Kilo Daltons
L	Litro
LETA	Laboratorio especial de Toxinología Aplicada
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
mg	Mili gramas
Min	Min
mL	Mili Litros
mm	Mili metro
mM	Mili Molar

MTO	Medicina Tradicional Oriental
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanômetro
ºC	Graus Celsius
PAM	Peptídeo Antimicrobiano
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	Potato Dextrose Broth
pI	Ponto Isoelétrico
PLs	Plasmatócitos
RNA	Ácido Ribonucleico
RSEM	RNA-Seq by Expectation-Maximization
SII	Sistema Imune Inato
TFA	Ácido trifluoracético
TFE	Trifluoroetanol
TFMSA	Ácido Trifluorometasulfônico
TNF	Fator Necrótico Tumoral
UV	Ultravioleta
V	Volt

LISTA DE AMINOÁCIDOS

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

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO 19
1.1 Sistema Imune dos Invertebrados 21
1.1.1 Hemocitos 22
1.1.2 Fagocitose e Exocitose 24
1.1.3 Nodulação e Encapsulação 25
1.1.4 Cascata de Coagulação e de Fenoloxidase 25
1.1.5 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs) 26
1.2 Centopeias nas Medicinas Tradicionais 31
2 OBJETIVOS 34
2.1 Objetivos Específicos 34
3 MATERIAIS E MÉTODOS 35
3.1 Animais 35
3.2 Hemolinfa 36
3.2.1 Extração de Hemolinfa 36
3.2.2 Plasma 37
3.2.3 Hemocitos 37
3.3 Extratos 39
3.3.1 Extrato Total 39
3.3.2 Extrato da Ecdise 40
3.4 Purificação e caracterização das Moléculas Bioativas 41
3.4.1 Cromatografia Liquida de Alta Eficiência 41
3.4.2 Ensaios Antimicrobianos 42
3.4.3 Espectrometria de Massas 43
3.4.4 Sequenciamento dos Peptídeos Antimicrobianos 44
3.4.5 Bioinformatica: Análise das Moléculas Bioativas 44
3.5 Síntese Peptídica 45
3.5.1 Purificação dos peptídeos 46
3.5.2 Caracterização dos peptídeos 46
3.6 Bioensaios 47
3.6.1 Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida 47
3.6.2 Ensaio Hemolítico 47

3.6.3 Estabilidade no Plasma *48*
3.6.4 Curva de Morte Bacteriana *48*
3.7 Dicroísmo Circular 49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 50
4. 1 Analise do Transcriptoma 50
4.2 Moléculas Bioactivas 54
4.2.1 Pinipesina *54*
4.2.2 Lacraina *65*
4.2.3 Comparação da Produção de Moléculas Antimicrobianas entre Adultos e Juvenis *74*
5 CONCLUSÕES 78
REFERÊNCIAS 80
ANEXOS 90
A- Sequenciamento "De Novo" do peptídeo de 1214,3 Da Pinipesina. 90
B- Sequenciamento "De Novo" do peptídeo de 925.439 Da Lacraina. 91
C- Lacrain: the first antimicrobial peptide from the body extract of the Brazilian centipede *Scolopendra viridicornis.* International Journal of Antimicrobial Agents 48 (2016) 277-285 92

1 **INTRODUÇÃO**

Os artrópodes são um grupo muito bem sucedido, estimando-se que cheguem a alcançar mais de um milhão de espécies, distribuídas em todos os ecossistemas. Esta ampla distribuição é atribuída à sua grande capacidade adaptativa, reprodutiva e de defesa contra os predadores (Ruppert, Barnes, 2005). Estes animais surgiram no início do Cambriano sofrendo poucas alterações durante a evolução. No entanto, estão bem adaptados a ambientes com alta presença de microrganismos e parasitas patogênicos. Tais características sugerem que uma das razões do sucesso deste filo seja a capacidade de se defender contra esses patógenos, possuindo um eficiente sistema imunológico (Ruppert, Barnes, 2005; Basset, et al, 2012).

O sistema imunológico nos vertebrados está composto por dois tipos de respostas: a inata e a adaptativa. Nesta última, a presença de memória imunológica e de imunoglobulinas marca a principal diferença com a resposta de defesa dos invertebrados, nos quais a ausência destas moléculas, altamente especificas contra invasores, se traduz em uma resposta pouco especifica, similar à resposta inata dos vertebrados. (Cerenius, Soderhall, 2004).

Nos artrópodes, após o rompimento da cutícula e invasão de microrganismos, o sistema de defesa é ativado mediante fatores presentes na hemolinfa, que é composta por hemócitos (células) e pelo plasma (rico em proteínas, carboidratos, ácidos graxos, íons e hormônios). Assim, a resposta de defesa consiste em reações celulares (fagocitose, encapsulação e formação de nódulos) e reações humorais (cascatas de coagulação e melanização) além da produção de peptídeos antimicrobianos (PAMs) e de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (Harumi, 2007).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são elementos fundamentais do sistema imunológico que ajudam a combater as invasões dos microrganismos patogênicos. O conhecimento sobre estas moléculas pode fornecer informações sobre o sistema imune e o funcionamento do mesmo, assim como também pode auxiliar na busca de novas alternativas na luta contra doenças infecciosas.

O estudo, isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos em diferentes organismos têm aumentado nos últimos anos. Em artrópodes, foi possível conseguir avanços neste campo, principalmente no estudo de insetos (Bulet et al., 1999; Haine et al., 2008) e de aracnídeos como escorpiões (Ehret-Sabatier et al., 1996), aranhas (Silva Jr, 2000; Riciluca et al., 2012), carrapatos (Fogaça et al., 2006) e opiliões (Sayegh et al., 2011). Entretanto, dentre os

artrópodes, um grupo se destaca devido ao aumento no estudo dos seus peptídeos antimicrobianos, a pesar da falta de estudo dos seus mecanismos de defesa: Os Miriápodes.

Os miriápodes são artrópodes terrestres que apareceram no começo do Siluriano, há 420 milhões de anos. Estão divididos em quatro classes: Chilopoda (Centopéias), Diplopoda (Piolhos-de-cobra), Pauropoda e Symphyla (Ruppert, Barnes, 2005). Apresentam o corpo articulado em vários segmentos, não sendo possível observar uma diferenciação clara entre o abdome e o tórax. Atualmente estão descritas aproximadamente 17.000 espécies.

Entre os miriápodes, Diplopoda e Chilopoda são os grupos mais conhecidos. A classe Chilopoda está dividida em cinco ordens: Geophilomorpha, Scolopendromorpha, Lithobiomorpha, Scutigeromorpha e Craterostigmomorpha. Até o momento foram descritas aproximadamente 3.300 espécies de quilópodes, mas calcula-se que este número possa chegar a 4.300 espécies (Minelli et al., 2012). No Brasil, até o presente, já foram descritas aproximadamente 150 espécies (Amazonas Chagas Jr, comunicação pessoal).

As centopéias, tendem a apresentar atividade noturna e se encontram em lugares escuros e úmidos como: cavernas, embaixo de pedras, troncos caídos, folhiço, etc. Os quilópodes se caracterizam por ter um par de pernas por segmento, variando o número segundo as ordens. Se alimentam de pequenos artrópodes, nos quais, quando predados, sofrem injeção de veneno produzido nas glândulas localizadas no primeiro segmento de patas modificadas (as forcípulas).

As espécies da ordem Scolopendromorpha encontram-se frequentemente em regiões tropicais e subtropicais. Desta ordem foram descritas 250 espécies para a região Neotropical, das quais 75 espécies são brasileiras e 8 são encontradas no estado de São Paulo (Minelli et al., 2012).

Nesta ordem encontramos as *Scolopendras*, que vivem em ambientes com uma alta incidência de microrganismo patogênicos. Xylander (2009) trabalhou com este grupo e detectou na hemolinfa a presença de substâncias com atividade antibacteriana, mas não purificou nem caracterizou essas moléculas.

Nos últimos anos, vários peptídeos antimicrobianos tem sido caracterizados nos quilópodes. Em 2016 Chaparro e colaboradores, conseguiram caracterizar o primeiro peptídeo antimicrobiano isolado da extrato total da centopéia brasileira *Scolopendra viridicornis*: a Lacraina. Na *S. subspinipes mutilans (*uma espécie muito utilizada na medicina tradicional oriental) a Escolopendrina I (Wenhua et al., 2006) e a Escolopina I e II (Kanfu et al., 2010),

foram os primeiros peptídeos com propriedades antimicrobianas achados no veneno destes animais.

Até agora, poucos trabalhos sobre a defesa imunológica dos quilópodes foram realizados. Xilander no 2009 apresentou um trabalho com a descrição morfológica dos hemócitos e com uma pequena alusão sobre o papel destes numa resposta imunológica (Xilander, 2009).

Por tudo isto o estudo do sistema imune de espécies de quilópodes se fazem tão interessantes.

1.1 Sistema Imune dos Invertebrados

Nos invertebrados, a primeira linha de defesa contra a invasão de agentes patogênicos são as barreiras físicas como a cutícula. Após esta ser rompida, diferentes mecanismos são acionados com o intuito de reconhecer os agentes invasores, para assim poder neutralizá-los e eliminá-los.

A resposta imune do organismo é coordenada pela ação combinada de vários tipos de hemócitos, que fagocitarão ou encapsularão o agente invasor, e de diversos fatores humorais, que disparam cascatas proteolíticas para conseguir a coagulação ou melanização do microrganismo (Lamberty et al., 2001). Este mecanismo de defesa é conhecido como imunidade inata e é o menos derivado dos mecanismos, sendo conservado até a atualidade, estando presente em todos os animais (Hancock, Brown, Mookherjee, 2006).

No sistema imune dos invertebrados, a ausência de imunidade adaptativa é a principal diferença quando comparado com o sistema dos vertebrados. Isto significa, que não se observa uma resposta especifica contra os patógenos (atribuída às imunoglobulinas), nem memória imunológica (Hoffman, 2003). Este mecanismo é considerado evolutivamente como o mais derivado ao surgir pela primeira vez em peixes mandibulados há aproximadamente 450 milhões de anos (Hoffman, 2004).

No entanto, no subfilo hexápoda, tem sido descrito algum nível de especificidade na resposta imune após uma segunda exposição ao patógeno (Kurtz, Franz, 2003; Little, Hultmark, Read, 2005; Sadd, Schimdt-Hempel, 2006). Um exemplo disto é a função de moléculas da superfamília das Imunoglobulinas Gs que atuariam suprindo a ausência de moléculas que promovem a memória imunológica. (Watson et al., 2005). Isto mostra um maior desenvolvimento na resposta imune deste grupo de animais quando comparado com os outros subfilos dos Artrópodes.

Na aranha *Acanthoscurria rondoniae* (Theraphosidae), foi isolada a Rondonina, um peptídeo com atividade antifúngica que poderia representar uma nova via no sistema imune inato em invertebrados, onde moléculas grandes como a hemocianina, podem gerar fragmentos com atividade antimicrobiana, constituindo-se em uma primeira barreira após a ruptura da cutícula e invasão de microrganismos (Riciluca et al., 2012). Isto já foi observado também em camarões e em lagostins, de onde foram isolados peptídeos antimicrobianos do plasma derivados da hemocianina (Destoumieux –Garzon et al., 2001; Lee et al., 2003).

A resposta inata esta composta por diferentes reações (celulares e humorais) que ocorrem quase simultaneamente (Hoffman et al., 2004). A primeira resposta de defesa se baseia na migração de células de reconhecimento ao local onde ocorreu a invasão. Assim que o microrganismo e o tamanho da infecção são identificados, ocorre uma resposta imune celular, na qual os hemócitos (células presentes na hemolinfa) fagocitam, encapsulam ou formam nódulos para conter o agente invasor (Strand, Pech, 1995; Irving et al., 2005; Strand, 2008). Ocorre também a ativação das cascatas proteolíticas: a de profenoloxidase, (que resulta na melanização dos nódulos), e a da coagulação, (que contém a infecção mediante a formação de um coágulo). Ao mesmo tempo a produção rápida de PAMs, ajuda na aniquilação do patógeno. Estas duas últimas respostas são consideradas a imunidade humoral. (Hoffmann A., 1995; Blandin, Levashina, 2004; Cornelis, Soderhall, 2004; Theopold et al., 2004; Strand, 2008).

1.1.1 Hemocitos

Como já foi mencionado, a reposta celular da imunidade inata dos invertebrados, é principalmente mediada pelas células presentes na hemolinfa destes animais, conhecidos como hemocitos (Strand, 2008). Estas células são derivadas dos pró-hemócitos (células jovens que aparecem na parede do coração, nos estágios mais novos do desenvolvimento do organismo, dando origem aos hemócitos) os quais dependendo das suas características morfológicas, histoquímicas e funcionais vão se diferenciar em três tipos de células: os granulocitos, os plasmatocitos e os cianócitos (Strand, 2008).

A fagocitose e o encapsulamento, duas das funções imunológicas mais importantes, são controladas principalmente pelos hemócitos **(Figura 1).** Estas células também tem um papel

fundamental na regulação e reconhecimento de microrganismos invasores, assim como no fechamento da ruptura da cutícula para evitar a perda de hemolinfa (Lavine e Strand, 2002).

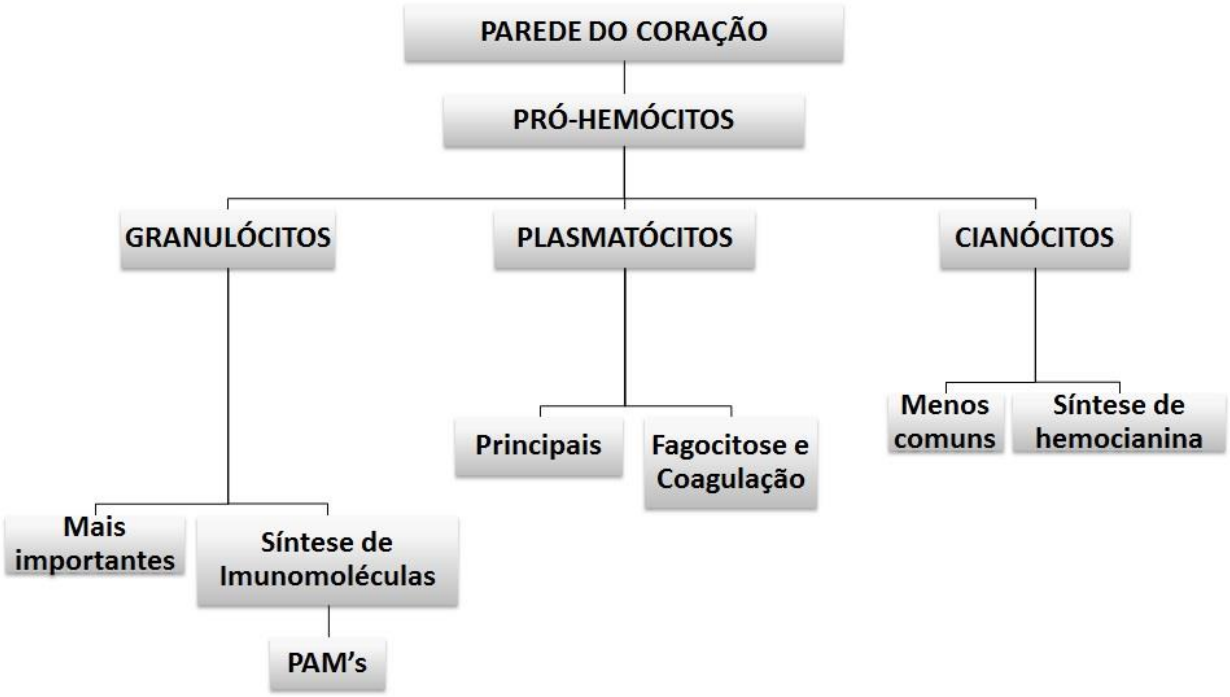


Figura 1- Hemócitos presentes no sistema imune e suas funções. *Adaptado de: Nentwing, 2013.*

Os granulócitos (GRs) são encontrados principalmente no citoplasma e constituem mais do 50% dos hemócitos achados na hemolinfa dos artrópodes. Possuem os fatores que induzem a coagulação e sua função nos invertebrados seria equivalente a dos linfócitos B e T nos vertebrados (Gupta, 1986; Fukuzawa et al., 2008).

O outro tipo celular de grande importância no sistema imune dos artrópodes são os plasmócitos (PLs), que teriam o mesmo papel das células natural killers nos vertebrados. Estas células encontram-se em grandes quantidades na hemolinfa dos artrópodes (Gupta, 1986).

Na aranha *Acanthoscurria gomesiana* (Theraphosidae) foi demonstrado em experimentos *in vivo* e *in vitro* que os hemócitos são atraídos quimicamente por LPS ou leveduras, provocando a degranulação das células (Fukuzawa et al., 2008).

Os invertebrados apresentam então, uma grande variedade de moléculas capazes de lisar os microrganismos, unir suas paredes celulares aglutinando-os e, assim, favorecer a fagocitose por meio de moléculas líticas e antimicrobianas (Abbas, Lichtman, 2005). Estas moléculas podem ser produzidas de duas maneiras diferentes: constitutivamente (como nos aracnídeos) ou após estimulo (como nos insetos).

Em miriápodes, um estudo realizado por Xilander em 1990 com os diplópodes *Rhapidostreptus virgator* e *Chicobolus* sp. e com os quilopódes *Lithobius forficatus* e *Scolopendra* sp. mostrou que quando comparadas as duas classes, os quilópodes apresentam maior dependência da resposta imune celular enquanto os diplópodes apresentaram uma menor presença de hemócitos na hemolinfa (Xilander, Nevermann, 1990). Ao comparar a resposta imune dos miriápodes com a dos insetos, utilizando *Manduca sexta* (Lepidoptera) como modelo animal, foi observado uma menor capacidade de coagulação, de substâncias antimicrobianas menos eficientes e processo de encapsulação lento por parte dos miriápodes (Xilander, 1990). Também foi observada a presença de moléculas bioativas após o animal ser desafiado por um microrganismo, como também sem ter recebido o dito estímulo. Estas moléculas são diferentes entre si (Chaparro, 2011).

1.1.2 Fagocitose e Exocitose

A fagocitose é uma resposta celular altamente conservada durante a evolução, ocorrendo em muitos protozoários e em todos os metazoários e é a primeira resposta dos hemócitos contra pequenos invasores (Jiravanichpaisal et al., 2006).

Após o reconhecimento do microrganismo pelas moléculas do sistema de defesa, as diferentes reações intracelulares são ativadas, para posterior eliminação do organismo invasor.

A fagocitose, nos invertebrados, é iniciada quando uma molécula de reconhecimento se liga a um receptor da célula fagocítica, levando a formação do fagossomo e na ingestão do microrganismo invasor, através de uma via dependente da polimerização de actina. Uma vez no fagossomo, o microrganismo é eliminado através de moléculas tais como os PAMs e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Lavine, Strand, 2002).

Os hemócitos também podem combater os invasores através da secreção dos PAMs. A presença de LPS vai ativar um receptor ligado à proteína G. Após este ser ativado, a fosfolipase C

produz 1,4,5 –Inositol trifosfato (IP_3) e diaciglicerol, gerando o aumento do cálcio intracelular levando a exocitose dos grânulos (Solon et al., 1996). Nos limulídeos, foi observado que tanto os PAMs como os componentes da cascata de coagulação são secretados via exocitose (Iwanaga, Lee, 2005).

1.1.3 Nodulação e Encapsulação

A nodulação e a encapsulação fazem parte da resposta celular encarregada de defender o animal contra patógenos muito grandes e que não podem ser contidos na fagocitose.

A nodulação refere-se a agregados de hemócitos, os quais podem capturar um grande número de bactérias extracelularmente. Os nódulos podem se aderir aos tecidos e eventualmente, podem ser encapsulados e posteriormente eliminados no momento da ecdise (Jiravanichpaisal et al., 2006).

A encapsulação se dá quando é necessária uma ligação de hemócitos para conter invasores de grande tamanho, como parasitas ou nematoides. Diferente da fagocitose, a encapsulação resulta na formação de uma cápsula de várias camadas de hemócitos ao redor do invasor. Este processo ocorre simultaneamente com a ativação da cascata de fenoloxidase, o que vai resultar no escurecimento da cápsula devido à melanização, onde o parasita é morto por hipóxia (Nappi et al., 2005).

1.1.4 Cascata de Coagulação e de Fenoloxidase

As cascatas de coagulação e de fenolixidase, são uma parte fundamental da imunidade dos invertebrados, onde as respostas humorais e celulares se sobrepõem envolvendo uma combinação de fatores celulares e proteolíticos (Theopold et al., 2004).

Quando o sistema imune dos artrópodes é ativado, os hemócitos se organizam formando cápsulas ou nódulos ao redor do microrganismo invasor, após isto duas respostas humorais podem ser ativadas: a cascata de Fenoloxidase ou de coagulação, para que os nódulos sejam menalizados/coagulados e eliminados por hipóxia ou por ação de sustâncias tóxicas liberadas (Cerenius, Soderhall, 1998, 2004).

A cascata da coagulação e da Fenoloxidase são ativadas pelo contato de proteínas de membrana liberadas no plasma, como lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias Gram-negativas ou β-1,3-glucano das leveduras. O resultado final destas reações é a produção da coagulina a partir de coagulogênio, na cascata da coagulação (Ulrich et al., 2004), e de melanina originada de quinonas, na cascata da fenoloxidase (Cerenius, Soderhall, 2004). Ambas têm papel fundamental no aprisionamento dos microrganismos nos nódulos e evitam a perda de hemolinfa após rompimento da cutícula.

1.1.5 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

As moléculas com atividade antimicrobiana nos artrópodes podem ser produzidas constitutivamente ou após a indução por infecção, rompimento da cutícula ou estímulo inflamatório (Jenssen; Hamill; Hancock, 2006).

Dois dos primeiros peptídeos antimicrobianos caracterizados em quelicerados foram isolados dos hemócitos do limulideo não estimulado *Tachypleus tridentatus.* Estes peptídeos conhecidos como Taquiplesina e Poliphemusina apresentam atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, assim como contra fungos (Miyata et al., 1989).

Em escorpiões da espécie *Androctonus australis* foram encontrados dois PAMs na hemolinfa de animais não desafiados: a butinina e a androctonina. O primeiro apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas enquanto o segundo possui atividade contra bactérias e fungos (Ehret-Sabatier et al., 1996).

A gomesina é um peptídeo antimicrobiano constitutivamente expresso nos hemócitos da aranha *Acanthoscurria gomesiana* (Silva jr; Daffre; Bua, 2000), sendo liberado no lugar da infecção após o animal ser desafiado (Fukuzawa et al., 2008). Nesta mesma espécie foi separada outra molécula com atividade contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*: a Migalina, uma acilpoliamina que também está presente nos hemócitos desta aranha, mesmo sem um estímulo prévio (Pereira et al., 2007).

Da hemolinfa do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* não estimulado, foram isolados e caracterizados dois PAMs: a microplusina (no plasma) e uma defensina presente na hemolinfa (Fogaça et al., 2004).

Nesse contexto, acredita-se que os PAMs e as moléculas bioativas nos quelicerados são constitutivamente expressos na hemolinfa, sendo liberados no plasma após o animal ser desafiado por microrganismos. Charlet e colaboradores em 1996 sugeriram que a presença de moléculas antimicrobianas expressas constitutivamente nos invertebrados é um mecanismo imune primitivo quando comparado com o sistema de indução de produção de PAMs presentes nos invertebrados superiores. Considerando que a origem dos insetos há 390 milhões de anos foi posterior a dos quelicerados há 445 milhões de anos (Ruppert, Barnes, 2005), a hipótese de que o sistema imune dos insetos é mais derivado do que dos quelicerados torna-se plausível, uma vez que neles encontramos vários organismos que necessitam de um estímulo para produzir as substâncias antimicrobianas. Estas desaparecem aproximadamente três semanas depois do desafio e são produzidas novamente ao receber um novo estímulo (Bulet et al., 1999).

O principal órgão produtor de PAMs nos insetos holometábolos é o corpo gorduroso e sua síntese é induzida poucas h após a infecção, sendo liberadas posteriormente na hemolinfa (Lamberty et al., 2001).

No entanto, nos hemimetábolos, a produção destas moléculas é realizada nos hemócitos (Bulet, Stocklin, 2005). Em estudos com térmitas, *Pseudacanthotermes spiniger* (Isoptera), foram encontrados PAMs constitutivamente expressos (Lamberty et al., 2001), sugerindo uma resposta imune similar a observada em quelicerados, sendo esta menos derivada do que a presente em insetos holometábolos.

A informação acerca do sistema imune em insetos é baseada principalmente nos estudos realizados na mosca *Drosophila melanogaster*. Após a injúria, a produção de PAMs e moléculas bioativas pode ser induzida por dois mecanismos. O primeiro é mediado pelo receptor transmembranal *Toll* que ativa fatores de transcrição para a síntese de peptídeos ativos contra microrganismos, após o reconhecimento de componentes da parede bacteriana de bactérias Gram-positivas ou da membrana plasmática de leveduras (Ferrandon et al., 2007). O segundo é a via de deficiência imune (IMD) desencadeada pelas proteínas presentes na membrana das bactérias Gram-negativas. Os produtos deste mecanismo são homólogos ou altamente similares

aos precursores da cascata da sinalização do receptor do fator necrótico tumoral (TNF) em mamíferos (Hoffman, 2004).

Em miriápodes já foi descrita a presença de substâncias antimicrobianas que estão constitutivamente expressas na hemolinfa como também moléculas específicas que são induzidas após infecção ou injúria (Xilander, 1990, 2009). Estas últimas chegam a sua máxima atividade de 3 a 5 dias após a injúria, o que é considerado lento quando comparado com insetos, que alcançam o seu máximo entre 6 a 24 h depois do estímulo.

Nas centopeias, o veneno e o pó do extrato total têm sido amplamente estudados resultando na caracterização de diferentes peptídeos bioativos (You et al., 2004; Kanfu et al., 2010; Kong et al., 2013).

Os peptídeos antimicrobianos de origem animal possuem características estruturais diversas. Na sua maioria são peptídeos catiônicos (com elevado pI), compostos por 9 a 100 resíduos de aminoácidos, não tendo tamanho superior a 10 kDa. São de natureza anfipática, podendo ser lineares ou cíclicos (De Simone et al., 2002; Brogden, 2005). São classificados em cinco grupos principais dependendo da sua estrutura primária e secundária **(Tabela 1)**. Apesar do fato da maioria dos PAMs serem catiônicos, alguns são aniônicos, como a microplusina, um peptídeo com atividade contra a bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* (Fogaça et al., 2004).

Tabela 1- Características estruturais das principais classes de peptídeos catiônicos.
Fonte: De Simone et al., 2002.

Classe	Estrutura	Fonte
Lineares com estrutura β	2-3 β o 2-3 enlaces Cys (defensinas, thioninas, protegrinas, polifemusinas).	Plantas, insetos, crustáceos, serpentes, células de mamíferos (Neutrófilos, plaquetas, macrófagos, células de Paneth), laringe, traquéia e intestino.
Lineares com hélice α	Hélices anfipáticas freqüentemente com torção no meio.	Insetos, anfíbios, crustáceos, mamíferos e bactérias.
Lineares com ombros	Hélice de Poli-Pro Tipo II	Neutrófilos bovinos e insetos.
Cíclicos com Loops	Estrutura cíclica covalente que pode apresentar uma ou mais pontes de SH.	Neutrófilos bovinos, bactérias e serpentes.
Derivados de grandes peptídeos com função desconhecida	Complexa e apresenta ponte de SH.	Plantas

O mecanismo de ação dos peptídeos se dá através do aumento da permeabilidade da membrana plasmática, o que provocaria o extravasamento do conteúdo celular ao interferir no empacotamento dos fosfolipídios, inviabilizando a sobrevivência do animal (Andreu e Ribas, 1998).

Os peptídeos são primeiramente atraídos para a superfície da membrana do microrganismo por meio das interações eletrostáticas entre as cargas negativas da superfície da membrana do patógeno e as positivas dos peptídeos (Huang, 2000). Após a ligação do peptídeo na membrana, o aumento na permeabilidade da membrana plasmática é explicado por três modos de ação diferentes **(Figura 2)** pelos quais os peptídeos interferem no arranjo fosfolipídico da membrana (Brogden, 2005):

• Modelo Carpete. A desestrutuação da membrana plasmática ocorre quando os peptídeos ficam orientados horizontalmente cobrindo a bicamada lipídica formando sobre esta um “tapete” que pode levar à formação de micelas.

• Modelo Barril-estável. O poro é formado somente pelos peptídeos, os quais alinham sua fração hidrofóbica com as caudas dos fosfolipídios da membrana, deixando no interior da membrana a porção hidrofílica.

• Modelo do Poro Toroidal. O lúmen do poro é formado pela cabeça polar dos fosfolipídios (os quais foram induzidos para adotar uma curvatura mais positiva) e pela porção hidrofílica do peptídeo. A porção hidrofóbica forma o “interior” do poro.

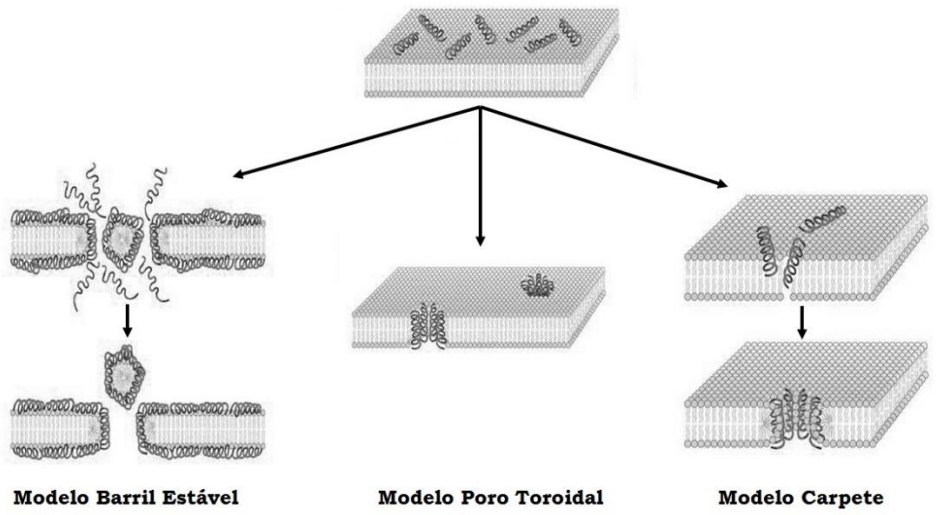


Figura 2- Mecanismos da ação peptídica em interação com a membrana plasmática.
Após o peptídeo entrar se ligar na membrana plasmática, eles podem desnaturar a membrana de três maneiras diferentes: modelo barril estável (esquerda), modelo poro Toroidal (centro) ou modelo carpete (direita). *Adaptado de: Brogden, 2005.*

Até o momento, já foram descritos peptídeos com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos (leveduras e filamentosos), vírus e parasitas. Outro elemento importante com relação à atividade dos PAMs é que os mesmos podem ser divididos em citotóxicos (atividade contra hemáceas de mamíferos) e não citotóxicos (Shai, 2002).

A ação dos peptídeos pode se apresentar em diferentes compartimentos celulares e, por isso, esses compostos são considerados fundamentais nos estudos para o desenvolvimento de drogas importantes contra patógenos resistentes aos antibióticos que existem atualmente.

1.2 Centopeias nas Medicinas Tradicionais

Na China e Coréia é comum encontrar pessoas que praticam a "medicina científica" e a Medicina Tradicional Oriental (MTO). Existem clínicas com doutores especializados em medicina tradicional, prescrevendo medicamentos baseados em diferentes plantas, artrópodes e vertebrados (Pemberton, 1999).

Esta medicina tem sido utilizada cada vez mais no ocidente. Estudos mostram que nos Estados Unidos mais de 40% da população utiliza ou esteve em contato em algum momento da sua vida com a MTO (Kesler et al., 2001) e acredita-se que este dado tende a aumentar nos próximos anos. Esta tradição apresenta dois benefícios: o primeiro é que possui milhares de anos de experimentação, pois se conhecem registros de 1610 a.C. (Pemberton, 1999); o segundo é que estas práticas ainda estão vigentes, bem como sua utilização está crescendo por mostrarem bons resultados.

Dentre os medicamentos baseados em artrópodes da MTO, os prescritos com maior frequência provêm de quilópodes (centopéias) **(Figura 3),** como por exemplo, de *Scolopendra subspinipes mutilans*, da qual se utiliza o pó obtido do corpo seco para o tratamento de dores reumáticas, gripes, convulsões e prevenção do câncer. A sua capacidade de absorção de água pode prevenir e tratar a tuberculose fungo-bacteriana e a micoses de pele (Pemberton, 1999; Yoon 2006).

Figura 3- Centopeias a venda nos mercados de medicina tradicional.
A. Medicamento para a tosse, feitas com centopeias secas vendidas na Tailandia. *Fonte: Ingrid Booz Morejohn, 2013.* B e C. Venda de Centopeias e outros invertebrados no mercado de agricultores em Singapura. *Fonte: Xing Fu, 2017.*

Na prática popular, a escolopendra viva é fervida em água, colocada para secar ao sol e depois moída sem a cabeça e o último segmento. O pó obtido é utilizado para fazer chá ou óleos para tratar as diferentes doenças supracitadas.

Devido à grande importância destes animais na MTO, a análise das moléculas do corpo das lacraias tem levado ao isolamento de várias moléculas com propriedades bioativas como a centipedina (Kim et al., 1998), uma molécula com atividade antibiótica; a escolonase, uma serino protease de 25 kDa com atividade fibrinolítica (You et al., 2004), e finalmente o jineol, uma quinolina alcalóide com atividade antioxidante e altamente citotóxica contra células tumorais (Moon et al., 1996; Yoon et al., 2006).

Na medicina tradicional oriental, acredita-se que vários quilópodes têm a propriedade de reduzir os sintomas da degeneração do sistema nervoso central, como por exemplo, a perda da memória. Ren et al. (2006) trabalharam com o efeito da *Scolopendra subspinipes mutilans* na

doença de Alzheimer, obtendo uma melhora dos pacientes com um aumento na função cognitiva. Eles atribuíram este resultado aos ácidos graxos achados no corpo da lacraia, os quais apresentaram atividade quelante que resulta numa inibição da acetilcolinesterase, enzima encarregada da degradação da acetilcolina.

Um dos maiores problemas da utilização dos medicamentos da MTO foi descrito por Yuen et al. (2006). Eles concluíram que um dos principais efeitos colaterais destes medicamentos (incluindo o pó de escolopendra) é a alta taxa de hepatotoxicidade e a perda da função do fígado. Isto foi observado em pacientes submetidos a este tratamento por cerca de seis meses a um ano, resultando em alguns casos que necessitaram de transplante de fígado e/ou outros que vieram ao óbito. Por esta razão a análise dos princípios ativos e o mecanismo de ação destes medicamentos tornam-se fundamental.

Dentro desse contexto, com o objetivo de entender melhor o sistema de defesa dos miriápodes contra os patógenos, o presente trabalho se propôs a isolar e caracterizar moléculas com atividade antibiótica presentes na hemolinfa e no extrato total dos quilópodes *Scolopendra viridicornis* e *Scolopendra subpinipes subspinipes*, bem como estudar o transcriptoma dos hemócitos para conhecer mais do sistema imune destes animais.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é estudar e caraterizar a resposta imune inata nos quilopodes através do estudo do peptidoma e do transcriptoma destes animais, utilizando como modelos biológicos as especies *Scolopendra subspinipes subspinipes* e *Scolopendra viridicornis* (Scolopendromorpha, Chilopoda, Myriapoda).

2.1 Objetivos Específicos

- Comparar a produção de moléculas bioativas em diferentes estágios de desenvolvimento do animal (filhote e adultos).
- Isolar moléculas com atividade antimicrobiana, tanto da hemolinfa como do estrato total, durante processos de estresse biológico para o animal.
- Caracterizar as moléculas que tenham apresentado atividade antimicrobiana.
- Analisar o transcriptoma da expressão gênica dos hemócitos dos quilópodes utilizando como modelo biológico a espécie *S. s. subspinipes*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados exemplares de lacraias das espécies *Scolopendra viridicornis* e *Scolopendra subspinipes subspinipes* **(Figura 4)**, de ambos os sexos e em diferentes estágios de desenvolvimento, coletados no município de Peixe (Tocantins/TO, Brasil) e no Campus da UFRJ, Ilha do Fundão (Rio de Janeiro/RJ, Brasil) respectivamente sob licença do IBAMA número 11024-3/2008.

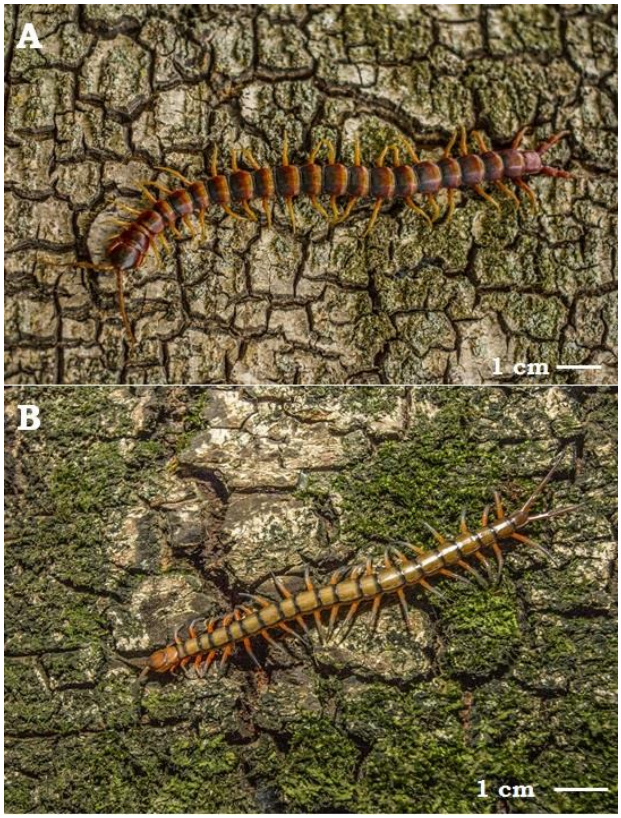


Figura 4- Modelos Experimentais. A- *Scolopendra viridicornis* B- *Scolopendra subspinipes subspinipes*
Fonte: Guilherme Castoldi 2015.

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan (São Paulo) em condições ótimas monitoradas e de extrema higiene durante pelo menos sete dias antes da realização de qualquer experimento. Sendo alimentadas com pequenos artrópodes.

3.2 Hemolinfa

3.2.1 Extração de Hemolinfa

Para a coleta do material, os animais foram previamente anestesiados com CO_2. A extração da hemolinfa foi obtida através de punção do vaso dorsal, na membrana localizada entre o sétimo e o oitavo segmento do corpo **(Figura 5)** com a utilização de seringas apirogênicas (Chaparro, 2011). Para evitar a degranulação dos hemócitos e conseqüentemente a coagulação da hemolinfa, a coleta realizou-se na presença de tampão de citrato de sódio (NaCl 0,45 M; glicose 0,1 M; citrato trissódico 30 mM; ácido cítrico 26 mM; EDTA 10 mM) como anticoagulante em pH 4,6 (2 volumes de hemolinfa: 1 volume de tampão, Söderhall e Smith, 1983).

Figura 5- Extração de hemolinfa. Coleta de hemolinfa por punção do vaso dorsal, na membrana entre o sétimo e o oitavo segmento do corpo. *Fonte: Raphael Sayegh 2010.*

A hemolinfa foi centrifugada a 800 xg durante 10 min a 4 °C. O plasma (sobrenadante) foi concentrado em uma centrífuga a vácuo (Savant Instruments, EUA). Os hemócitos (pellet) foram submetidos à lavagem em tampão citrato de sódio e centrifugados a 800 xg durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado.

3.2.2 Plasma

O plasma das lacraias foi ressuspenso em água Milli-Q acidificada (ácido trifluoroacético [TFA] 0,05%). A solução foi mantida em banho de gelo durante 30 min, sob agitação constante. O sobrenadante, obtido por centrifugação a 16,000 xg por 30 min a 4 °C (Centrifugue 5804R Eppendorf Instruments, Inc), foi aplicado em um cartucho Sep-Pak C18 (Water Associates) equilibrado com água acidificada. Três eluições foram realizadas utilizando-se diferentes concentrações de acetonitrila (5, 40 e 80%) em água acidificada.

Após a eluição, as frações obtidas foram concentradas em centrífuga a vácuo, ressuspesas em água Milli-Q acidificada (TFA 0,05%), e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.3 Hemocitos

Os hemócitos das lacraias foram concentrados em uma centrífuga a vácuo e, após este processo, macerados em presença de ácido acético 2 M. A solução foi mantida em banho de gelo durante 30 min, com agitação constante. O sobrenadante, obtido por centrifugação a 16,000 xg por 30 min a 4 °C, foi aplicado em cartuchos Sep-Pak C18 (Water Associates) ligados em série (três) e equilibrados com água acidificada com o objetivo de pré-purificar as moléculas bioativas. Três eluições foram realizadas utilizandose diferentes concentrações de acetonitrila em água acidificada (5, 40 e 80%).

Após a eluição, as frações obtidas foram concentradas em centrífuga a vácuo, ressuspesas em água Milli-Q acidificada (TFA 0,05%), e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.3.1 Transcriptoma

<u>3.2.3.1.1 Isolamento de RNA, construção da biblioteca de cDNA e Sequenciamento</u>

A hemolinfa de seis lacraias (800 uL em total) da especie *S. s. subspinipes* foi extraída e os hemócitos foram separados como descrito previamente (Materiais e Metodos 3.2). Após a extração as células foram colocadas em tubos Eppendorf e imediatamente congelados a −80 °C. O RNA total foi extraído usando como reagente trizol (TRIzol® Ambion, Life Technologies). A integridade do RNA foi avaliada utilizando um Agilent 2100 Bioanalyzer com o RNA 6000 Nano assay e quantificado com o reagente e kit de RNA Quant-iT™ RiboGreen® (Invitrogen, Life Technologies Corp.). A biblioteca de cDNA foi gerada seguindo o protocolo padrão do TruSeq Stranded RNA Sample Prep Kit protocol (Illumina, San Diego, CA). A distribuição do tamanho das bibliotecas de cDNA foi medida pela 2100 Bioanalyzer com o chip DNA1000 (Agilent Technologies) e o sistema ABI StepOnePlus Real-Time PCR System foi utilizado na quantificação das amostras da biblioteca antes do sequenciamento. A biblioteca de cDNA foi sequenciada com o sistema Illumina HiSeq 1500, em uma Rapid Flowcell de 300 ciclos de 2*151 pb paired end, seguindo o protocolo padrão do fabricante (Illumina).

3.2.3.1.2 Bioinformática: montagem e anotação dos “contigs”

Após o pré-processamento e aplicação de filtros para obtenção de sequências de alta qualidade, foram utilizados programas especializados para gerar estatísticas, novas leituras pareadas e leituras ajustadas pareadas. O arquivo de leituras gerado foi extraido utilizando o CASAVA-1.8.2 (Illumina), com filtro de qualidade Q30. A montagem dos “contigs” foi feita utilizando o Trinity (Grabherr et al., 2011). A montagem foi realizada utilizando o software Trinity (versão 2.1.1) com parâmetros de “paired-end”. Para a montagem foram utilizados todos os reads (paired-end e únicos) que passaram pelos filtros.

Os reads da amostra foram utilizados para a montagem De novo, e os transcritos obtidos foram utilizados como referência para as análises de expressão gênica. A análise de expressão condição-específica foi realizada através do alinhamento dos reads paired-end contra a montagem do transcriptoma de referência (o próprio obtido), seguido pela estimativa da abundância utilizando o método RSEM (RNA-Seq Expectation Maximization). O RSEM tem o objetivo de estimar o nível de expressão aproximado para cada transcrito, gerando o FPKM (Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped) para cada transcrito (Li, Colin, Dewey, 2011). Este método é utilizado devido à geração de isoformas, variantes de

splicing e genes duplicados em montagens De novo de transcriptomas, e utiliza um processo iterativo para determinar reads fracionalmente para cada transcritos baseado na probabilidade dos reads sendo derivados de cada transcrito, levando em consideração o viés na posição gerado pelo protocolo de criação da biblioteca de RNA-seq.

Os “contigs” foram anotados por script de Blast utilizando banco de dados do Uniprot. A curagem da anotação foi feita manualmente, separando os “contigs” nas categorias: componentes celulares, imunológicos, toxinas, desconhecidos, componentes com função desconhecida e No Match (equivale aos “contigs” que não tiveram similaridade quando analisados nos bancos de dados). Os componentes imunológicos foram também classificados em 12 diferentes categorias: Regulação, coagulação, desagregação, agregação, encapsulação, fagocitose, reconhecimento, PAMs e proteínas, hemocianina, melanização, hemócitos e hipóxia.

Após a realização da anotação do transcriptoma foi calculada a porcentagem de expressão aproximado de cada uma das categorias descritas.

3.3 Extratos

3.3.1 Extrato Total

Para realizar a analise da produção de moléculas bioativas no extrato total do corpo, foram utilizados 3 adultos da espécie *Scolopendra viridicornis* **(Figura 4A),** uma ninhada composta por 12 filhotes no quinto instar de desenvolvimento da espécie *Scolopendra subspinipes subspinipes* e de um adulto (espécimen com maturidade sexual alcançada) da mesma espécie **(Figura 6).**

Figura 6- Cria e Adulto da espécie *Scolopendra subspinipes subspinipes* A. Filhote no quinto instar de desenvolvimento ***Fonte:*** *C. s. Fukushima, 2017* **B.** Adulto após alcançar maturidade sexual. **Fonte:** *Guilherme Castoldi 2015.*

Após a extração de hemolinfa, foi retirada a cabeça dos exemplares já anestesiados. Seus corpos foram fracionados e macerados num almofariz de cerâmica em presença ácido acético 2M e banho de gelo. A solução obtida foi mantida em banho de gelo sob agitação magnética por 30 min, e depois de ser filtrado (2 vezes), foi ser centrifugado a 16.000 xg durante 30 min a 4 °C. O pellet foi descartado e o sobrenadante obtido foi concentrado em centrífuga a vácuo, ressuspenso em água acidificada (TFA 0.05%) e aplicado em colunas Sep-Pak C18 (Water Associates), equilibradas com água acidificada com o objetivo de pré-purificar as frações com atividade antimicrobiana. Três eluições foram realizadas utilizando-se diferentes concentrações de acetonitrila (5, 40 e 80%) em água acidificada.

3.3.2 Extrato da Ecdise

Para realizar a analise da produção de moléculas bioativas durante a muda dos quilópodes, foi utilizada a ecdise fresca obtida de um adulto da espécie *S. subspinipes subspinipes* **(Figura 7).**

Figura 7- Ecdise da *Scolopendra subspinipes subspinipes* Assinalado com uma seta o resultante fresco do processo de muda do animal. **Fonte:** *Elisa Chaparro 2015.*

A amostra foi processada conforme descrito anteriormente **(Materiais e Métodos 3.3.1).**

3.4 Purificação e caracterização das Moléculas Bioativas

3.4.1 Cromatografia Liquida de Alta Eficiência

As eluições obtidas nas diferentes extrações foram concentradas em centrífuga a vácuo, ressuspendidas em água Milli-Q acidificada (TFA 0,05%), e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A purificação foi realizada utilizando sistema UFLC Shimadzu modelo Prominence com coluna de fase reversa semi-preparativa do tipo Júpiter C18 (250 mm x 10 mm, Phenomenex™) em um gradiente de concentração de 0 a 20% para 5%, de 2 a 60% para 40% e de 20 a 80% para 80% de acetonitrila acidificada (ACN/TFA) durante 60 min com um fluxo de 1.5 mL/min. As frações e os picos coletados manualmente, foram concentrados em centrífuga a vácuo (Savant Instruments, Inc) e reconstituídas em água Milli-Q.

A presença de atividade antimicrobiana nestas frações e nos picos foi determinada por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido **(Materiais e Métodos 3.4.2).**

As frações obtidas na etapa anterior nas quais foi observada atividade antimicrobiana, mas não apresentavam total homogenidade ao serem analisadas por espectrometria de massa, passaram por um processo repurificação. Esta nova etapa consistiu em uma purificação por CLAE utilizando-se uma coluna de fase reversa analítica do tipo Júpiter C18 (250 mm x 4.60 mm, Phenomenex™) em diferentes gradientes de concentração e um fluxo de 1mL/min.

3.4.2 Ensaios Antimicrobianos

3.4.2.1 Microrganismos

As cepas de fungos, leveduras e bactérias foram obtidas de diferentes lugares. *Escherichia coli* SBS363 e *Micrococcus luteus* A270 são do Instituto Pasteur (Paris, França). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Cepa Boston 41501), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29213, *Bacillus megaterium* ATCC 10778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Serratia marcescens* ATCC 4112, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, e *Alcaligenes faecalis ATCC 8750* são da Coleção Americana de Tipos de Cepas: "*American Type Culture Collection"* (ATCC; Virginia, Estados Unidos de America). *Enterobacter cloacae β12* e *Escherichia coli* D31 da Universidade de Estocolmo *(*Estocolmo, Suíça*). Salmonella serovars* e *S. enterica* subsp. *arizonae* são do Laboratório Especial de Toxinología Aplicada *(LETA)* Coleção de cepas (Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil*). Saccharomyces cerevisiae* SM BA2610–1da Companhia Fleischmann (Ohio, Estados Unidos de America). *Candida albicans* MDM8 e *Saccharomyces cerevisiae* PM340 (cepa comercial) do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil). *C. tropicalis* IOC4560 é do Instituto Oswaldo Cruz (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil). Os fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Beauveria bassiana* (um fungo entomopatogénico), foram isolados do pão e de uma aranha mumificada, respetivamente.

3.4.2.2 Ensaio de Inibição em Meio Liquido

A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando-se ensaios contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos.

Os organismos que foram utilizados são os mencionados em **Materiais e Metodos 3.4.2.1.**

A atividade antimicrobiana foi testada utilizado o ensaio de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido (Bulet et al., 1993) em placas de ELISA de 96 poços, com uma alíquota de 10 ou 20 µL das frações ativas e 90 ou 80 µL do microrganismo no meio de cultivo e em fase logarítmica de crescimento, na concentração final de 10^3 céls/mL para bactérias e 10^4 céls/mL para leveduras e fungos em cada poço.

O meio de crescimento para as leveduras e fungos contem dextrose de batata na concentração 12 g/L (Potato Dextrose Broth – PDB- Difco™, Houston, EUA; *half strength*) e para as bactérias será usado um meio de cultura pobre em nutrientes (PB: peptona 10 g/L; NaCl 5 gr/L; pH 7,4).

O crescimento bacteriano foi analisado por medida da densidade óptica da cultura, num leitor de microplaca Victor 3 – 1420 (PerkinElmer) a 595 nm, após 18 h de incubação a 30 °C sob agitação constante.

3.4.3 Espectrometria de Massas

As amostras foram analisadas por LTQ XL Thermo Scientific ("Linear ion Trap Mass Spectrometer") – O equipamento foi previamente calibrado com as seguintes substâncias: cafeína (m/z 192,5), acetato de L-MRFA em água (m/z 524,3) e Ultramark 1621. Para controle do equipamento foi utilizado ovoalbumina (43 kDa). As amostras foram previamente concentradas em uma centrifuga a vácuo e ressuspensas em 15µl em ácido fórmico 0,1%. Para análise foi utilizada coluna C18 (Waters) e um gradiente linear de acetonitrila de 0 a 80% em água acidificada (TFA 0,1%) em 60 min e o fluxo de 400 nL/min. Análises realizadas com o espectrômetro operando em modo positivo. Os espectros foram coletados e analisados no software Xcalibur 2.0 (Thermo Electron, EUA).

3.4.4 Sequenciamento dos Peptídeos Antimicrobianos

A estrutura primária dos peptídeos presentes nas frações com atividade antimicrobiana foi determinada através da técnica de sequenciamento "De Novo" (Cantu et al, 2008; Seidler et. al., 2010) dos seus espectros de fragmentação obtidos por LTQ XL/MS/MS Thermo Scientific ("Linear ion Trap Mass Spectrometer").

As frações foram ressuspensas em 15 µL de ácido fórmico 0,1% e submetidos à análise por infusão direta. A fragmentação dos íons mono ou duplamente carregados foi realizada sob diferentes energias de colisão (Ecol) contra gás inerte (argônio).

Para a obtenção da estrutura primária dos peptídeos presentes nas frações com atividade antimicrobiana foi usada a técnica de seqüenciamento "De Novo", onde os espectros obtidos foram deconvoluídos e avaliados utilizando o software Peaks 7.5. A sinalização dos valores de m/z correspondentes as seqüências y e b foi feita com o auxilio do aplicativo "De Novo Sequencing" (Peaks 7.5).

3.4.5 Bioinformatica: Análise das Moléculas Bioativas

As frações bioativas obtidas por cromatografia líquida, foram submetidos a análise por similaridade a outras proteínas no banco de dados público do "National Center for Biotechnology" (NCBI), usando o "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/), e as bases de dados acessíveis a partir da "Bioinformatic Resource Portal ExPASy" do site do Instituto Suíço de Bioinformática (http://www.expasy.org/). Os parâmetros físico-químicos das sequências (como o ponto isoeléctrico) foram calculados com a ferramenta a partir do mesmo portal bioinformática: ProtParam (Gattiker et al., 2003), também disponível no site do Instituto Suíço de Bioinformática (http://web.expasy.org/protparam/). Finalmente, a ferramenta de predição da estrutura ProFunc do "European Bioinformatics Institute" (http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/profunc/) foi utilizada para elucidar a estrutura química primária e o "PyMol Molecular Graphics software" foi utilizado para se obter a imagem 3D da estrutura secundária dos peptídeos.

3.5 Síntese Peptídica

Os peptídeos depois de caracterizados foram sintetizados pelas estratégias Boc/Bzl e Fmoc/t-But. No caso da estratégia Boc/Bzl, o ciclo sintético **(Figura 8)** inicia-se com a remoção do grupo Boc utilizando-se uma solução de 30% TFA/DCM (30 min) seguido de desprotonação do amino grupo realizada com 5% TEA/DCM e na seqüência realizando-se o acoplamento do aminoácido subseqüente. No caso da remoção do grupo protetor Fmoc, esta etapa é realizada em meio básico com 20% piperidina em DMF (20 min), liberando o amino grupo desprotegido em sua forma desprotonada para a fase seguinte de acoplamento. A etapa de acoplamento é usualmente realizada com a mistura dos agentes acilantes: diisopropilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol (DIC/HOBt) (Martin et al., 2001). O excesso molar empregado dos Boc e Fmoc-AA e dos agentes acilantes fica em torno de 2.5 vezes em relação à quantidade de amino grupos presentes na resina. O acoplamento de cada resíduo de aminoácido é monitorado pelo método qualitativo de ninidrina (Kaizer et al., 1970) que detecta a presença de amino grupos livres. Caso se obtenha um teste positivo (coloração azul ou marrom, no caso da prolina), repete-se o acoplamento do aminoácido, alterando-se as condições de solventes e agentes acilantes. Após o encerramento desta etapa, reinicia-se o próximo ciclo até o acoplamento de todos os resíduos de aminoácidos da sequência peptídica.

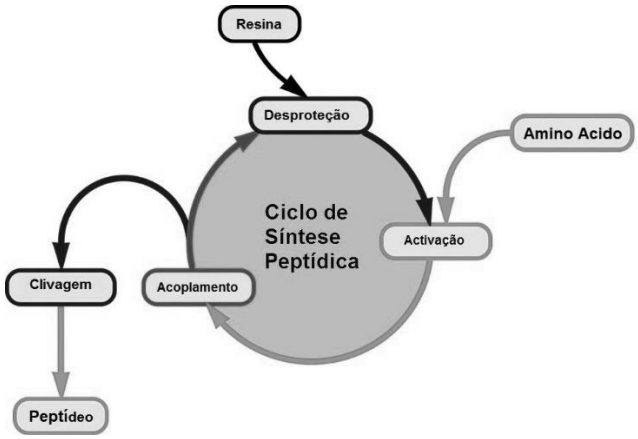


Figura 8- Ciclo para a Síntese Peptídica em fase solida.
O ciclo se repete até todos os aminoácidos da sequencia serem acoplados. *Adaptado de: Merrifield, 1963.*

A clivagem final do peptídeo da resina e a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais é geralmente em uma única etapa de tratamento com TFMSA anidro, em presença de o-cresol e anisol, os quais agem como supressores de reações colaterais (10%, v/v), induzidas por carbocátions liberados durante este tratamento com ácido forte, por cerca de 2 h, a 0ºC (Fields e Noble, 1990). Após esta clivagem, a resina é lavada com éter etílico em presença de fio de sódio e o peptídeo extraído com solução aquosa de ácido acético (5%, v/v). Após esta lavagem, o extrato ácido é liofilizado para obter-se geralmente um pó branco, amorfo.

3.5.1 Purificação dos peptídeos

Os peptídeos liofilizados após serem solubilizados em água ultra pura, foram injetados em um sistema de cromatografia (CLAE-FR/UV). Foi utilizada uma coluna cromatográfica semipreparativa Júpiter C18 (25 x 250 mm, 300 Å, 15-20 µm) e analisados num comprimento de onda de 220 nm. Para a escolha dos gradientes da fase móvel da corrida cromatográfica, foram levados em consideração os perfis cromatográficos dos peptídeos brutos em CL-IES/EM. Utilizando um sistema (0,1% TFA em 60% ACN em 0,1% TFA) durante 90 min com um fluxo de 10 mL/min.

3.5.2 Caracterização dos peptídeos

A caracterização dos peptídeos foi realizada por CL-IES/EM utilizando uma coluna cromatográfica da Waters Nova-Park C18 (2,1 x 150 mm, 60Å, 3,5 µm), seguindo o sistema 1 **(Materiais e Métodos 3.5.1)** com um fluxo de 0,3 mL/min. O tempo de corrida foi de 30 min com um gradiente de 5 a 95% de solvente B. O intervalo de massas foi de 200- 2000 Daltons e comprimento de onda de 214 nm. CL-IES/EM é composto por um CLAE modelo Alliance 2695, um detector UV-Vis modelo 2487 e um espectrômetro de massas modelo 3100 com fonte de ionização eletrospray todos adquiridos da Waters Associates (Milford, MA, EUA). O sistema é controlado por uma Workstation Dell através do software MassLynx.

3.6 Bioensaios

3.6.1 Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida

A concentração de inibição mínima (CMI) é definida como a concentração requerida para o peptídeo alcançar o 100% da inibição de crescimento microbiano (Zhu, et al., 2007). A CMI, foi determinada utilizando os peptídeos sintéticos contra diferentes cepas de bactérias Gram Positiva, Gram negativa, fungos e leveduras **(Materiais e Metodos 3.4.2.1)** utilizando o ensaio de inibição de crescimento em meio liquido descrito anteriormente **(Materiais e Metodos 3.4.2.2)**. Os peptídeos sintéticos foram dissolvidos em agua ultra pura em uma concentração final de 1 mM. Foi utilizada diluição seriada em em placas de ELISA de 96 poços, com uma alíquota de 10 ou 20 µL das frações ativas e 90 ou 80 µL do microrganismo no meio de cultivo e em fase logarítmica de crescimento, na concentração final de 10^3 céls/mL para bactérias e 10^4 céls/mL para leveduras e fungos em cada poço (Modificado de Ehret-Sabatier, et al., 1996). A menor concentração que não apresentasse crescimento visível após incubação a 30 ºC por 18 h, foi definida como MIC. A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada após 96 h de incubação a 30 ºC. A menor concentração que não apresentasse crescimento visível foi definida como a CMB, indicando 99,5% de morte do inoculo original. O crescimento microbiano foi medido por monitorização do aumento da densidade óptica a 595 nm utilizando um leitor de microplacas ELISA (Modificado de O'Driscoll, et al., 2013). O ensaios foram realizados em triplicata

3.6.2 Ensaio Hemolítico

Para a determinação da atividade citotóxica dos peptídeos em eritrócitos humanos, foi utilizado, nesse ensaio, sangue de um doador humano saudável (A+), coletado na presença de um tampão de citrato de sódio (150 mM; pH 7,4). O sangue foi centrifugado por 15 min a 700 xg, lavado três vezes e ressuspendido em PBS. O ensaio foi realizado em triplicata, em diferentes concentrações, adicionando às amostras o mesmo volume de solução de eritrócitos (3%) em PBS. Essas soluções foram incubadas por 3 h a 37 ºC e então centrifugadas por 5 min a 700 xg. O

sobrenadante foi transferido e usado para medições de absorbância (405 nm) em um leitor de microplacas Victor (Victor - Perkin Elmer®).

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

3.6.3 Estabilidade no Plasma

Para avaliar a estabilidade do peptídeo no plasma, foi utilizado o sangue de um doador humano saudável (A+). Uma alíquota (20 µl) do peptídeo na concentração de 1 mM foi incubado em uma solução de 25% de plasma fresco em agua a 37 °C. Alíquotas de 50 µl foram retiradas em diferentes tempos (0, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 min) e as proteínas foram precipitadas com 5 µl de TFA puro e incubado a 5 °C durante 15 mins. Após a incubação os tubos foram centrifugados a 300 g por 5 mins. O sobrenadante (20 µl) foi injetado em um sistema CL/IES-EM. A identificação de cada peptídeo foi feita pela técnica de espectrometria de massas através do seu peso molecular, assim como dos fragmentos gerados em decorrência da degradação enzimática. Já o percentual de degradação foi obtido pela comparação da área dos picos de cada peptídeo no cromatograma obtido pelo detector UV-vis.

3.6.4 Curva de Morte Bacteriana

Para realização do ensaio, 20 µL do peptídeo a ser analizado (50µM), foi adicionado à micro-tubos de 1.5 mL contendo 200 µL de suspensão de *E. coli D31* ou *M. luteus A270* a uma concentração de 10^6 céls/mL. As suspensões de microrganismos foram incubadas a 37 °C, com a tampa aberta, nos tempos de 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 min. Após ter atingido cada tempo determinado foram adicionados às misturas 20 µL de uma solução mãe de 3-(4,5-imethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) a 5 mg/mL, e incubados a 37 °C por 20 min para iniciar a reação de redução.

Após a incubação os tubos contendo a mistura foram centrifugados a 10,000 xg por 30 segs, o sobrenadante foi removido restando os cristais de formados no fundo dos tubos. Os cristais foram dissolvidos com 1 mL de isopropanol e esse volume foi transferido para tubos de vidro, e adicionado mais 1,5 mL de isopropanol para se obter um volume final de 2,5 mL. A leitura dos resultados foi feita em microplacas de 96 poços a 595 nm contendo 200 μL de solução de cada tempo e microrganismo testados. Como controle positivo o mesmo procedimento foi realizado com 20 μL do antibiótico Estreptomicina, e como controle negativo foi utilizado 20 μL de H_2O ultra pura.

3.7 Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular – DC – foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco (J810, Jasco corp., Tokyo, Japão) na faixa de 195-250 nm, utilizando uma cela retangular de quartzo com caminho óptico de 1,0 mm. Os espectros foram coletados com o tempo de resposta de 8 segundos, velocidade de aquisição 50 nm/min, passo 0,2 nm e em 4 aquisições. Os espectros foram feitos em soluções peptídicas de concentração 10-3 $mol.L^{-1}$ em água ultrapura e soluções de Trifluoroetanol – TFE – em diversas porcentagens (0%, 10%, 30% e 50%). Os espectros são apresentados em elipticidade molar para que os valores sejam independentes da concentração da amostra e do caminho ótico da cubeta. Os efeitos de fundo foram minimizados pela transformação de Fourier.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 1 Analise do Transcriptoma

Todos os transcritos da montagem final foram anotados por “script” de BLAST utilizando o banco de dados do UniProt para estimar o número de “contigs” originais no conjunto de dados obtidos. Após a anotação manual foi obtido o nível de expressão aproximado para cada transcrito, com isto verificou-se que dos 265.536 “contigs” a maior porcentagem de expressão é observada em “contigs” que não apresentam similaridade com nenhuma proteína do banco de dados (No Match 56.2%), com proteínas que não tem sido caracterizadas (Não caracterizado, 8.01) ou que ainda não tem sua função descrita (Função sem caracterizar 0.40). Estes resultados eram de se esperar devido à baixa informação existente até agora sobre quilópodes ou miriápodes em geral **(Figura 9).** Os “contigs” que apresentaram similaridade foram classificados como Componentes Celulares, Toxinas e Componentes do Sistema Imune, apresentando uma porcentagem de expressão de 30,89, 0,19 e 4,31% respectivamente **(Figura 9).**

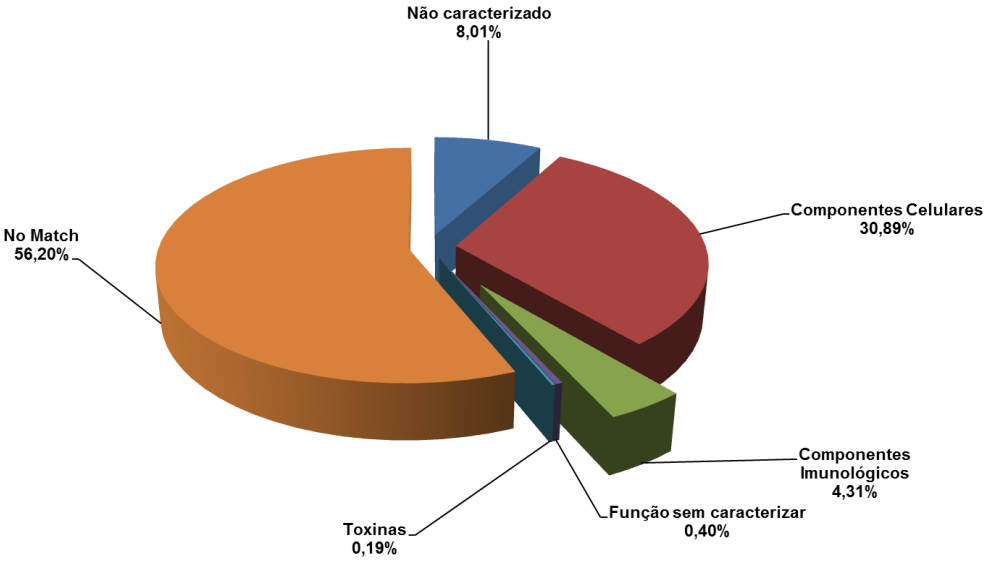


Figura 9- Porcentagens de expressão dos transcritos dos hemócitos de *Scolopendra subspinipes*. Distribuição do nível de expressão dos “contigs” obtidos em cada categoria.

A alta expressão de componentes celulares era esperada devido a que neles se encontram todos os genes que regulam a formação do citoesqueleto, o transporte de íons na membrana celular, a replicação entre outras funções celulares fundamentais para o desenvolvimento e sobrevivência do animal.

Ao analisar a expressão dos genes do sistema imune, observamos que os "contigs" relacionados às respostas celulares de regulação e reconhecimento foram transcritos com maior frequência, apresentando uma porcentagem de expressão de 33.76 e 11.62% respetivamente **(Figure 10)**, confirmando com isto importância destas respostas na imunidade inata dos quilópodes (e dos invertebrados) sendo estas as responsáveis pela ativação dos outros mecanismos defesa (Cerenius, Söderhall, 2004).

A baixa expressão de "contigs" relacionados com a resposta de encapsulação (0,03%) pode ser explicada a que esta resposta imunológica se da quando é necessária uma ligação de hemócitos para conter invasores de grande tamanho (Nappi et al., 2000), e devido a que os animais utilizados para este estudo estavam sadios e não sofreram um estimulo prévio, a expressão dos fatores da encapsulação não foram ativados **(Figura 10)**.

Fukusawa e colaboradores em 2008 descreveram que a fagocitose na aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana* cumpre uma função principalmente na remoção de pequenas partículas da hemolinfa, mais sua participação nas respostas imunológicas não é muito importante (Fukusawa et al., 2008). Com isto, a baixa expressão de transcritos relacionados com a fagocitose nos quilópodes (3,48%), pode significar um comportamento parecido desta resposta celular na hemolinfa destes animais.

As respostas humorais apresentaram uma expressão bastante desigual, sendo que "contigs" relacionados à cascata de coagulação foram expressos com 21,43% de frequência, enquanto aos relacionados com a cascata de fenoloxidase só foi observado num 2,66% **(Figura 10)**.

Em limulídeos (chelicerata) foi descrito que na cascata de fenoloxidase a mesma enzima coagulante que age na cascata de coagulação é capaz de clivar a hemocianina, resultando em uma enzima com atividade fenoloxidase sem que ocorra uma clivagem de toda a cascata proteolítica (Nagai, Kawabata, 2000; Nagai, et al., 2001). As diferenças que observamos nas expressões das

respostas humorais nos mostram uma maior importância da resposta de coagulação com relação à melanização nos quilópodes, o que pode significar que em estes animais existam diferentes mecanismos de ação, assim como nos chelicerados.

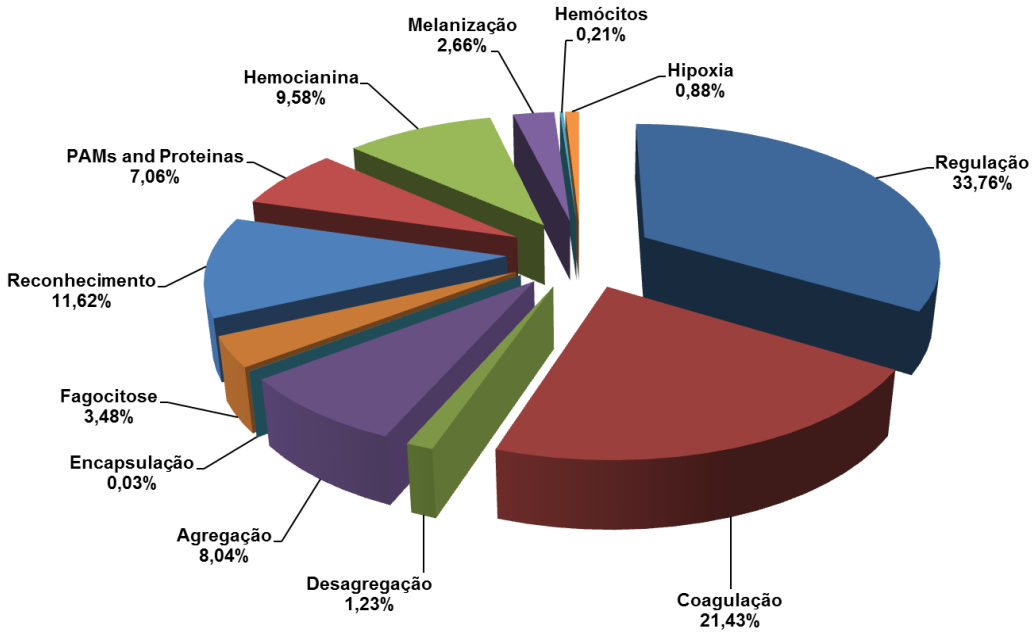


Figura 10- Porcentagens de expressão dos transcritos relacionados ao Sistema Imune da *Scolopendra subspinipes*. Distribuição do nível de expressão dos "contigs" obtidos em cada categoria.

A produção de moléculas com atividade antimicrobiana pode ser dada constitutivamente, como nos aracnídeos, ou após a indução por infecção, como nos insetos (Jenssen, Hamill, Hancock, 2006). Devido a que as centopeias das quais foi obtida a hemolinfa para a obtenção do transcriptoma não receberam um estimulo prévio à extração, chama a atenção relativamente alta expressão de proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana (7.06%) **(Figura 7)**. Este resultado nos indica que em miriápodes a presença de PAMs é constitutiva ao igual do que nos aracnídeos.

Dentro das sequencias descritas com atividade antimicrobiana foi encontrada uma que apresento uma alta similaridade com a Gomesina, um peptídeo antimicrobiano descrito previamente na caranguejeira brasileira *Acanthoscurria gomesiana*. Uma nova isoforma da

gomesina foi encontrada (DN109456_c0_g1_i1), apresentando 56% de identidade na sequência de aminoácidos. Ao realizar o alinhamento destes dois peptídeos e comparando-os com a Tachiplesina, um peptídeo antimicrobiano isolado do caranguejo ferradura *Tachypleus tridentatus* e que já tinha tido descrita sua similaridade com a Gomesina previamente (Lorenzini, et al., 2006), foi observada uma alta conservação da estrutura destas moléculas, ricas em cisteína e com um ou dois pontes de disulfeto evidenciando a importância deste tipo de peptídeos antimicrobianos, presentes constitutivamente na hemolinfa tanto dos quelicerados como dos miriápodes. **(Figura 11)**.

```
DN109456_c0_g1_i1      Q-CRREC--QVICRVRRGKRS
Gomesina               Q-CRRLCYKQRCVTYCRGR--
Tachiplesina           KWCFRVCYRGICYRRCR----
                       : * * *         *
```

Figura 11- Alinhamento de Sequencias da DN109456_c0_g1_i1, Gomesina e Tachiplesina. Posições mostrando substituições foram marcadas em vermelhos as conservativas e em azul as não conservativas.

Estas características podem indicar que a imunidade inata dos quilópodes é muito mais similar à dos quelicerados do que a dos insetos.

A filogenia dos artrópodes ao longo dos anos tem sido uma disputa. Até agora, uma série de modelos de classificação baseados em dados moleculares e morfológicos têm sido empregadas para resolver parcimoniosamente esta complexa filogenia com resultados mistos (Dunn, 2008). Porém duas destas hipóteses se destacam: os modelos de Paradoxopoda e Mandibulata **(Figura 12)**.

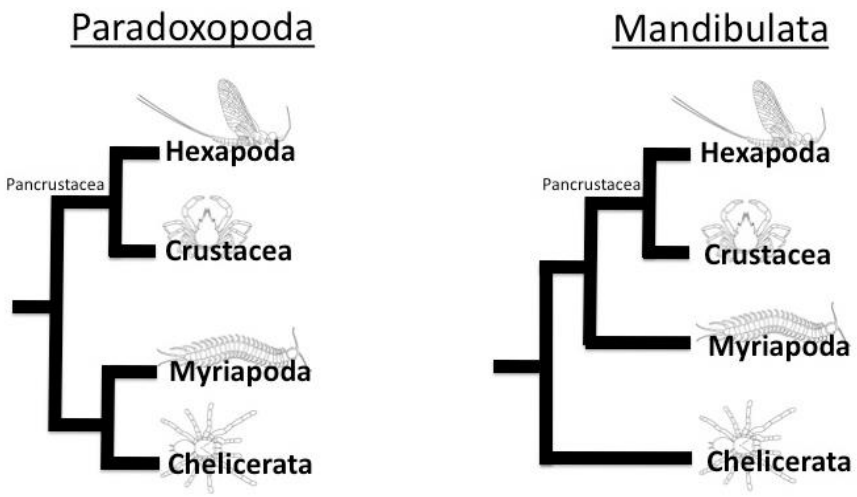


Figura 12- Modelos Filogenéticos de Artrópodes: Paraxopoda e Mandibulata. *Adaptado de Regier* et al.*, 2010.*

Baseados nos resultados obtidos neste estudo até o momento, poderíamos sugerir que imunológicamente falando o modelo que mais se aproxima ao observado na imunologia dos quilópodes é o Paradoxopoda. Já que vários fatores da resposta inata destes animais é mais parecido às respostas dos quelicerados que à dos insetos.

A continuação da caracterização é da análise do transcriptoma da *S. susbspinipes* é fundamental para a obtenção de mais dados que possam confirmar isto.

4.2 Moléculas Bioactivas

4.2.1 Pinipesina

Considerando que os períodos de muda são tempos de maior vulnerabilidade a ataques patogênicos e lesões nos artrópodes, a produção de PAMs durante este processo seria uma forma de imunidade inata profilática que atua para impedir, ao invés de responder, infecções (An et al. 2012).

Visando confirmar esta hipótese, o extrato ácido da ecdise fresca de *S. s. subspinipes* foi submetido à FR-CLAE utilizando-se uma coluna semi-preparativa **(Materiais e Métodos 3.4.1)**.

As frações obtidas nas cromatografias após coleta manual tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido **(Materiais e Métodos 3.4.2.2)**.

Das frações obtidas da eluição de 40% de ACN do extrato da ecdise de *S. s. subspinipes*, depois de fracionadas por FR-CLAE, com um gradiente linear de 2 á 60% de ACN de ACN/TFA (0.05%) em H_2O/TFA (0.05%) durante 60 min., uma apresentou atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positivas *M. luteus* **(Figura 13).** Este tipo de atividade só tinha sido descrito na hemolinfa total de animais imunizados previamente com uma alíquota da mesma bactéria (Xilander, 2009).

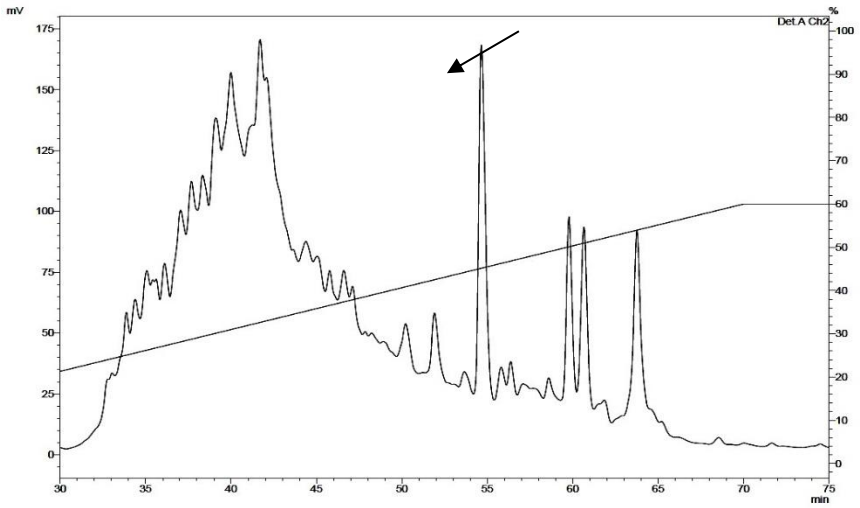


Figura 13- Perfil cromatográfico da eluição de 40% de ACN após primeira etapa de purificação da estração acida do estrato da ecdise de *Scolopendra subspinipes.* As amostras obtidas da eluição de 40% de ACN foram purificadas utilizando Coluna Júpiter C18 semi-preparativa com gradiente linear de 2 a 60% de ACN durante 60 min. e fluxo constante de 1,5 mL/min. A fracção que apresento atividade antimicrobiana esta sinalizada como uma seta.

Após a primeira etapa de purificação, a fração foi submetida a outro passo de purificação por FR-CLAE, utilizando-se uma coluna Júpiter C18 analítica sob um gradientes otimizado de ACN/TFA (0.05%) em H_2O/TFA (0.05%) durante 60 min a um fluxo constante de 1 mL/min. O perfil cromatográfico desta segunda etapa de purificação mostrou a fração pura **(Figura 14).**

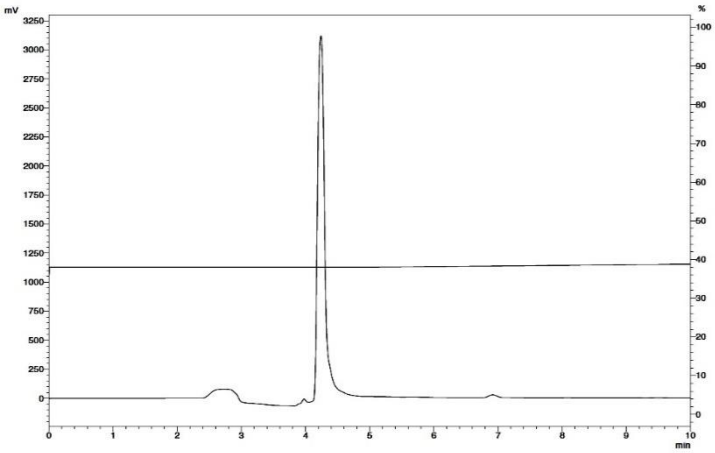


Figure 14- Cromatograma da segunda etapa de purificação por FR-CLAE da fração ativa da Ecdise de *S. s. subspinipes*. A fração com atividade antimicrobiana obtida após a primeira etapa de purificação por FR-CLAE do extrato ácido da ecdise da lacraia eluído a 40% de ACN foi submetida a um segunda etapa de purificação com uma coluna Júpiter C18 analítica com um gradiente lineal de 36 a 50% de ACN por 60 min com um fluxo de 1 ml/min. A fração se mostrou homogenia e confirmou sua atividade contra *Micrococcus luteus*.

Os ensaios subseqüentes foram realizados com o objetivo de obter a caracterização da estrutura primária através das técnicas de sequenciamento "De Novo" por espectrometria de massas utilizando um equipamento do tipo Q LTQ XL Thermo Scientific.

A interpretação dos fragmentos de um peptídeo, gerados pela quebra de uma de suas ligações peptídicas após Dissociação Induzida por Colisão (DIC) contra moléculas de um gás inerte (He ou Ar) e conhecida como a técnica de sequenciamento "De Novo". São da série **"b"** os fragmentos que contém a parte N-terminal da molécula e aqueles que possuem a parte C-terminal do peptídeo são da série **"y"** (Roepstorff, Fohlman, 1984). A diferença de massa entre os fragmentos adjacentes de uma mesma série corresponde à massa do resíduo de aminoácido presente naquela posição da molécula. É assim que é possível sequenciar um peptídeo de massa molecular conhecida através deste processo. Quanto maior for à variedade e quantidade de fragmentos **-y** e **-b** gerados por um peptídeo, mais simples e confiável será a determinação de sua estrutura primária.

O espectro de fragmentação permite também conhecer a composição de aminoácidos do peptídeo, obtida pela presença dos imônios e seus íons relacionados na região de baixos valores de m/z do espectro (Falick et al., 1993).

A caracterização da estrutura primária do peptídeo por sequenciamento “De Novo” foi realizada pela interpretação do espectro de DIC da molécula pura utilizando o software PEAKS Studio (v7.5). A interpretação de dados de MS / MS revelou uma sequência de 1213,57 Da de onze aminoácidos, VAEARQGSFSY **(Anexo I)**. Por outro lado, pesquisas PEAKS DB contra proteínas registradas na base de dados Swiss-Prot não mostraram uma correspondência significativa com a sequência obtida, levando a considerar a molécula como um peptídeo *"De Novo only"*, cujo resultado ALC foi 96%.

E importante mencionar, que dada a baixa massa molecular do peptídeo não foi necessário submeter à amostra a digestão enzimática, sendo suficiente o fracionamento da molécula inteira por MS-MS

O peptídeo sequenciado foi nomeado *Pinipesina* em alusão a espécie estudada (*S. s. subspinipes*). Sua estrutura primária e linear e conformada por 11 resíduos de aminoácidos (VAEARQGSFSY), com uma massa molecular de 1214,3 Da.

Usando diferentes ferramentas de bioinformática, algumas das características físico-químicas da Pinipesina foram preditas. A análise das sequências na base de dados da ferramenta ProtParam disponível no portal de recursos bioinformáticos ExPASy do instituto suíço de bioinformática (http://web.expasy.org/protparam/; acessado 29 Agosto 2016), ajudaram a obter potencial ponto isoeléctrico (pi), o coeficiente de extinção molar e a carga líquida, entre outros dados do peptídeo **(Tabela 2).**

Tabela 2- Estrutura Primária e outros parâmetros moleculares da Pinipesina. A estrutura primária e a massa teórica foram obtidas no análise do espectro obtido no software Peaks 7.5. Os outros parâmetros moleculares foram calculados no aplicativo protparam do ExPASy (http://web.expasy.org/protparam/).

Estrutura Primária (Pinipesina)	VAEARQGSFSY
Ponto Isoelétrico Teorico (pI)	5.97
Coeficiente de Extinção Molar (ε)	1490 M^{-1} cm^{-1} *
Formula	C53H79N15O18
Numero Total de Átomos	165
Índice Alifático	44.55
GRAVY (Grand average of hydropathicity)	-0.382 **
Indice de Instabilidade	26.60***

* Este peptídeo não apresenta nenhum resíduo de Trp, isto pode resultar em um erro de mais do 10% no coeficiente de extinção calculado.
** Um valor negativo do GRAVY indica que esta molécula é hidrofóbica.
*** O valor obtido do índice de instabilidade sugere que este é um peptídeo estável.

Para elucidar a estrutura primária e secundária, utilizando a sequência do peptídeo, utilizou-se a ferramenta de previsão de estrutura ProFunc acessada através do Instituto Europeu de Bioinformática (http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/profunc/; acessado 1 Março de 2017), onde foi obtida a predição da estrutura química primária da Pinipesina. Usando "PyMol Molecular Graphics" foi obtida a imagem 3D da estrutura secundária do peptídeo **(Figura 15)**.

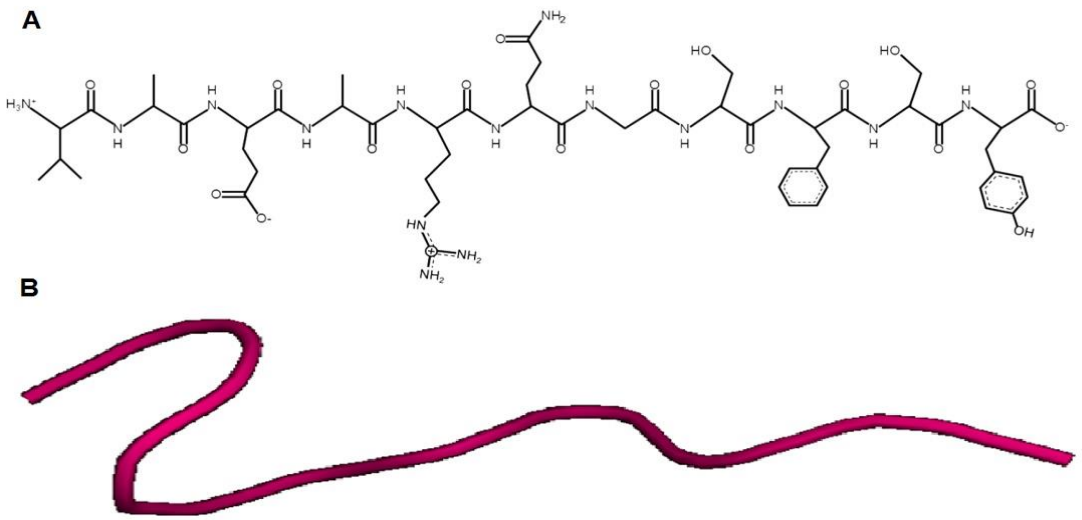


Figura 15- Estrutura de Pinipesina. A. Estrutura química primária da Pinipesina, previsão obtida a partir da análise da sequência com a ferramenta de previsão de estrutura ProFunc. **B.** Estrutura secundária da Pinipesina, previsão obtida a partir da análise da sequência no "PyMOL Molecular Graphics System".

Com o objetivo de encontrar similaridade da Pinipesina com outras proteínas já descritas em diversas fontes, foi realizada uma busca no banco de dados disponibilizado pelo Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia [*National Center for Biotechnology Information (NCBI)]* utilizando-se a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/; acessado 26 Agosto do 2016). Da mesma maneira realizou-se uma busca na base de dados de proteínas cuticulares de artrópodes: *CuticleDB* (http://bioinformatics.biol.uoa.gr/cuticleDB/; acessado 25 *Fevereiro* 2017).

A busca de regiões de similaridade local contra proteínas de artrópodes registradas na base de dados pública disponível no NCBI e na base de dados de Cuticle DB permitiram realizar uma análise de alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da Pinipesina com regiões específicas de proteínas cuticulares de diferentes espécies de hexápodes. O alinhamento mostrou que todas as sequências contêm uma região conservada de 6 resíduos de comprimento (QGSFSY); Adicionalmente, uma posição é ocupada por resíduos de similaridade funcional (V e A), uma vez que ambos são hidrofóbicos, indicando que a posição é pouco conservada **(Figura 16)**.

			Identities		Organisms
Pinipesin	1	VAEAR--QGSFSY	11		*Scolopendra subspinipes*
Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-8-like isoform X1	65	QAEAREAQGSYSY	76	83%	*Megachile rotundata*
Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-2-like	73	DAEAQVAQGSFSY	84	75%	*Papilio polytes*
Cuticular protein RR-1 motif 32	74	DAEAQVAQGSFSY	85	75%	*Danaus plexippus*
Pupal cuticle protein 20	145	EAQAA--QGSFSY	154	80%	*Tribolium castaneum*

Figura 16- Alinhamento múltiplo da sequência de amino ácidos da Pinipesina com fragmentos de proteínas cuticulares de insetos. Os resíduos idênticos conservados são sinalizados em cinza. Os percentuais à direita indicam a identidade partilhada entre Pinipesina e outras moléculas.

O alinhamento múltiplo destas sequências nos leva a sugerir que, assim como já foi relatado anteriormente, em estudos sobre peptídeos antifúngicos gerados a partir do C-terminal da hemocianina em camarões e aranhas (Destoumieux-Garzón et al., 2001; Riciluca et al., 2012), a Pinipesina pode ser derivada de uma região específica de uma proteína maior, neste caso cuticular, processo que poderia envolver uma proteólise limitada da proteína. Isto sugere que, as proteínas cuticulares podem desempenhar um papel na imunidade inata das centopeias durante a muda, servindo como substrato para a geração de peptídeos antimicrobianos.

Por outro lado, estudos recentes sobre a ecdise de camarões e bichos-da-seda têm mostrado que durante esta fase, a expressão de genes relacionados ao sistema imunológico é *upregulated* (Gao et al., 2015; Yang et al., 2016). Devido a isto, é provável que vários fatores *downstream*, tais como os peptídeos antimicrobianos, sejam expressos para gerarem uma resposta imunitária durante este período. A Pinipesina pode ser um destes efetores expressos que constituem a linha de frente da defesa do hospedeiro contra a infecção durante a muda.

Após esclarecer a estrutura primaria do peptídeo, a Pinipesina foi sintetizada como descrito no **Materiais e Metodos 3.5.** Também foi obtido um segundo sintético análogo com o N-terminal bloqueado e identificado como Pinipesina Acetilada (PinipesinaAc). Estes dois peptídeos foram utilizados para continuar com a caracterização deste material.

A estabilidade plasmática da Pinipesina e PinipesinaAc foi analisada em termos de resistência proteolítica por proteases de plasma sanguíneo humano. Conforme ilustrado na **Figura 17**, os dois se mostraram sensíveis à proteólise, sendo quase totalmente digeridos dentro de 60 min. Esperava-se que a estabilidade da Pinipesina Ac fosse superior à Pinipesina devido à

proteção contra a amidação e acetilação contra carboxi e aminopeptidases plasmáticas, contudo a degradação plasmática de ambos peptídeos pareceu ser a mesma.

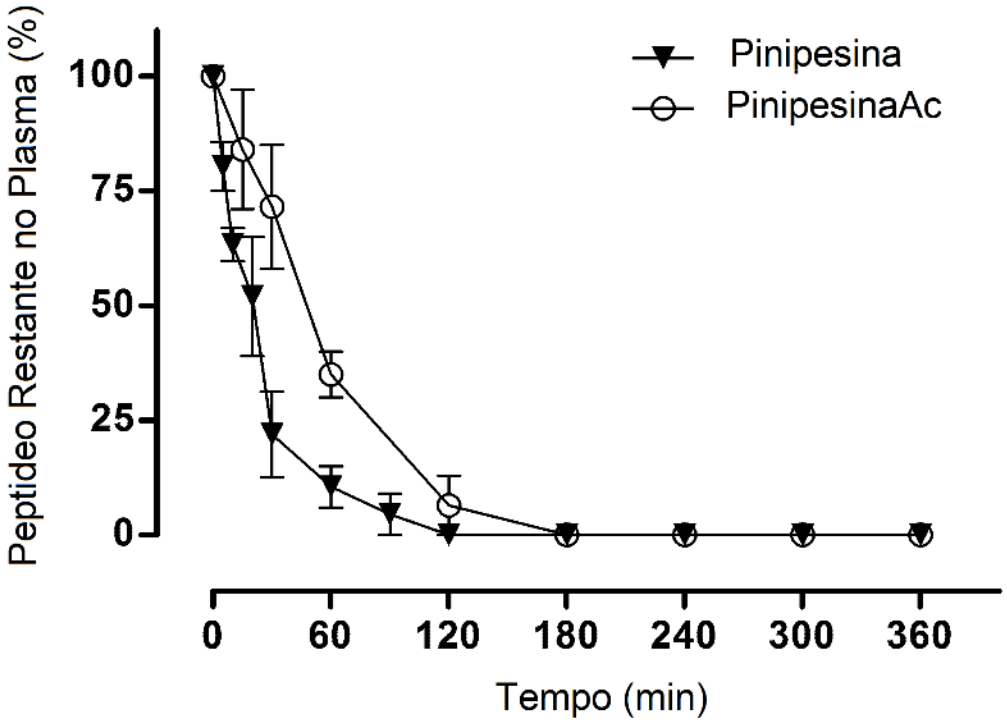


Figura 17- Degradação em plasma da Pinipesina e PinipesinaAC.
Resistencia da Pinipesina e da PinipesinaAc à degradação quando incubados no plasma humano, onde se observa que após os primeiros 60 min quase a totalidade da Pinipesina foi degradada enquanto a PinipesinaAc alcança este valor após 120 min.

Na degradação da Pinipesina a hidrólise ocorreu com a subsequente eliminação dos aminoácidos carboxi-terminais, indicando a ação das carboxipeptidases e na degradação da PinipesinaAc ocorreu no meio da cadeia, indicando a ação das endopeptidases.

Os sintéticos da Pinipesina nativa e da Pinipesina acetilada foram testados quanto à atividade antimicrobiana contra quatro espécies de bactérias Gram-positivas, oito espécies de bactérias Gram-negativas, quatro espécies de fungos e três espécies de levedura **(Tabela 4)**. Todos os microrganismos testados foram sensíveis à Pinipesina nativa, que apresentou um CMI e um CMB entre 25 μM a 6,25 μM. O peptídeo sintético da Pinipesina acetilada não mostrou

atividade antimicrobiana contra nenhum dos microrganismos testados na gama de concentrações avaliadas **(Tabela 3)**.

As bactérias Gram-positivas: *M. luteus* A270 e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), mostraram-se mais sensíveis ao peptídeo com uma CMI e CMB de 6, 25 µM. As duas cepas de *E. coli* utilizadas nos ensaios mostraram o mesmo CMI e CMB independentemente das diferentes resistências de cada cepa. A *E. coli* SBS 363 é comumente utilizada para identificar a atividade antimicrobiana de diferentes peptídeos (Silva PI Jr et al., 2000; Ayroza et al., 2012; Riciluca et al., 2012) e da D31 já foi descrita resistência contra estreptomicina e ampicilina (Breckenridge et al., 1970).

A ausência da atividade antimicrobiana da PinipesinaAc sugere que a carga do peptídeo nativo no seu extremo N- terminal, assim como a sua estrutura, é fundamental para o mecanismo de ação do peptídeo.

Tabela 3- Atividade antimicrobiana da Pinipesina e da PinipesinaAc

Microorganismo	Pinipesina		PinipesinaAc	
	CMI (µM)[a]	CMB (µM)[a]	CMI (µM)[a]	CMB (µM)[a]
Bactéria Gram-negativa				
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)	12,5	12,5	NA	NA
Alcaligenes faecalis (ATCC 8750)	12,5	12’5	NA	NA
Escherichia coli (D31)	12,5	12,5	NA	NA
Escherichia coli (SBS363)	25	25	NA	NA
Serratia marcescens (ATCC 4112)	25	25	NA	NA
Enterobacter clocae (β-12)	25	25	NA	NA
Salmonella serovars	12,5	12,5	NA	NA
Salmonella enterica subsp. *Arizonae*	25	25	NA	NA
Bactéria Gram-positiva				
Bacillus subtilis (ATCC 6633)	25	25	NA	NA
Bacillus megaterium (ATCC 10778)	12,5	12,5	NA	NA
Micrococcus luteus (A270)	6,25	12,5	NA	NA
Staphylococcus aureus (ATCC 29213)	6,25	6,25	NA	NA
Levedura				
Candida albicans (MDM 8)	25	25	NA	NA
Candida tropicalis (IOC 4560)	25	25	NA	NA
Saccharomyces cerevisiae PM340	25	25	NA	NA
Fungo				
Aspergillus niger	25	25	NA	NA
Beauveria bassiana	25	25	NA	NA

CMI, concentração mínima inibitória; CMB, concentração mínima bactericida;
[a] CMI e CMB refere-se as concentrações necessárias para alcançar 100% de inibição de crescimento e atividade bactericida respectivamente.
A maior concentração testada foi 100 µM.

Com o intuito de elucidar características estruturais dos peptídeos, estes foram analisados por dicroísmo circular **(Materiais de Metodos 3.7).** Os espectros foram obtidos a temperatura ambiente em agua ultra pura e em uma solução de 50% TFE/H_2O. A Pinipesina mostrou um perfil de DC característico de uma conformação desordenada (bandas em torno de 200 nm) mesmo na presença de 50% de TFE **(Figura 17).** A Pinipesina acetilada (PinipesinaAc) mostrou um espectro de DC característico da dobra beta (folha), uma banda negativa a 218 nm e uma positiva a 196 nm, em água. Em uma solução de 50%TFE / água, a PinipisinaAc mostrou um

espectro CD característico da hélice Alpha, uma banda negativa a 222 nm e 208 nm e uma positiva a 190 nm **(Figura 19).**

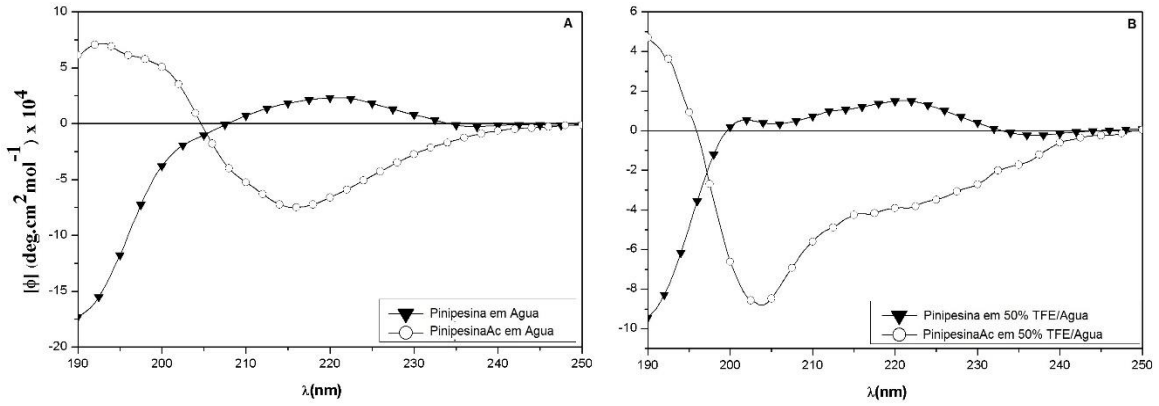


Figura 18- Espectro obtido por Dicroísmo Circular (DC) da Pinipesina nativa e da PinipesinaAc. A. Espectro de DC obtido dos peptídeos solubilizados em agua ultrapura. B. Espectro de DC dos peptídeos solubilizados em uma solução de 50% de TFE/Agua.

Embora a interação com a membrana celular microbiana pareça ser o mecanismo de morte da grande maioria dos PAMs, vários estudos têm revelado que a morte celular pode prosseguir com relativamente pequena interrupção da membrana, sugerindo que os PAMs podem interagir com alvos intracelulares fundamentais para o microrganismo (Giuliani et al., 2007).

Levando isto em conta juntamente com a carga líquida neutra e as características hidrofílicas da Pinipesina, pode-se supor que esta molécula pode ser um PAM intracelularmente ativo que mata as suas células alvo sem causar permeabilização da membrana. Este peptídeo poderia atuar inibindo a síntese de ADN e proteínas, proteases de micróbios e vias intracelulares, ou mesmo atacando múltiplos alvos (Bahar, Ren, 2013).

Além disso, de acordo com os espectros de dicroísmo circular da Pinipesina nativa, a molécula parece ter uma estrutura extensa bem definida que não se dobra em elementos de estrutura secundária regulares, embora seja um peptídeo curto com um elevado grau de liberdade. Isto indica que, tal como muitos outros PAMs, a Pinipesina pode não ser ativa contra as membranas de agentes patogénicos, mas pode atingir a sua atividade antimicrobiana através da penetração das membranas e interagindo com proteínas bacterianas (Nguyen et al., 2011). Esta evidência adicional apoia nossa hipótese inicial sobre a estratégia de direcionamento intracelular

do peptídeo, no entanto, mais trabalho deve ser feito para caracterizar completamente o mecanismo de ação da Pinipesina.

Embora a atividade antimicrobiana já tenha sido descrita anteriormente na cutícula de insetos e crustáceos (Turillazzi et al., 2006; Mars-Brisbin et al., 2015), para nosso conhecimento este é o primeiro peptídeo antimicrobiano isolado da exúvia de um artrópode, mostrando que a Pinipesina é um PAM completamente novo que nunca foi descrito em nenhum outro organismo.

4.2.2 Lacraina

O extrato do corpo de três (3) centopeias foi processado conforme descrito anteriormente **(Materiais e Metodos 3.3.1).** O sobrenadante obtido após centrifugação foi aplicado a uma coluna descartável Sep-Pak C18 para pré-purificação. A partir disto, foram obtidas três fracções eluídas a 5%, 40% e 80% de acetonitrila (ACN / TFA 0,05%). A eluição de 40% de ACN foi separada em pelo menos 40 componentes diferentes por RP-HPLC **(Figura 19)**, todas as frações foram analisadas no ensaio inibidor de crescimento liquido utilizando *M. luteus* A270, *E. coli* SBS363 e *C. albicans* MDM8.

A fração eluída a 40% foi selecionada para a análise direta porque contém uma concentração de proteína mais elevada do que as frações eluídas a 5 e 80% de acetonitrila. Além disso, estudos anteriores demonstraram que vários peptídeos com atividade antimicrobiana elucidam frequentemente cerca de 40% de ACN (Ayroza et al., 2012; Riciluca et al., 2012).

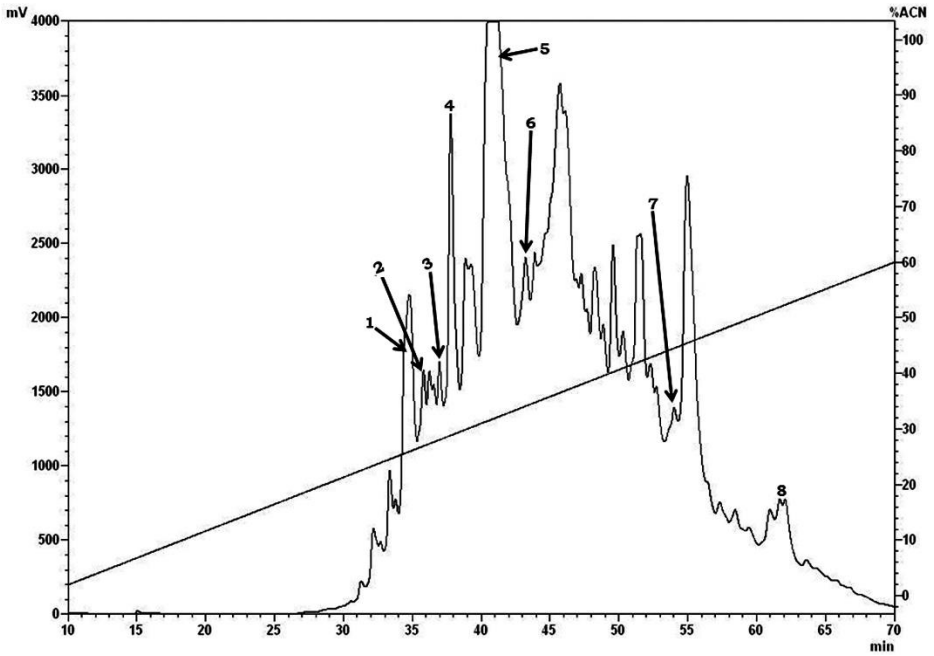


Figura 19- Perfil cromatográfico da eluição de 40% de ACN após primeira etapa de purificação da extração acida do estrato total do corpo de *Scolopendra viridicornis.* As amostras obtidas da eluição de 40% de ACN foram purificadas utilizando Coluna Júpiter C18 semi-preparativa com gradiente linear de 2 a 60% de ACN durante 60 min. e fluxo constante de 1,5mL/min. As frações numeradas e sinalizadas com uma seta foram as que apresentaram atividade antimicrobiana.

Das frações obtidas, oito apresentaram atividade antimicrobiana **(Figura 19).** Todas menos a fração 2 mostraram atividade contra as bactéria Gram-negativa *E. coli* (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8). A fração 2 apresentou atividade contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus.*

Estas novas moléculas antimicrobianas representam uma nova e excitante fonte de peptídeos bioativos. Até agora, as fontes mais comuns de artrópodes de peptídeos antimicrobianos foram o veneno (Corzo et al., 2001; Haarol et al., 2002; Kuhn-Nentwig et al., 2002) ou hemolinfa (Ehret-Sabatier et al., 1996; Silva Jr. et al., 2000; Riciluca et al., 2012), mas o corpo animal não é normalmente analisado para peptídeos antimicrobianos. É importante mencionar que em vários estudos de pequenos invertebrados como formigas e moscas, o extrato animal total é analisado para na procura de PAMs; Entretanto, as glândulas de hemolinfa e de veneno não são removidas do animal, pelo que é possível que os peptídeos encontrados sejam realmente dessas fontes (Bulet e Stocklin, 2005; Imler e Bulet, 2005).

Para este estudo, optamos por purificar e caracterizar a fração 4 **(Figura 20).**

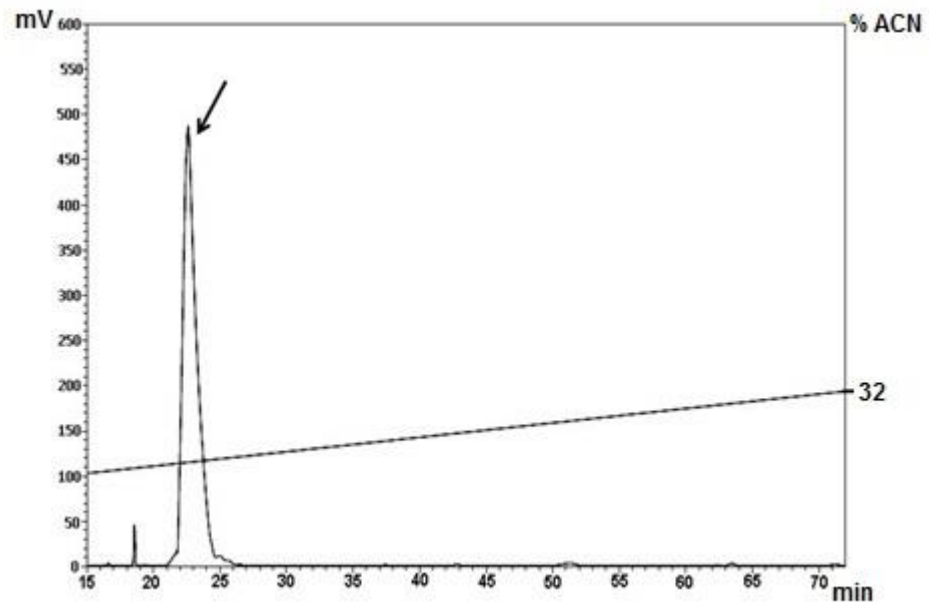


Figure 20- Cromatograma da segunda etapa de purificação por FR-CLAE da fração 4 ativa do extrato total de *S.viridicornis*. A fração com atividade antimicrobiana obtida após a primeira etapa de purificação por FR-CLAE do extrato total do corpo da lacraia eluído a 40% de ACN foi submetida a um segunda etapa de purificação com uma coluna Júpiter C18 analítica com um gradiente lineal de 15 a 32% de ACN por 60 min. com um fluxo de 1 mL/min. A fração se mostrou homogenia e confirmou sua atividade contra *E. coli*.

Os ensaios subsequentes foram realizados com o objetivo de obter a caracterização da estrutura primária através das técnicas de sequenciamento *"*De Novo*"* por espectrometria de massas utilizando um equipamento do tipo Q LTQ XL Thermo Scientific.

A caracterização da estrutura primária do peptídeo por sequenciamento "De Novo" foi realizada pela interpretação do espectro de DIC da molécula pura utilizando o software PEAKS Studio (v7.5). A interpretação de dados de MS / MS revelou uma sequência de 925,5 Da de oito aminoácidos, RYPAVGYT **(Anexo II)**. Por outro lado, pesquisas PEAKS DB contra proteínas registradas na base de dados Swiss-Prot não mostraram uma correspondência significativa com a sequência obtida, levando a considerar a molécula como um peptídeo *"De Novo only"*.

E importante mencionar, que dada a baixa massa molecular do peptídeo não foi necessário submeter à amostra a digestão enzimática, sendo suficiente o fracionamento da molécula inteira por MS-MS.

Uma característica interessante deste peptídeo é que a sua estrutura primária tem apenas oito aminoácidos, com uma massa molecular baixa (inferior a 1 kDa). Os primeiros estudos de extrato de corpo de quilópodes mostraram apenas moléculas de baixa massa molecular desprovidas de natureza proteica, tais como Jineol, um alcalóide com atividade citotóxica e uma massa molecular de 161,05 Da (Moon et al., 1996) e Centipedin, que tem um peso molecular De 162,1 Da e uma atividade forte contra as bactérias Gram-negativas *Klebsiela pneumoniae* (Kim et al., 1998).

O peptídeo sequenciado foi nomeada como Lacraina, em referência ao nome comum para as centopeias em português (lacraia).

Usando diferentes ferramentas de bioinformática, algumas das características físico-químicas da Lacraina foram preditas. A análise das sequências na base de dados da ferramenta ProtParam disponível no portal de recursos bioinformáticos ExPASy do instituto suíço de bioinformática (http://web.expasy.org/protparam/; acessado 09 março 2013), ajudaram a obter potencial ponto isoeléctrico (pi), o coeficiente de extinção molar e a carga líquida, entre outros dados do peptídeo **(Tabela 4).**

Tabela 4- Estrutura Primária e outros parâmetros moleculares da Lacraina. A estrutura primária e a massa teórica foram obtidas no análise do espectro obtido no software Peaks 7.5. Os outros parâmetros moleculares foram calculados no aplicativo protparam do ExPASy (http://web.expasy.org/protparam/).

Estrutura Primária (Lacraina)	**RYPAVGYT**
Ponto Isoelétrico Teorico (pI)	8.59
Carga Neta	+1
Coeficiente de Extinção Molar (ε)	2980 M^{-1} cm^{-1} *
Formula	$C_{43}H_{63}N_{11}O_{12}$
Numero Total de Átomos	129
Índice Alifático	48,75
GRAVY (Grand average of hydropathicity)	-0,475**
Índice de Instabilidade	6,99***

***** Este peptídeo não apresenta nenhum resíduo de Trp, isto pode resultar em um erro de mais do 10% no coeficiente de extinção calculado.
****** Um valor negativo do GRAVY indica que esta molécula é hidrofóbica.
******* O valor obtido do índice de instabilidade sugere que este é um peptídeo estável.

O peptídeo tem características catiônicas (carga neta +1) e um ponto isoelétrico alto (8.59), propriedades compartilhadas pela maioria dos peptídeos antimicrobianos conhecidos (De Simone e Souza, 2002; Brogden et al., 2005).

Para elucidar a estrutura primária e secundária, utilizando a sequência do peptídeo, utilizou-se a ferramenta de previsão de estrutura ProFunc acessada através do Instituto Europeu de Bioinformática (http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/profunc/; acessado 1 Março de 2015), onde foi obtida a predição da estrutura química primária da Pinipesina. Usando “PyMol Molecular Graphics” foi obtida a imagem 3D da estrutura secundária do peptídeo **(Figura 21)**.

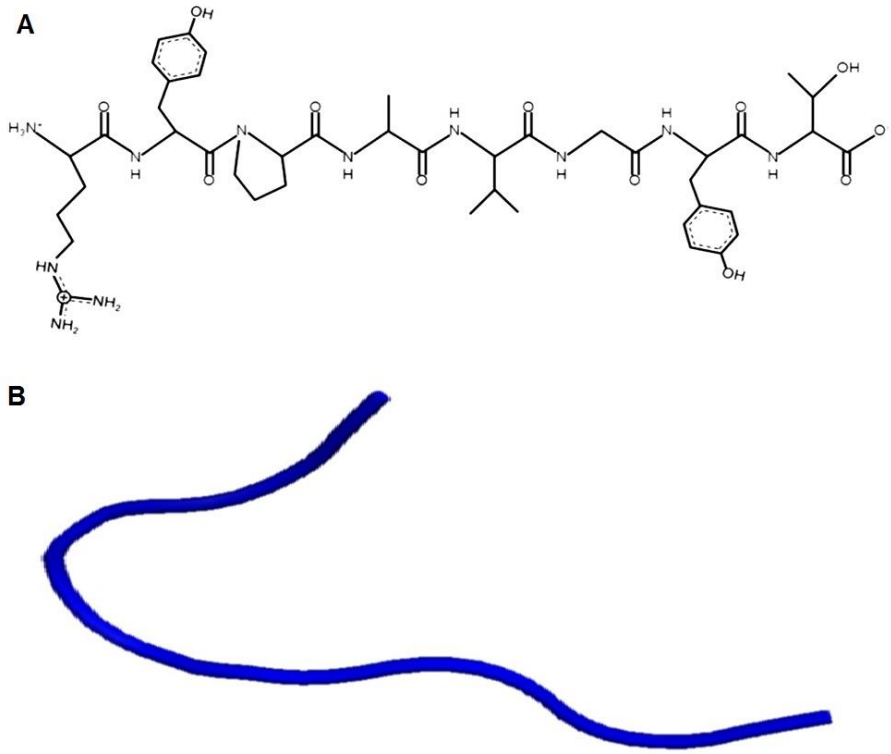


Figura 21- Estrutura da Lacraina. A. Estrutura química primária da Lacraina, previsão obtida a partir da análise da sequência com a ferramenta de previsão de estrutura ProFunc. **B.** Estrutura secundária da Lacraina, previsão obtida a partir da análise da sequência no "PyMOL Molecular Graphics System".

Devido ao pequeno tamanho da sequência, é pouco provável que este peptídeo forme estruturas tais como α-hélice ou β- folhas. Isto também pode ser o motivo pelo qual não foram encontradas semelhanças estrutura-função com outros peptídeos ou proteínas.

Pesquisas minuciosas contra várias bases de dados não conseguiram descobrir nenhuma semelhança da sequência da Lacraina e qualquer outra sequência molecular publicada, sugerindo que a Lacraina é um peptídeo antimicrobiano completamente novo que nunca foi descrito em qualquer organismo.

Após esclarecer a estrutura primaria do peptídeo, a Lacraina foi sintetizada como descrito no **Materiais e Metodos 3.5.** O sintético foi utilizado para continuar com a caracterização deste material.

A Lacraina sintética foi testada quanto à sua atividade antimicrobiana contra três espécies de bactérias Gram-positivas, sete espécies de bactérias Gram-negativas, duas espécies de fungos

e duas espécies de levedura **(Tabela 5)**. Todas As espécies de bactérias Gram-negativas testadas eram sensíveis à Lacraina, com uma CMI e CMB entre 6,25 μM e 3,12 μM. A *Enterobacter cloacae* foi o microrganismo mais sensível ao peptídeo, com uma CMI e CMB de 3,12 μM. O peptídeo sintético não apresentou atividade antimicrobiana contra as outras bactérias Gram-positivas, fungos ou levedura na gama de concentrações testadas **(Tabela 5).**

Em comparação com outros peptídeos isolados de artrópodes, como a gomesina, as CMI da Lacraina descritas contra bactérias Gram-negativas são mais elevadas. No entanto, a Lacraina apresentou atividade antimicrobiana contra *S. marcescens* (CMI = 6,25 μM) que não foi observada para gomesina ou androctonina (atividade testada na concentração mais alta de 100 μM e 50 μM correspondentemente) (Ehret-Sabatier, 1996 ; Silva Jr, 2000). Em comparação com a atividade antimicrobiana do peptídeo isolado de *Androctonus australis* (Androctonina), a Lacraina apresenta uma atividade mais restrita mas tem um efeito mais forte contra as bactérias Gram-negativas. Devido à atividade bactericida descrita, acreditamos que a Lacraina poderia ter alvos Gram-negativos específicos.

A atividade antimicrobiana do extrato corporal de centípedes já foi descrita na medicina oriental tradicional, onde o pó de *S. s. mutilans* é usado como um remédio para tratar os sintomas de várias doenças como dores reumáticas, resfriados, convulsões e para a prevenção de câncer. Sua capacidade de absorção de água pode prevenir e tratar tuberculose fungica e bacteriana e micoses de pele (Pemberton, 1999; Yoon, 2006). No entanto, até o presente estudo, não foram caracterizadas PAMs do corpo destes animais.

Tabela 5- Atividade antimicrobiana da Lacraina

Microrganismos	**CMI (µM)[a]**	**CMB (µM)[a]**
Bacteria Gram-positiva		
Bacillum megaterium	NA	NT
Staphylococus aureus ATCC29213	NA	NT
Micrococcus luteus A270	NA	NT
Bactéria Gram-negative		
Pseudomonas aeruginosa (ATCC27853)	6.25 µM	12.5 µM
Alcaligenes fecalis (ATCC8750)	6.25 µM	6.25 µM
Serratia marcescens (ATCC4112)	6.25 µM	6.25 µM
Enterobacter clocae (β-12)	3.12 µM	3.12 µM
Salmonella serovars	6.25 µM	12.5 µM
Salmonella arizonae	6.25 µM	6.25 µM
Escherichia coli SBS 363	6.25 µM	6.25 µM
Escherichia coli D31	6.25 µM	6.25 µM
Fungos		
Bauveria bassiana	NA	NT
Aspergillus niger	NA	NT
Leveduras		
C. albicans MDM8	NA	NT
Saccharomycetes cerevisiae PM340	NA	NT

CMI, concentração mínima inibitória; CMB, concentração mínima bactericida;
[a] CMI e CMB refere-se as concentrações necessárias para alcançar 100% de inibição de crescimento e atividade bactericida respectivamente.
NA, Não ativo NT, Não testado
A maior concentração testada foi 100 µM.

Seria interessante investigar novas atividades e aplicações para este novo peptídeo sintético. Outros peptídeos com várias bioactividades são frequentemente relatados na literatura, como a cecropina, um PAM da traça de seda gigante (*Hyalophora cecropia*) que exibe atividade contra bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas (Moore, 1996) e vírus, incluindo o herpes simplex virus (HSV), o vírus da imunodeficiência humana (HIV) eo vírus Junin (Albiol Matanic, 2009).

Para elucidar se Lacraina tem algum efeito sobre os glóbulos vermelhos humanos na concentração antimicrobiana, avaliamos a sua atividade hemolítica. Após a incubação com eritrócitos humanos a partir de um dador saudável com várias concentrações do peptídeo durante 3 h a 37 ° C, não foi observada libertação de hemoglobina. Isto indica que a Lacraina não provoca a lise de eritrócitos humanos **(Figura 22)**. A porcentagem de hemólise foi expressa em

relação aos controles positivo e negativo (0% de hemólise com PBS e 100% de lise com 0,1% de triton X-1000, respectivamente).

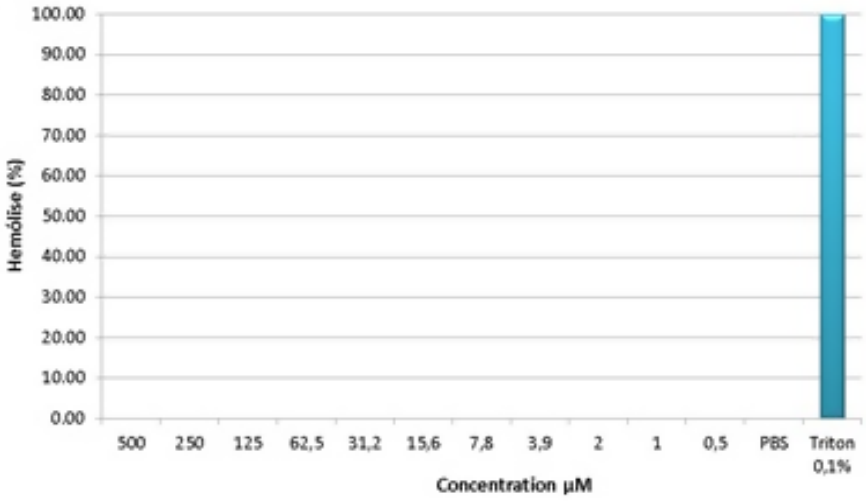


Figura 22- Atividade da Lacraina contra eritrócitos humanos. Concentrações diferentes do sintético da Lacraina foram incubadas com eritrócitos humanos. A percentagem de hemólise é expressa em relação a 0% de hemólise com PBS e 100% de lise com 0,1% de triton X-1000.

Este resultado sugere que o modo de ação da Lacraina não envolve a ruptura das membranas celulares microbianas. Também faz da Lacraina um potencial modelo para o desenvolvimento de novos fármacos contra cepas de bactérias resistentes aos medicamentos atuais.

Com o intuito de elucidar características estruturais do peptídeo, este foi analisado por dicroísmo circular **(Materiais de Metodos 3.7).** Os espectros foram obtidos a temperatura ambiente em agua ultra pura e em uma soluções de 0, 10, 30 e 50% TFE/H_2O e com diferentes pH (2, 5, 7.4, 8). As diferentes concentrações de TFE e de pH não parecem contribuir para a estrutura secundária do, uma vez que todos os espectros de CD apresentaram formas semelhantes **(Figura 23).**

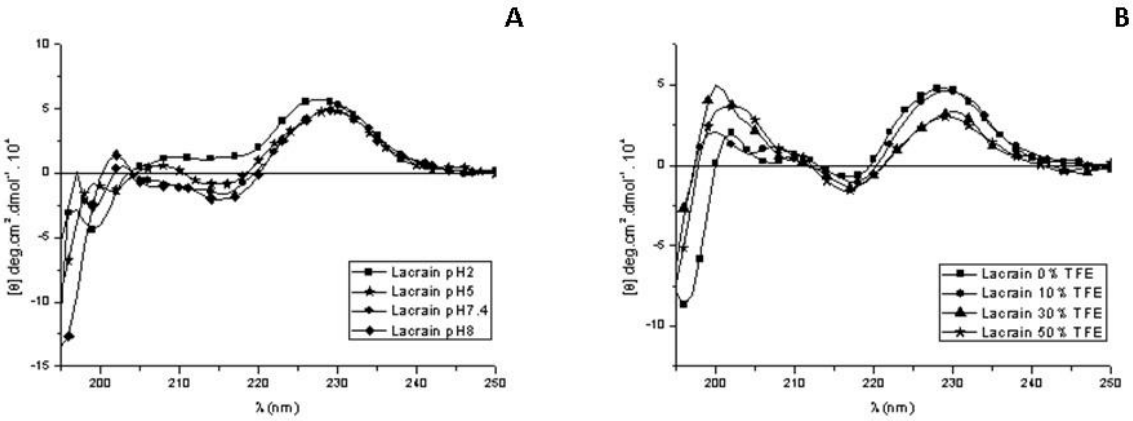


Figura 23- Espectros do Dicroísmo Circular da Lacraina. A. Espectros de DC da Lacraina a diferentes pH. B. Espectros de DC da Lacraina em diferentes concentrações de trifluoroetanol (TFE).

A Lacraina parece ter uma estrutura bem definida, embora seja um peptídeo linear curto com um alto grau de liberdade. Isto é devido à sua estrutura primária, na qual os aminoácidos não polares parecem neutralizar a influência de aminoácidos carregados, deixando apenas a Prolina como um elemento de influência estrutural. Os espectros de pH da Lacraina também mostraram pouca variação na estrutura secundária. Na gama de pH estudada, o terminal carboxi tende a permanecer não protonado, mantendo a carga negativa do grupo carboxilato, e o grupo lateral N-terminal e Arginina protonada retém uma carga positiva. A dobragem promovida pela Prolina poderia aumentar a interação das duas regiões de cargas opostas, permitindo a estabilização da estrutura.

Análises de espectroscopia tais como RMN são necessárias, no entanto, para confirmar a estrutura.

Os resultados obtidos da caracterização da Lacraina foram publicados no *Journal of Antimicrobial Agents v. 48, p. 277-285, 2016* **(ANEXO III)**

4.2.3 Comparação da Produção de Moléculas Antimicrobianas entre Adultos e Juvenis

Paralelamente com o intuito de conhecer a diferença da produção de moléculas bioactivas entre adultos e juvenis, foi analisado e comparado o extrato ácido total de um adultos e de uma ninhada composta por 16 espécimenes no 5º instar da espécie *S. s. subspinipes* utilizando Cromatografia Liquida de Alta Eficiência (nenhum deles recebeu estimulo prévio a extração)

(Figura 24). Posteriormente as frações que foram coletadas tiveram sua atividade antimicrobiana testada utilizando o ensaio de inibição em meio liquido, contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras.

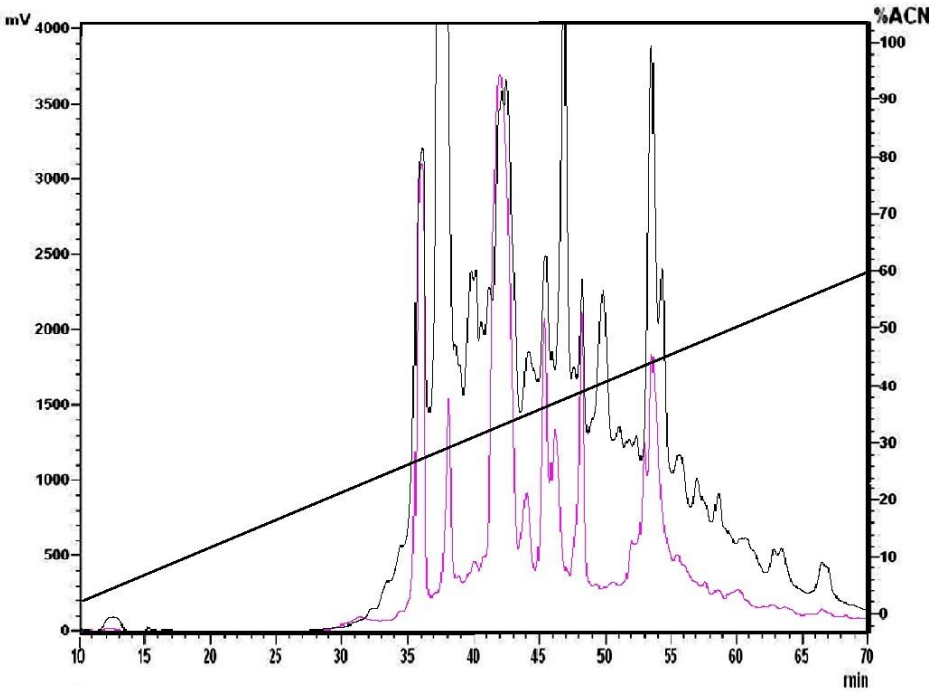


Figura 24- Comparação dos perfis cromatográficos entre Filhotes e Adultos. Comparação dos perfis cromatográficos obtidos dos extratos ácidos do corpo de filhotes (rosa) e adultos (preto). Amostras obtidas da eluição de 40% de ACN e purificadas utilizando Coluna Júpiter C18 semi-preparativa com gradiente linear de 2 a 60% de ACN durante 60 min. e fluxo constante de 1,5 mL/min.

Foi observado um perfil cromatográfico bastante similar. Porem ao comparar as diferentes bioatividades, os adultos apresentaram uma maior quantidade de moléculas com atividade antimicrobiana **(Tabela 6).**

Tabela 6- Atividade antimicrobiana apresentada pelas diferentes das frações isoladas do estrato acido do corpo dos Adultos e Filhotes da *S. s. subspinipes.*

Fracção	Microrganismo	
Filhotes	*M. luteus* (MDM8)	*E. coli* (SBS363)
F-1	X	NA
F-2	X	NA
F-3	X	NA
Adultos		
Ad-1	NA	X
Ad-2	X	X
Ad-3	X	X
Ad-4	NA	X
Ad-5	X	X

A atividade antimicrobiana foi avaliada contra dois microrganismos *M. luteus* e *E. coli*, e foi sinalizada como: X – atividade; NA sem atividade (F= filhotes, Ad=Adultos).

Com o intuito de identificar a estrutura primaria das frações com atividade, foi utilizado o PEAKS Studio software (v7.5; Bioinformatics Solutions,Waterloo, Canada). Para determinar as suas sequencias de amino ácidos, foi realizado o Sequenciamento "De Novo" dos perfis obtidos por espectrometria de massa (MS/MS) **(Tabela 7).**

Tabela 7- Estrutura primaria das fracções isoladas de filhotes e adultos com atividade

Fracção	Sequencia
Filhotes	
F-1	LKVPD
F-2	LVTNWDDFEQ
F-3	FEFNELDH
Adultos	
Ad-1	VEEKEGLPAPQQR
Ad-2	LVTNWDDMEK
Ad-3	TSRLPTP
Ad-4	LSGSDEEDVLQK
Ad-5	VLPDLNGKLTGM

Estrutura primaria das frações isoladas do extrato ácido de Adultos (Ad) e dos filhotes (F)

A análise das frações coletadas dos dois extratos esta ainda em andamento, mas desde já se observa uma diferença na produção de moléculas bioativas entre adultos e filhotes que vale a pena estudar mais aprofundadamente.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentados resultados que podem contribuir para o conhecimento do sistema imune dos quilópodes e miriápodes. Além de fornecer a caracterização de dois novos peptídeos antimicrobianos: A Lacraina e a Pinipesina.

No análise do transcriptoma da hemolinfa de *S. subpinipes* foi observado que a grande maioria dos "contigs" obtidos não apresentaram nenhuma similaridade com as proteínas já descritas nos bancos de dados com os que foram comparados. O que demostra a necessidade deste tipo de estudos devido a pouca informação existente até agora sobre este grupo taxonômico.

Também na análise do transcriptoma, os "contigs" que apresentavam relação com o sistema imunológico e suas respostas (celular ou humoral), foi observada uma maior expressão de transcritos com funções de regulação e de reconhecimento. A importância de uma alta eficiência imunológica esta claramente relacionada à capacidade do animal de reconhecer os patógenos invasores e conseguir regular as respostas celulares e humorais com uma alta eficiência.

Ainda nos dados obtidos no transcriptoma, foi observada uma expressão significativamente maior de "contigs" relacionados à cascata de coagulação, quando comparado com a expressão obtiva para a cascata de fenoloxidase. O que pode significar que no sistema imune dos quilópodes, a coagulação apresenta um papel mais importante do que a melanização, assim já como tem sido descrito nos quelicerados (Cerenius, Söderhall, 2004).

A presença de proteínas e peptídeos antimicrobianos sem a necessidade de um estímulo pode indicar que estas moléculas se encontram de maneira constitutiva nestes animais assim como tem sido observado em outros artrópodes. Foi observada uma sequência com uma alta similaridade com os peptídeos antimicrobianos Gomesina e Tachiplesina evidenciando a importância deste tipo de peptídeos na imunidade inata destes artrópodes.

Na análise do extrato ácido da ecdise de *S. s. subspinipes* foi caracterizado um novo peptídeo com um amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo ativo contra bactérias Gram-Positivas, Gram-negativas, Fungos e Leveduras. A Pinipesina e um peptídeo com uma massa

molécula de 1214,3 Da e cuja estrutura primária apresentou 11 resíduos de aminoácidos (VAEARQGSFSY).

Descrevemos um novo peptídeo antimicrobiano extraído do corpo do quilópode brasileiro *Scolopendra viridicornis* que exibe atividade antibacteriana específica contra bactérias Gram-negativas. A Lacraina é um peptídeo composto apenas por oito resíduos de aminoácidos (RYPAVGYT) e com uma massa molecular de 925,5 Da. Devido ao seu pequeno tamanho, a Lacraina pode ser sintetizada rapidamente e não apresenta atividade citotóxica contra eritrócitos humanos. A Lacraina pode representar um novo alvo para o desenvolvimento de novos antibióticos. A análise adicional da atividade do peptídeo sintético contra alvos como vírus e células cancerígenas, por exemplo, é necessária para determinar o biopotencial desta molécula. Vale ressaltar que esta nova molécula é o primeiro peptídeo descrito a partir do extrato corporal de um miriápode com atividade antimicrobiana.

Na comparação da produção de moléculas bioativas entre adultos e juvenis Foi observado ao comparar as diferentes bioatividades, que os adultos apresentaram uma maior quantidade de moléculas com atividade antimicrobiana que os juvenis. Deste analise foram obtidas as estruturas primarias dos oito peptídeos que apresentaram atividade antimicrobiana.

Estes resultados sobre a imunidade inata nos quilópodes podem ser um bom começo para o esclarecimento do funcionamento do sistema de defesa dos quilópodes, abrindo novos caminhos e perspectivas para continuar com o seu estudo.

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman-Pober AH, Jordan S. Cellular and molecular immunology. 6th Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2005. 572 p.

Albiol Matanic VC, Castilla V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. Int J Antimicrob Agents. 2009; 23:382–9.

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

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

Ayroza G, Ferreira ILC, Sayegh RSR, Tashima AK, da Silva PI Jr. Juruin: an antifungal peptide from the venom of the Amazonian Pink Toe spider, *Avicularia juruensis*, which contains the inhibitory cysteine knot motif. Front Microbiol. 2012;3:324.

Basset Y, et al. Arthropod diversity in a tropical forest, Science. 2012; 338: 1481-84.

Blandin S, Levashina EA. Thioester-containing proteins and insect immunity. Mol Immunol. 2004;40(12):903-8.

Breckenridge L, Gorini L. Genetic analysis of streptomycin resistance in *Escherichia coli*. Genetics 1970;65:9–25.

Brogden KA. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?. Nature. 2005; 3: 238-50.

Bulet P, Stocklin R, Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. Protein Peptide Lett. 2005; 12(1): 3-11.

Bulet P; Hetru C; Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial Peptides in Insects; Structure and Function Dev Comp Immunol. 1999 ; 23 (4-5): 329-44.

Cantú MD, Carrilho E; Wulff NA, Palma MS. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. Química Nova. 2008; 31: 669-75.

Cerenius L, Söderhäl K. Role of prophenoloxidase – activating system in Invertebrate immunity. Curr Opin Immunol. 1998; 10: 23-28.

Cerenius L, Söderhäl K. The prophenoloxidase – activating system in invertebrates. Immunol Rev. 2004; 198: 116-26.

Chaparro E, da Silva Junior PI. Lacrain: The first antimicrobial peptide from the body extract of the Brazilian centipede *Scolopendra viridicornis*. J Antimicrob Agents. 2016; 48: 277-85.

Chaparro E. Moleculas Bioativas em Quilopodes. 2011. 120 f. Dissertação de Mestrado em Ciências- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Charlet M, Chernysh S, Philippe H, Hetru C, Hoffmann JA, Bulet P. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, Mytilus edulis. J Biol Chem 1996; 271(36): 21808-813.

Cornelis L, Soderhall K. The prophenoloxidse activating system in invertebrates. Immunol Rev. 2004; 198: 116-26.

Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, He W, Norton RS, Nakajima, T. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. The Bioch J. 2001; 359: 35-45.

De Simone SG, Souza ALA. Peptídeos microbicidas: uma alternativa viável para a terapia antimicrobiana. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasil. 2002 ; 24: 12-16.

Destoumieux-Garzon D, Saulnier D, Garnier J, Jouffrey C, Bulet P, Bachere E. Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. J Biol Chem. 2001; 276(50) : 47070-077.

Dunn CW. et al. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. Nature. 2008; 452: 745–49.

Ehret-Sabatier L. et al. Characterization of Novel Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Scorpion Blood. J Biol Chem. 1996 ; 271(47) : 29537–544.

Falick AM, Hines WM, Medzihradszky KF, Baldwin MA, Gibson BW. Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom. 1993; 4(11): 882-93.

Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA. The Drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. Nat Rev Immunol. 2007; 7(11): 862-74.

Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. Int J Pept Prot Res. 1990; 35: 161-214.

Fogaça AC et al. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. Peptides. 2006; 27: 667-74.

Fogaça AC, et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. Dev Comp Immunol. 2004; 28(3): 191-200.

Fukuzawa AH, et al. The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana.* Dev Comp Immunol. 2008; 32(6): 716-25.

Gao Y, et al. Whole transcriptome analysis provides insights into molecular mechanisms for molting in *Litopenaeus vannamei*. PLoS One. 2015; 10(12), e0144350.

Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res. 2003; 31: 3784-88.

Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol.*, **2,** 1-33.

Grabherr MG et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. Nat Biotechnol. 2011; 29(7): 644-52.

Gupta AP. Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods. New York: Wiley-Interscience Publications, 1986. 535 p.

Haine ER, Moret Y, Siva-Jothy MT, Rolff J. Antimicrobial Defense and Persistent Infection in Insects. Science. 2008 ; 322(5905) : 1257- 59.

Hancock RE, Brown KL, Mookherjee N. Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. Immunobiology. 2006 ; 211(4) : 315-22.

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.

Harumi FA. Envolvimento dos hemócitos na resposta imune da aranha caranguejeira Acanthoscurria gomesiana. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Hoffmann JA. Primitive immune systems. Immunol Rev. 2004 ; 198(1) : 5-9.

Hoffmann JA. The immune response of Drosophila. Nature. 2003 ; 426(6962) : 33-38.

Huang HW. Action of antimicrobial peptides: two-state model. Biochemistry. 2000; 39(29): 8347-52.

Imler JL, Bulet P. Antimicrobial Peptides in Drosophila: Structures, Activities and Gene Regulation. Chem Immunol and Allergy. 2005; 86: 1-21.

Irving P et al. New insights into Drosophila larval haemocyte functions through genome-wide analysis. Cell Microbiol. 2005; 7(3): 335-50.

Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. J Biochem Mol Biol. 2005; 38(2): 128-50.

Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(3): 491-511.

Jiravanichpaisal P, Lee BL, Oderhäll K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology. 2006; 211: 213–36.

Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. Anal Biochem. 1970; 34: 595-98.

Kanfu P et al. Two novel antimicrobial peptides from centipede venoms. Toxicon. 2010 ; 55 : 274-79.

Kesler RC et al. Long-term trends in the use of complementary and alternative medical therapies in the unites states. Complement Altern Med. 2001; 135: 262-68.

Kim K, Kim H, Park K, Cho K. Structural Characterization of a New Antibiotic Substance Purified from *Scolopendra Subspinipes Mutilans* L. Koch. J Korean Chem Soc. 1998; 42(2): 236-39.

Kong Y, Huang SL, Shao Y, Li S, Wei JF. Purification and characterization of a novel antithrombotic peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans.* J Ethnopharmacol. 2013; 145: 182–6.

Kuhn-Nentwig L, Müller J, Schaller J, Walz A, Margitta DM, Nentwig W. Cupiennin 1, a New Family of Highly Basic Antimicrobial Peptides in the Venom of the Spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). The J. of Biolog. Chem. 2002; 277: 11208-16.

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

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(6): 4085–92.

Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol. 2002; 32(10): 1295-1309.

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

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

Lorenzini DM, da Silva PI Jr, Soares MB, Arruda P, Setubal J, Daffre S. Discovery of immune-related genes expressed in hemocytes of the tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. Dev Comp Immunol. 2006; 30(6): 545-56.

Mars-Brisbin M, McElroy AE, Pales-Espinosa E, Allam B. Antimicrobial activity in the cuticle of the American lobster, *Homarus americanus*. Fish Shellfish Immunol. 2015; 44: 542-46.

Martin L, Ivancich A, Vita C, Formaggio F, Toniolo C. Solid phase synthesis of peptides containing the spin-labeled 2,2,6,6-tetrametylpiperidine-1-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid. J Pep Res. 2001; 58: 424-32.

Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. J Am Chem Soc. 1963; 14: 2149–154.

Minelli A, Bonato L, Dioguardi R, et al. Chilobase: a web resource for Chilopoda taxonomy. 2012 onwards.

Miyata T, et al. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. J Biochem. 1989; 106(4): 663-8.

Moon SS, et al. Jineol, a cytotoxic alkaloid fom the centipede *Scolopendra subspinipes*. J Nat Prod. 1996; 59(8), 777-79.

Moore AJ, BeazleyWD, BibbyMC, Devine DA. Antimicrobial activity of cecropins. J Antimicrob Chemother 1996; 37: 1077–89.

Nagai T, Kawabata S. A link between blood coagulation and prophenoloxidase activatin in arthropod host defense. J Biol Chem. 2000; 275: 29264-267.

Nagai T, Osaki T, Kawabata S. Functional conversion hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. 2001; J Biol Chem. 276: 27166-170.

Nappi AJ, Christensen BM. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. Insect Biochem Mol Biol. 2005;35(5): 443-59.

Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y. Nitric oxide involvement in Drosophila immunity. Nitric Oxide Biol Chem. 2000; 4: 423–30.

Nentwig KL. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. Cell Mol Life Sci. 2003; 60: 2651–68.

Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends Biotechnol. 2011; 29**:** 464-72.

O'Driscoll NH, et al. Production and evaluation of an antimicrobial peptide-containing wafer formulation for topical application. Curr Microbiol. 2013; 66: 271–8.

Pemberton RW. Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. J Ethnopharmacol. 1999; 65: 207-16.

Pereira LS, et al. Structural and biological characterization of one antibacterial aclypolyamine isolated from the hemocytes of the spider acanthocurria gomesiana. Biochem and Biophysical Res Comm. 2007; 352: 953–59.

Regier JC, et al. Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. Nature. 2010; 463: 1079-83.

Ren Y, Houghton P, Hider RC. Relevant activities of extracts and constituents of animals used in traditional Chinese medicine for central nervous system effects associated with Alzheimer's disease. J Pharm Pharmacol. 2006; 58: 989-96.

Riciluca KCT, et al. Rondonin: an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. Results Immunol, 2012; 2: 66-71

Roepstorff P, Fohlman J. Letter to the editors. Biol Mass Spectrom. 1984; 11(11): 601.

Ruppert EE; Barnes RD. Zoologia dos invertebrados. 6a ed. São Paulo : Editora Roca ; 2006. 1029 p.

Sadd BM, Schimdt-Hempel P. Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. Curr Biol. 2006; 16(12): 1206-10.

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

Seidler J, Zinn N, Boehm ME, Lehmann WD. De novo sequencing of peptides by MS/MS. Proteomics. 2010; 10(4): 634-49.

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

Silva Jr PI, Daffre S, Bulet P. Isolation and full 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 Biochem Chem. 2000 ; 275 ; 33464-70.

Söerhäll K, Smith VJ. Separation of the hemocyte opulation of Carcinus maenas and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Develop Comp Immunol. 1983; 7(2): 229-339.

Solon E, Gupta AP, Gaugler R. Signal transduction during exocytosis in Limulus polyphemus granulocytes. Dev Comp Immunol. 1996; 20(5): 307-21.

Strand MR, Pech LL. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. Ann Rev Entomol. 1995; 40: 31-56.

Strand MR. The insect cellular immune response. Insect Sci. 2008; 15: 01-14.

Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K, Dushay MS. Coagulation in arthropods, defense, wound closure and healing. Trends Immunol. 2004; 25(6): 289-94.

Turillazzi, S., et al. Dominulin A and B: two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp Polistes dominulus using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-Ion Trap. J Am. Soc Mass Spectrom. 2006; 17: 376-83.

Ulrich, T.; Schimidt, O.; Söderhäll, K.; Dushay, M. S. Coagulation in arthopods: defense, wound closure and healing. Trends Immunol. 2004; 25(6): 289-93.

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

Wenhua R, Shuangquan Z, Daxiang S, Kaiya Z, Guang Y. Induction, purification and characterization of an antibacterial peptide scolopendrin I from the venom of centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. Indian J Biochem Biophys. 2006 ; 43 : 88-93.

Xylander W, Nevermann L. Antibacterial Activity in the Hemolymph of Myriapods (Arthropoda). J of Invert. 1990; 56: 206-14.

Xylander W. Hemocytes in Myriapoda(Arthropoda) : A review. Research Report, Senckenberg Museum für Naturkunde Görlitz, Görlitz, Germany. 2009; 114-24.

Yang B. et al. Analysis of gene expression in the midgut of *Bombyx mori* during the larval molting stage. BMC Genomics. 2016; 17: 866.

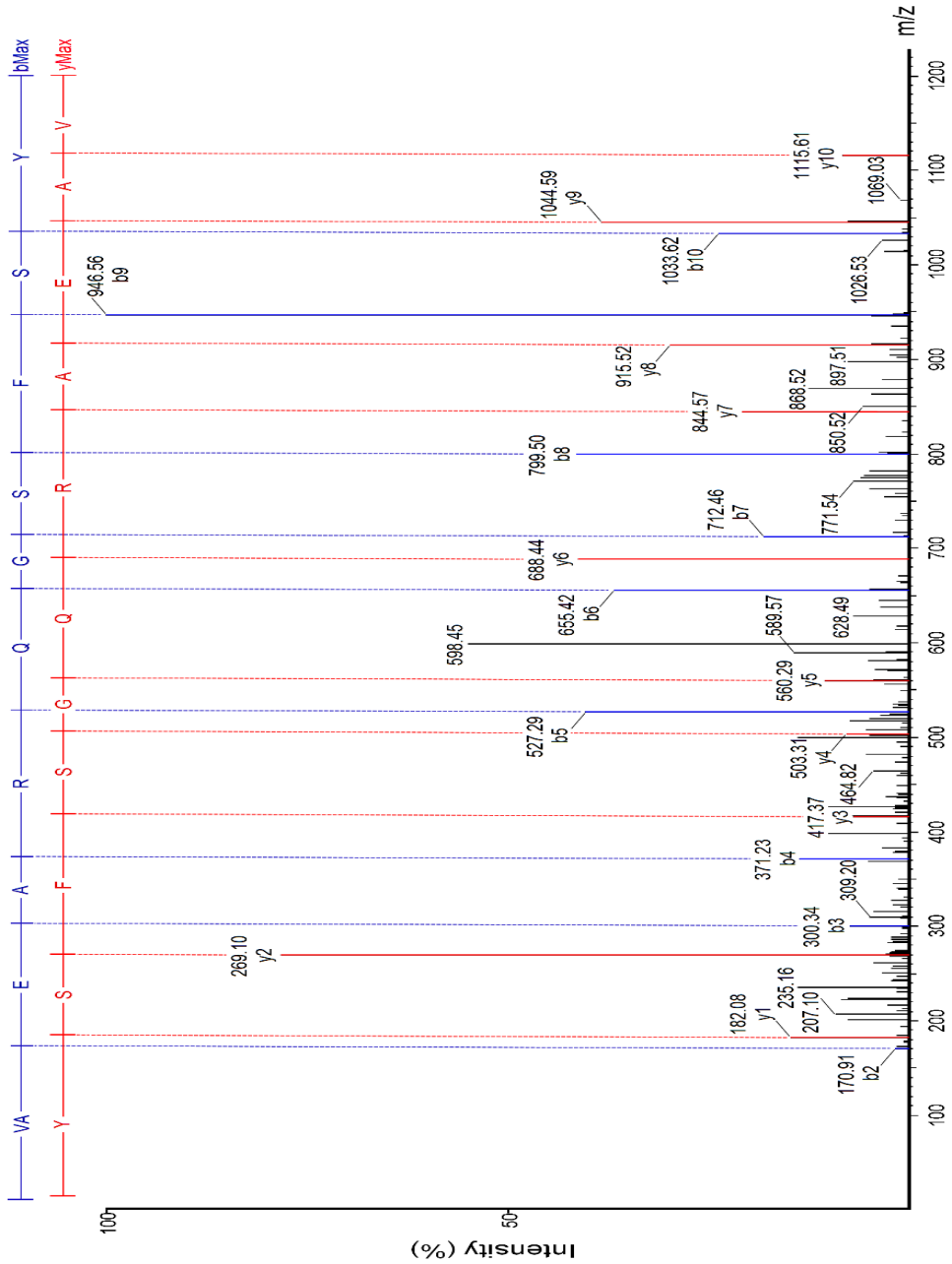
Yoon MA, et al. Antioxidant effects of quinoline alkaloids and 2,4-di-tert-butylphenol isolated from *Scolopendra subspinipes*. Biol Pharm Bull. 2006; 29(4): 735-39.

You WK. et al. Purification and Molecular Cloning of a Novel Serine Protease from the Centipede *Scolopendra subspinipes mutilans.* Insect Biochem Mol Biol. 2004; 34:239-50.

Yuen MF. et al. Traditional Chinese Medicine Causing Hepatotoxicity in Patients with Chronic Hepatitis B Infection: a 1- Year Prospective Study. Aliment Pharmacol Ther. 2006; 24: 1179-86.

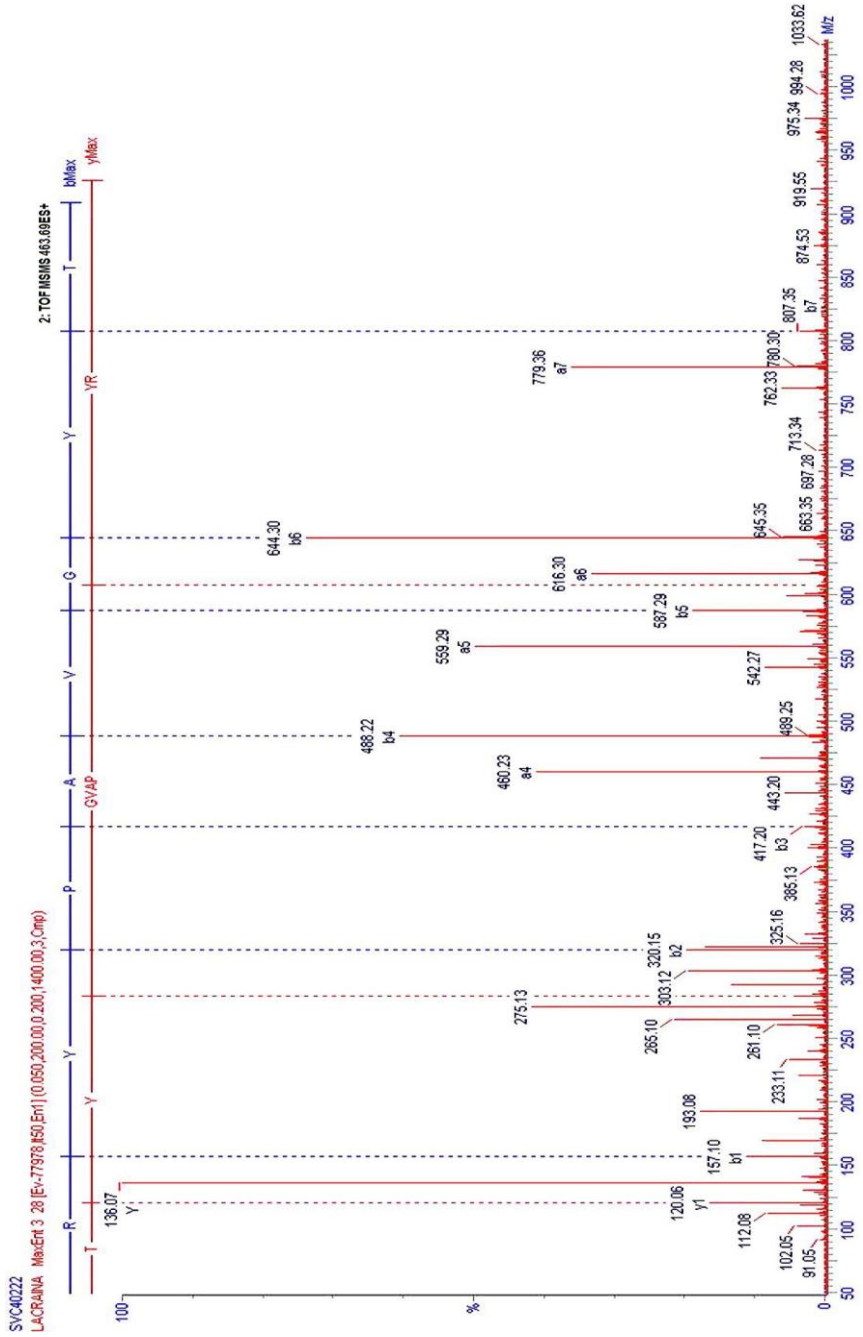
ANEXOS

A- Sequenciamento “De Novo” do peptídeo de 1214,3 Da Pinipesina.



Analise de espectrometria de Massa. Perfil representativo do sequenciamento “De Novo” da Pinipesina depois do análise obtido com um equipamento do tipo Q LTQ XL (Thermo Scientific). Os fragmentos apresentados correspondem às series **–b** e **–y.** Se obteve uma estrutura primaria conformada por 11 resíduos de aminoácidos: **VAEARQGSFSY.** Esse peptídeo foi nomeado **Pinipesina.** Os fragmentos internos do peptídeo sequenciado, cujos íons foram encontrados no espectro, estão representados com o código de uma letra de aminoácidos.

B- Sequenciamento “De Novo” do peptídeo de 925.439 Da Lacraina.



O espectro de DIC do peptídeo foi adquirido com diferenças de potenciais de 20 V na célula de colisão do seu íon com quatro cargas ([M+2H]+, m/z 463.69). Os íons pertencentes às séries -y (vermelho) e -b (azul), assinalados na parte superior do espectro, elucidaram sua estrutura primária conformada por 8 resíduos de aminoácidos: **RYPAVGT**. Esse peptídeo foi nomeado **Lacraina.** Os fragmentos internos do peptídeo sequenciado, cujos íons foram encontrados no espectro, estão representados com o código de uma letra de aminoácidos.

C- Lacrain: the first antimicrobial peptide from the body extract of the Brazilian centipede *Scolopendra viridicornis.* International Journal of Antimicrobial Agents 48 (2016) 277-285

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www. elsevier. com/locate/ijantimicag

Lacrain: the first antimicrobial peptide from the body extract of the Brazilian centipede *Scolopendra viridicornis*

E. Chaparro *, P.I. da Silva Junior

Special Laboratory of Applied Toxicology, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 December 2015
Accepted 21 May 2016

Keywords:
Scolopendra viridicornis
Myriapoda
Centipede
Body extract
Antimicrobial peptide
Immune system

ABSTRACT

Antimicrobial activities have previously been described by traditional Eastern medicine in Chilopoda body extracts, but until now no bioactive peptides have been described. In this study, a novel antimicrobial peptide, lacrain, was isolated from the body extract of the Brazilian Chilopoda *Scolopendra viridicornis.* The peptide was isolated by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Its ac-tivity was tested using a liquid growth inhibition assay and the peptide was characterised using mass spectrometry. Lacrain has a sequence composed of eight amino acid residues and a molecular mass of 925.5 Da. A synthetic peptide of the native lacrain had identical characteristics to those of the isolated material, confirming its sequence. The synthetic peptide was active only against Gram-negative bacte-ria, showing strong bactericidal activity. Moreover, the peptide did not present haemolytic activity against human erythrocytes. Lacrain represents a novel molecule with powerful antibacterial activity that could be used as a new template for the development of drugs against clinically resistant bacterial strains.

Chaparro).

1. Introduction

Arthropods constitute one of the oldest groups of organisms and are distributed across a broad range of ecosystems and habitats. Their success in colonising these environments is due in part to their immune systems, since most of the environments they inhabit show a high abundance of dangerous micro-organisms and pathogens [1].

Like other invertebrates, arthropods possess an innate immu-nity (unlike vertebrates, which have innate and adaptive immune responses), considered a primordial defence mechanism [2].

As a response to pathogens, the innate immune system of ar-thropods has evolved a complex arrangement of constitutive (in chelicerates) and inducible (in insects and crustaceans) antimicro-bial peptides (AMPs) that destroy a large variety of invading micro-organisms [3]. Many of these peptides have specific antimicrobial activity and serve as primary defences against invading eukary-otic and prokaryotic micro-organisms [4,5].

Isolation and characterisation of AMPs in organisms, including both plants and animals, has greatly increased in recent years. We now know the primary structure of more than 8164 AMPs (http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial; accessed 30 November 2015). The field of arthropodology has likewise experienced great advances, especially with respect to insects [6,7], arachnids [8], spiders [9,10] and ticks [11]. Despite these great advances, one group remains conspicuously understudied, namely the myriapods [12].

Myriapods are terrestrial arthropods that first appeared 420 million years ago in the early Silurian; they are found across the globe except in the Arctic and Antarctic Among the myriapods, species belonging to the genus *Scolopendra* (Scolopendromorpha, Chilopoda) live in habitats with high abundances of bacteria, fungi and other pathogens. Xylander documented the presence of sub-stances in their haemolymph exhibiting antibacterial activity, but these were never purified or characterised [13]. Three peptides with antimicrobial properties have been characterised in the venom of *Scolopendra subspinipes mutilans*, namely scolopendrin I [14], scolopin-1 and scolopin-2 [15].

In traditional Eastern medicine, *Scolopendra* body extract powder is known for its ability to reduce symptoms of deterioration of the central nervous system, apoplexy, tetanus and tuberculosis, among other diseases [16]. Studies have investigated the use of *S. subspinipes mutilans* powder to treat the symptoms of Alzheimer's disease [17] and stroke [18]. In northeast Brazil, *S. viridicornis* is used in region-al folk medicine as an analgesic [19].

Extensive study of whole centipede powder and centipede venom has resulted in the characterisation of various bioactive peptides [20,21]. To date, however, no study has examined body material in isolation from venom and haemolymph material.

In light of this, the aim of this study was to determine the pres-ence

* Corresponding author. Special Laboratory of Applied Toxicology, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil. Fax: +55 11 2627 9731.
E-mail addresses: relisacha@gmail.com; elisa.aguirre@butantan.gov.br (E.

of antimicrobial components in the full extract of *S. viridicornis*, a Brazilian myriapod from the order Chilopoda.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Fungal and bacterial strains were obtained from various sources. *Escherichia coli* SBS363 and *Micrococcus luteus* A270 were from the Institut Pasteur (Paris, France), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (strain Boston 41501), *P. aeruginosa* ATCC 29213, *Bacillus megaterium* ATCC 10778, *Serratia marcescens* ATCC 4112, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 were from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA), *Enterobacter cloacae* β-12 *and E. coli* D31 were from Stockholm University (Stock-holm, Sweden), *Salmonella* serovars and *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* were from the Special Laboratory of Applied Toxicology Culture Collection (Butantan Institute, São Paulo, Brazil), and *Sac-charomyces cerevisiae* PM340 (commercial strain) and *Candida albicans* MDM8 were from the Institute of Biomedical Sciences (Uni-versity of São Paulo, São Paulo, Brazil). The filamentous fungi
Aspergillus niger and *Beauveria bassiana* (an entomopathogenic fungus) were isolated from bread and a mummified spider, respectively.

2.2. Animals

S. viridicornis (order Scolopendromorpha) were kept alive in the vivarium of the Special Laboratory of Applied Toxicology (LETA) at Butantan Institute (São Paulo, Brazil) (Fig. 1). Animals were collect-ed under Permanent Zoological Material license no. 11024-3-IBAMA and Special Authorization for Access to Genetic Patrimony no. 001/2008.

2.3. Body extract fractionation and lacrain purification

Purification of potential AMPs was performed by first remov-ing the head, forceps and all of the haemolymph (by dorsal vessel puncture with an apyrogenic syringe) and then macerating the body in 2 M acetic acid (Synth, Diadema, Brazil). The sample was agi-tated on ice for 30 min and was centrifuged at 39,000 × *g* at 4 °C for 10 min. The supernatant was loaded onto Sep-Pak® C18 car-tridges (Waters Corp., Milford, MA) equilibrated in acidified water [trifluoroacetic acid (TFA) 0.05%]. Three elutions were obtained in 5%, 40% and 80% acetonitrile (ACN) (J.T.Baker®; Avantor Performance

Fig. 1. *Scolopendra viridicornis* (Scolopendromorpha, Chilopoda, Myriapoda).

Materials, Center Valley, PA) in acidified water (TFA 0.05%). The 40% Sep-Pak elution was concentrated in a vacuum centrifuge (SpeedVac™ Savant™; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and was reconstituted in Milli-Q water (Merck Millipore, São Paulo, Brazil) and directly subjected to reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a semi-preparative Jupiter® C18 column (Phenomenex International, Torrance, CA) equilibrated at room temperature with 0.05% TFA in water. The sample was puri-fied using ACN/water/0.05% TFA gradients of 2%–60% ACN over 60 min at a flow rate of 1.5 mL/min. Ultraviolet (UV) absorbance was monitored at 225 nm (modified from Ref. [12]). The eluted peak fractions were collected manually and were vacuum dried before being subjected to antimicrobial activity assays and deter-mination of amino acid sequence. Fractions with antimicrobial activity (lacrain) were further purified using a linear gradient from 15% to 32% ACN at a flow rate of 1 mL/min for 60 minutes on an analytical Jupiter® C18 column (Phenomenex International). Peptide purity was confirmed by mass spectrometry and amino acid sequencing.

2.4. Antimicrobial assays

During the purification procedure, the antimicrobial activities of the samples were monitored by liquid growth inhibition assays against Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria, fungi and yeast (Table 1). Bacteria were cultured in poor nutrient broth (PB) (1.0 g peptone in 100 mL of water containing 86 mM NaCl at pH 7.4; 217 mOsm), and the fungi and yeast were cultured in poor potato dextrose broth (1/2-strength PDB) (1.2 g potato dextrose in 100 mL of water at pH 5.0; 79 mOsm). Determination of antimi-crobial activity was performed using a five-fold microtitre broth dilution assay in 96-well sterile plates (Shanghai Beiyi Bioequip Information Co., Ltd., Shanghai, China) at a final volume of 100 μL. Mid log-phase cultures were diluted to a final concentration of 1×10^3 CFU/mL for bacteria and 1×10^4 CFU/mL for fungi [6,22]. Dried frac-tions were dissolved in 200 μL of ultrapure water and then 20 μL was aliquoted into each well with 80 μL of the bacterial dilution. Fractions were tested in duplicate. Sterile water and PB solution were used as controls. Tetracycline was also used as a control of growth inhibition. Microtitre plates were incubated for 18 h at 30 °C.

Table 1
Antimicrobial activity spectrum of lacrain.

Micro-organism	MIC (μg/mL)[a]	MBC (μg/mL)[a]
Gram-positive bacteria		
Bacillus megaterium	ND	NT
Staphylococcus aureus ATCC 29213	ND	NT
Micrococcus luteus A270	ND	NT
Gram-negative bacteria		
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	5.8 (6.25 μM)	11.6(12.5 μM)
Alcaligenes faecalis ATCC 8750	5.8 (6.25 μM)	5.8(6.25 μM)
Serratia marcescens ATCC 4112	5.8 (6.25 μM)	5.8(6.25 μM)
Enterobacter cloacae β-12	2.9 (3.12 μM)	2.9(3.12 μM)
Salmonella serovars	5.8 (6.25 μM)	11.6(12.5 μM)
Salmonella enterica subsp. *arizonae*	5.8 (6.25 μM)	5.8(6.25 μM)
Escherichia coli SBS363	5.8 (6.25 μM)	5.8(6.25 μM)
E. coli D31	5.8 (6.25 μM)	5.8(6.25 μM)
Fungi		
Beauveria bassiana	ND	NT
Aspergillus niger	ND	NT
Yeast		
Candida albicans MDM8	ND	NT
Saccharomyces cerevisiae PM340	ND	NT

MIC, minimum inhibitory concentration; MBC, minimum bactericidal concentra-tion; ND, not detected (activity not detected in the range assayed); NT, not tested. [a] The MIC and MBC refer to the concentrations necessary to achieve 100% growth inhibition and bactericidal activity, respectively.
The highest concentration tested was 92.8 μg/mL (100 μM).

Growth inhibition was determined by measuring absorbance at 595 nm.

2.5. Mass spectrometry analysis

Lacrain was subjected to matrix-assisted laser desorption/ ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) analysis on an Ettan MALDI-TOF Pro mass spectrometer (Amersham Biosci-ences, Uppsala, Sweden) operating in reflectron [for mass/charge (m/z) values from 500–1000] and positive mode, which detects positively charged ions. A saturated solution of α-ciano-4-hydroxycinnamic acid in ACN/water 1:1 was used as a matrix. The lacrain amino acid sequence was determined by standard de novo sequencing techniques [23] based on the spectrum obtained by electrospray ionisation-quadrupole-time of flight/mass spec-trometry (ESI-Q-TOF/MS) analysis using a Q-TOF Ultima™ API (Waters/Micromass UK Ltd., Manchester, UK) linked to a liquid chro-matography source of nanoscale nanoACQUITY UltraPerformance LC® (Waters Corp.).

2.6. Circular dichroism (CD) spectroscopy

CD spectroscopy measurements were performed on a Jasco J-810 circular dichroism spectropolarimeter (Jasco Corp., Tokyo, Japan) for UV (195–250 nm). CD spectra were recorded after eight accumu-lations at 20 °C using a 0.5-mm path length quartz cell between 250 nm and 195 nm at 50 nm/min at a bandwidth of 0.5 nm. All pep-tides were analysed in 0%, 10%, 30% and 50% trifluoroethanol (TFE) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) in water. Background effects were minimised by Fourier transformation.

2.7. Peptide synthesis of lacrain

Synthetic lacrain was obtained by solid-phase peptide synthe-sis using the Fmoc procedure [24]. The peptide was purified by reverse phase (Shim-pack Prep-ODS, 5 μm, 20 mm × 250 mm; Shimadzu Co., Kyoto, Japan) semi-preparative HPLC, and the purity and identity of the peptide were confirmed by MALDI-TOF/MS and analytical HPLC using the conditions described above. Peptide syn-thesis was performed in the Organic Synthesis facility of the Special Laboratory of Applied Toxicology at the Butantan Institute.

2.8. Minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) of lacrain

The MIC is defined as the minimum concentration of peptide re-quired to achieve 100% growth inhibition [25]. The MIC was determined using the synthetic peptide against Gram-negative bac-terial strains, Gram-positive bacterial strains, fungi and yeast strains as described above (Sections 2.1 and 2.4). The synthetic peptide was dissolved in sterile Milli-Q water at a final concentration of 1 mM. Determination of MICs for lacrain was performed using a serial di-lution in 96-well sterile plates at a final volume of 100 μL, where 20 μL of the peptide was applied to each well at a serial dilution of two-fold microtitre broth dilution and added to 80 μL of the bacterium/yeast dilution (modified from Ref. [8]). The lowest con-centration without visible growth following incubation at 30 °C for 18 h was defined as the MIC. MBCs were determined after 96 h of incubation at 30 °C. The lowest concentration with no visible growth was defined as the MBC, indicating 99.5% killing of the original in-oculum. Microbial growth was measured by monitoring the increase in optical density at 595 nm using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) microplate reader (modified from Ref. [26]). Assays were performed in triplicate.

2.9. Haemolytic activity

The haemolytic activity of lacrain was tested using human erythrocytes from a healthy adult donor. A 3% (v/v) suspension of washed erythrocytes in phosphate-buffered saline (PBS) was incubated with lacrain at concentrations ranging from 0.5 μM to 500 μM in a 96-well plate for 3 h at 37 °C with intermittent shaking. Absorbance in the supernatant was measured at 414 nm. The haemolysis per-centage was expressed in relation to a 100% lysis control (erythrocytes incubated with 0.1% Triton X-100); PBS was used as a negative control. Assays were conducted in triplicate.

2.10. Lacrain analysis with bioinformatics tools

The lacrain sequence was submitted to searches for similarity against other proteins on the public database from the National Center for Biotechnology (NCBI) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/; accessed 9 March 2015) as well as databases accessible through the Bioinformatics Resource Portal ExPASy of the Swiss Institute of Bioinformatics website (http://www.expasy.org/). The physico-chemical param-eters of the sequences (such as the isoelectric point) were calculated using the ProtParam tool available through the same bioinformat-ics portal [27] as well as through the Swiss Institute of Bioinformatics website (http://web.expasy.org/protparam/; accessed 9 March 2015). Finally, the peptide sequence and structure prediction tool ProFunc, accessed through the European Bioinformatics Institute (http:// www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/profunc/; accessed 1 March 2015), was used to elucidate the potential chemical primary struc-ture, and the PyMOL Molecular Graphics System was used to obtain the three-dimensional (3D) image of the secondary structure of lacrain.

3. Results and discussion

3.1. Purification of lacrain from the body extract of S. viridicornis

The body extract from three centipedes was processed as previously described. The supernatant obtained after centrifugation was applied to a Sep-Pak® C18 cartridge for pre-purification. From this, three fractions eluted at 5%, 40% and 80% ACN (with TFA 0.05%) were acquired. The elution at 40% ACN was separated into at least 40 dif-ferent components by RP-HPLC (Fig. 2) and all fractions were analysed in the liquid growth inhibitory assay using M. luteus A270, E. coli SBS363 and C. albicans MDM8.

The fraction eluting at 40% ACN was selected for the forward analysis because it contains a higher protein concentration than the fractions eluting at 5% and 80% ACN. In addition, previous studies have shown that several peptides with antimicrobial activity often elute around 40% ACN [10,28].

Eight fractions (1–8) were found that showed antimicrobial ac-tivity (Fig. 2A). All except fraction 2 showed activity only against the Gram-negative bacterium E. coli. Fraction 2 showed activity only against the Gram-positive bacterium M. luteus.

These novel antimicrobial molecules represent an exciting new source of bioactive peptides. Until now, the most common arthro-pod sources of AMPs have been venom [28–30] or haemolymph [8–10], but the animal body has not often been examined for AMPs. Is important to mention that in several studies of small inverte-brates such as ants and flies, the total animal extract is analysed for AMPs; however, the haemolymph and venom glands are not removed from the animal so it is possible that the peptides found are actually from these sources [31,32].

For this study, we chose to purify and characterise fraction 4 (Fig. 2B). This fraction was named lacrain, in reference to the common name for centipedes in Portuguese (lacraia).

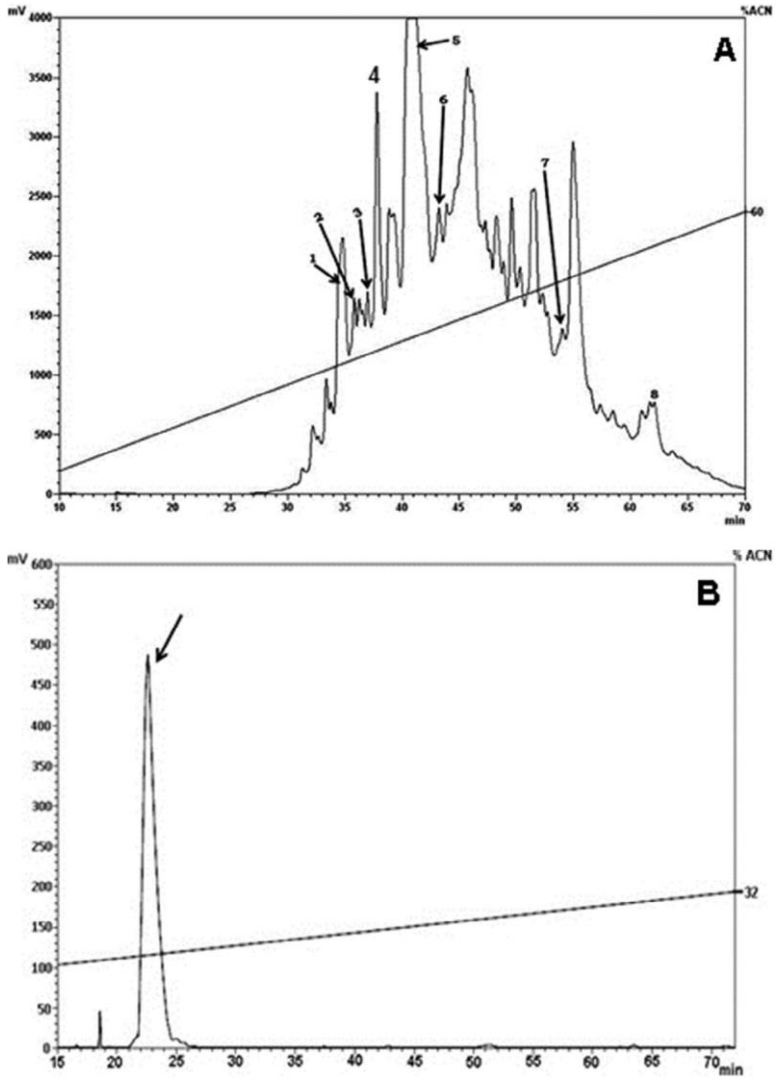


Fig. 2. Purification of lacrain from the full body extract by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). An acidic extract obtained from Scolopendra viridicornis bodies was submitted to solid-phase extraction on Sep-Pak® C18 cartridges. (A) The fraction that eluted at 40% acetonitrile (ACN) was analysed on a semi-preparative Jupiter® C18 column with a linear gradient from 2% to 60% ACN in acidified water over 60 min at a flow rate of 1.5 mL/min. Numbered peaks indicate fractions exhibiting antimicrobial activity. (B) Fraction 4 was re-chromatographed on the same machine using an analytical Jupiter® C18 column and run from 15% to 32% ACN in acidified water. The arrow indicates the lacrain fraction.

3.2. MALDI-TOF and LC/MS analysis

Following homogenisation of fraction 4 (lacrain), MALDI-TOF analysis showed a single molecule with a m/z of 926.439 Da. The isotopic pattern showed peaks spaced at 1 Da, indicating that the ions are mono-charged and confirming the molecular mass of the peptide (Fig. 3).

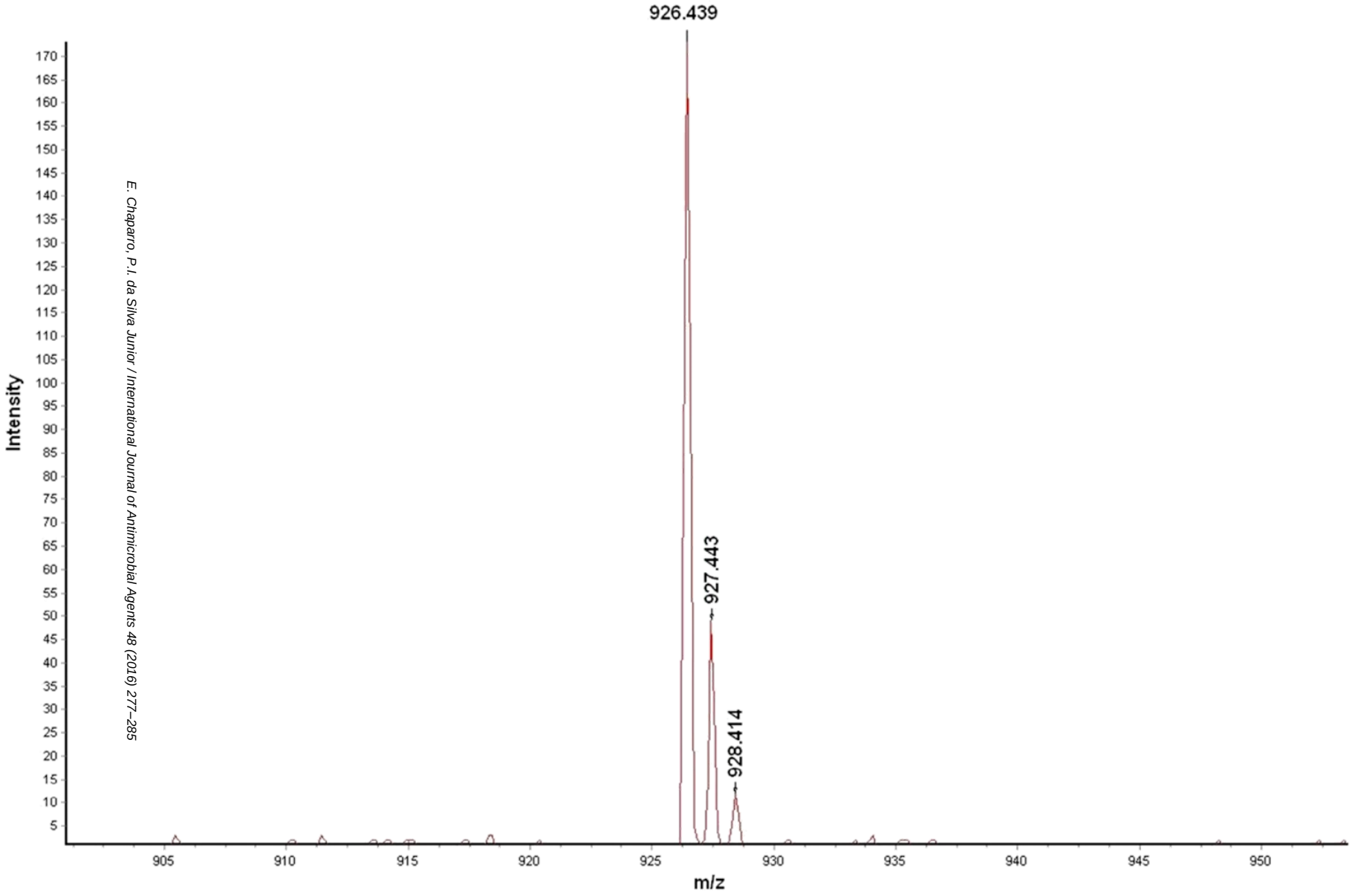
Characterisation of the primary structure of the peptide by de novo sequencing was performed by interpretation of the spectra of collision-induced dissociation (CID) of the 925.5 Da molecule ob-tained with the CID energies (Ecol) on different potential differences of 15 V and 20 V of its doubly charged ion ([M + 2H] 2 + , m/z 463.69). This analysis revealed a sequence of eight amino acids, RYPAVGYT (Fig. 4).

An interesting characteristic of this peptide is that its primary structure has only eight amino acids, with a low molecular mass (<1 kDa). The earliest studies of Chilopoda body extract showed only low-molecular-mass molecules lacking protein nature, such as jineol, an alkaloid with cytotoxic activity and a molecular mass of 161.05 Da [33], and centipedin, which has a molecular weight of 162.1 Da and a strong activity against the Gram-negative bacterium Klebsiella pneumoniae [34].

3.3. Antimicrobial activity and minimal inhibitory activity

Synthetic lacrain was tested for antimicrobial activity against three species of Gram-positive bacteria, seven species of Gram-negative bacteria, two species of fungi and two species of yeast (Table 1). All Gram-negative bacteria species tested were sensitive to lacrain, which was active at concentrations between 5.8 μg/mL (6.25 μM) and 2.9 μg/mL (3.12 μM). Enterobacter cloacae was the most sensitive to the peptide, with an MIC and MBC of 2.9 μg/mL (3.12 μM). The syn-thetic peptide did not show antimicrobial activity against the Gram-positive bacteria, fungi or yeast strains at the range of concentrations investigated (Table 1).

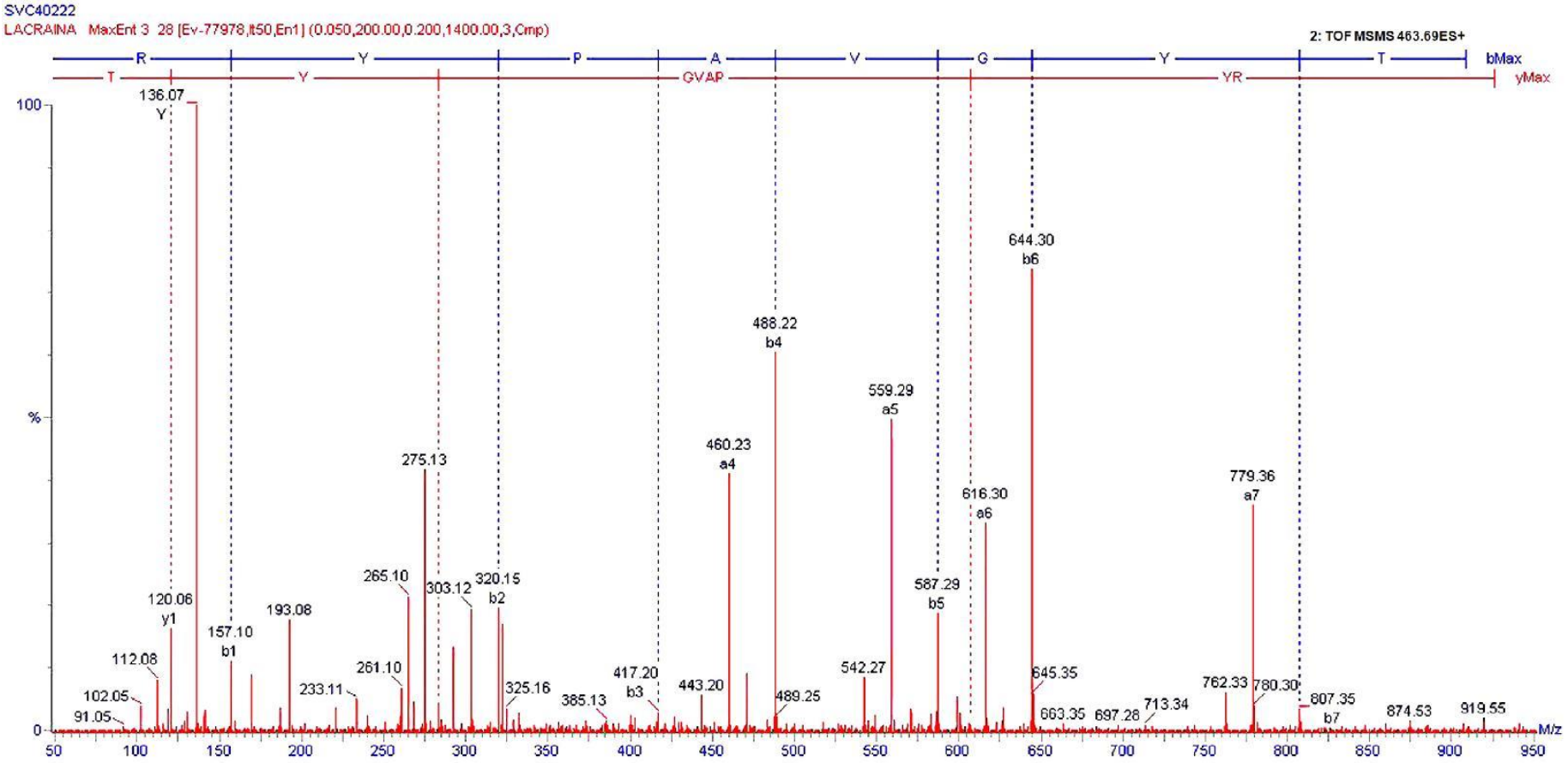
Two different strains of E. coli were tested. They showed the same inhibitory activity regardless of the different resistances of each strain. SBS 363 strain is commonly used to identify the antimicrobial ac-tivity of different peptides [8–10,28] and D31 strain already has reported resistance against streptomycin and ampicillin [35].



E. Chaparro, P.I. da Silva Junior / International Journal of Antimicrobial Agents 48 (2016) 277–285

Fig. 3. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) spectrum of fraction **4** (lacrain). Analysis of fraction **4** by mass spectrometry revealed a molecule with an m/z of 926.439 Da.

Fig. 4. Representative de novo sequencing of lacrain. Collision-induced dissociation spectrum from mass/charge (m/z) of its doubly charged ion ([M + 2H] 2 + , m/z 463.69). The ions belonging to y (red) and b (blue) series, marked at the top of the spectrum, corresponded to the primary structure: RYPAVGYT. Internal fragments of the sequenced peptide, whose ions were found in the spectrum, are represented by standard amino acid code letters. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



Compared with other peptides isolated from arthropods, such as gomesin, the lacrain MICs described against Gram-negative bac-teria are higher. However, lacrain presented antimicrobial activity against *S. marcescens* [MIC = 5.8 μg/mL (6.25 μM)] that was not ob-served for gomesin or androctonin (activity tested at the highest concentration of 100 μM and 50 μM correspondingly) [8,9]. Com-pared with the antimicrobial activity of the isolated *Androctonus australis* peptide androctonin, lacrain shows a more restricted ac-tivity but has a stronger effect against the Gram-negative bacteria. Because of the bactericidal activity described, we believe that lacrain could have specific Gram-negative targets.

The antimicrobial activity of centipede body extract has already been described in traditional Eastern medicine, where *S. subspinipes mutilans* powder is used as a medicine to treat the symptoms of various diseases such as rheumatic pains, colds and seizures and for the prevention of cancer. Its water absorption capacity can prevent and treat fungal and bacterial tuberculosis and skin mycoses [16,36]. Nevertheless, until the current study, no AMPs were characterised from the body of these animals.

It will be interesting to investigate new activities and applica-tions for this novel synthetic peptide. Other peptides with several bioactivities are often reported in the literature, such as cecropin, an AMP from the giant silk moth (*Hyalophora cecropia*) that exhib-its activity against Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria [37] and viruses, including herpes simplex virus (HSV), human im-munodeficiency virus (HIV) and the Junin virus [38].

3.4. Haemolytic activity

To elucidate whether lacrain has any effect on human red blood cells at antimicrobial concentrations, its haemolytic activity was as-sessed. No haemoglobin release was observed following incubation of human erythrocytes from a healthy donor with various concen-trations of the peptide for 3 h at 37 °C. This indicates that lacrain does not cause lysis of human erythrocytes.

This suggests that the mode of action of lacrain does not involve disruption of microbial cell membranes. It also makes lacrain a po-tential template for development of new drugs against bacterial strains resistant to current medications.

3.5. Circular dichroism spectroscopy

TFE concentration and pH do not appear to contribute to the sec-ondary structure, as all CD spectra showed similar shapes (Fig. 5).

Lacrain appears to have a well-defined structure, although it is a short linear peptide with a high degree of freedom. This is due to its primary structure, in which the non-polar amino acids appear to neutralise the influence of charged amino acids, leaving proline as the only element of structural influence. The pH spectra of lacrain also showed little variation in secondary structure. In the pH range studied, the carboxy-terminal tends to remain non-protonated, main-taining the negative charge of the carboxylate group, and the N-terminal and the protonated arginine side group retain a posi-tive charge. The folding promoted by proline could enhance the interaction of the two regions of opposite charges, allowing stabilisation of the structure. Spectroscopy analyses such as nuclear magnetic resonance (NMR) are required, however, to confirm the structure.

3.6. Structure and physicochemical characteristics of lacrain

Important physicochemical characteristics of lacrain were pre-dicted using proteomic and peptidomic bioinformatics tools. Sequence analysis using the ProtParam tool in ExPASy yielded a po-tential isoelectric point (pI), molar extinction coefficient and net charge among other peptide properties (Table 2). The peptide

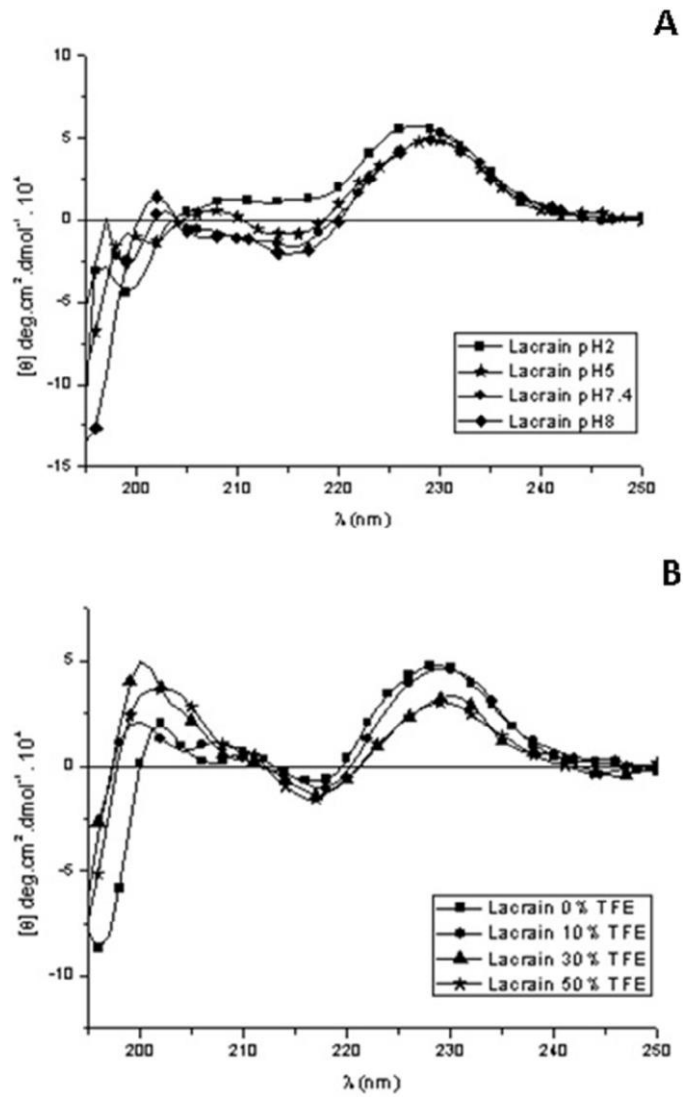


Fig. 5. Lacrain circular dichroism (CD) spectra. (A) Variation of lacrain CD spectra at different pH values. (B) Variation of lacrain CD spectra at different concentra-tions of trifluoroethanol (TFE).

remained intact for up to 1 h in human reticulocytes (in vitro) and 2 min both in yeast and the Gram-negative bacterium *E. coli* (in vivo). This is likely due to the presence of an Arg (R) residue at the N-terminus.

The peptide has cationic characteristics (net charge of +1) and a high isoelectric point (pI 8.59), properties shared by the majori-ty of known AMPs [39,40].

Table 2
Primary structure and other physicochemical parameters of lacrain.

Theoretical isoelectric point (pI)	8.59
Net charge	+1
Molar extinction coefficient (ε)	2980 M^{-1} cm^{-1} [a]
Aliphatic index	48.75
GRAVY (grand average of hydropathicity)	−0.475 [b]
Instability index	6.99 [c]

Physicochemical parameters calculated using the ProtParam tool in ExPASy (http://web.expasy.org/protparam/; accessed 9 March 2015).

[a] This protein does not contain any tryptophan (Trp) residues. Experience shows that this could result in >10% error in the computed extinction coefficient.
[b] A negative GRAVY value indicates that the molecule is hydrophilic.
[c] The value obtained for the instability index rates this peptide as stable.

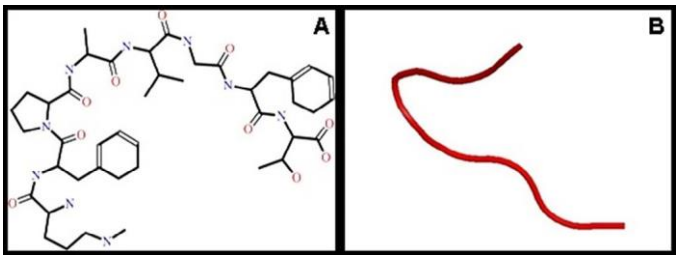


Fig. 6. Structure of lacrain. (A) Primary structure of lacrain as predicted by the ProFunc tool. (B) Secondary structure of lacrain as predicted by sequence analysis using the PyMOL Molecular Graphics System.

To elucidate the primary and secondary structure using the peptide sequence, the ProFunc structure prediction tool (Europe-an Bioinformatics Institute) was used, which models potential chemical primary structure (http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/ databases/profunc/). Using PyMOL Molecular Graphics System, a 3D rendering of the secondary structure of lacrain was obtained (Fig. 6).

Owing to the sequence's small size, it is unlikely that this peptide can form structures such as α-helix or β-sheets. This also may be why no structure–function similarities with other peptides or pro-teins were found.

Thorough searches against several databases failed to uncover any sequence similarities between lacrain and any other pub-lished molecular sequence, suggesting that lacrain is a completely novel AMP that has never been described in any organism.

4. Conclusions

We describe a new AMP extracted from the body of the Brazil-ian Chilopoda *S. viridicornis* that exhibits specific activity against Gram-negative bacteria. Lacrain is a peptide composed of just eight amino acid residues (RYPAVGYT) with a molecular mass of 925.5 Da. Owing to its small size, lacrain appears to have a well-defined struc-ture and can be synthesised quickly. Also, this new peptide exhibits no cytotoxic activity against human erythrocytes. Lacrain may rep-resent a new target for the development of new antibiotics. It is worth noting that this new molecule is the first described peptide from the body extract of a myriapod to exhibit antimicrobial ac-tivity. Lacrain represents an exciting new molecule from a taxon that is rarely subjected to such investigation.

Acknowledgments

The authors are thankful to Dr Antonio Miranda and Dr Flávio Lopes [Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil] for their help with the circular dichroism analysis. The authors also thank Eric Green, Sonia Hernandez and Thais Costella, who sig-nificantly improved the English of the manuscript, as well as the two referees and editor for their valuable comments that have con-siderably improved the paper.

Funding: Financial support was received from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (2013/07467-1), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Su-perior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (472744/2012-7).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Animals were collected under Permanent Zoo-logical Material license no. 11024-3-IBAMA and Special Authorization for Access to Genetic Patrimony no. 001/2008.

References

[1] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr Opin Immunol 1998;10:23–8.

[2] Hoffman JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science 1999;284:1313–18.

[3] Kuhn-Nentwig L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. Cell Mol Life Sci 2003;60:2651–68.

[4] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 2002;415:389–95.

[5] Hancock REW, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends Microbiol 2000;8:402–10.

[6] Bulet P. Strategies for the discovery, isolation, and characterization of natural bioactive peptides from the immune system of invertebrates. Methods Mol Biol 2008;494:9–29.

[7] Haine ER, Moret Y, Siva-Jothy MT, Rolff J. Antimicrobial defense and persistent infection in insects. Science 2008;322:1257–9.

[8] Ehret-Sabatier L, Loew D, Goyffon M, Fehlbaum P, Hoffmann JA, van Dorsselaer A, et al. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. J Biol Chem 1996;271:29537–44.

[9] Silva PI Jr, Daffre S, Bulet P. Isolation and full 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 2000;275:33464–70.

[10] Riciluca KCT, Sayegh RSR, Melo RL, Silva PI Jr. Rondonin an antifungal peptide from spider *(Acanthoscurria rondoniae)* haemolymph. Results Immunol 2012;2:66–71.

[11] Fogaça AC, Almeida IC, Eberlin MN, Tanaka AS, 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 2006;27:667–74.

[12] Undheim EA, King GF. On the venom system of centipede (Chilopoda), a neglected group of venomous animals. Toxicon 2011;57:512–24.

[13] Xylander WER. Physico-chemical properties of haemolymph of Chilopoda and Diplopoda (Myriapoda, Arthropoda): protein content, pH, osmolarity. Soil Organisms 2009;81:431–9.

[14] Wenhua R, Shuangquan Z, Daxiang S, Kaiya Z, Guang Y. Induction, purification and characterization of an antibacterial peptide scolopendrin I from the venom of centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. Indian J Biochem Biophys 2006;43:88–93.

[15] Peng K, Kong Y, Zhai L, Wu X, Jia P, Liu J, et al. Two novel antimicrobial peptides from centipede venoms. Toxicon 2010;55:274–9.

[16] Pemberton RW. Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. J Ethnopharmacol 1999;65:207–16.

[17] Ren Y, Houghton P, Hider RC. Relevant activities of extracts and constituents of animals used in traditional Chinese medicine for central nervous system effects associated with Alzheimer's disease. J Pharm Pharmacol 2006;58:989–96.

[18] Xiao P-G, Liu C-X. Pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of Chinese traditional medicine for stroke therapy. Asian J Drug Metabol Pharmacokinet 2005;5:83–124.

[19] de Oliveira HF, da Costa CF, Sassi R. Injuries caused by venomous animals and folk medicine in farmers from Cuité, State of Paraiba, Northeast of Brazil. Rev Bras Epidemiol 2013;16:633–43.

[20] You WK, Sohn YD, Kim KY, Park DH, Jang Y, Chung KH. Purification and molecular cloning of a novel serine protease from the centipede, *Scolopendra subspinipes mutilans*. Insect Biochem Mol Biol 2004;34:239–50.

[21] Kong Y, Huang SL, Shao Y, Li S, Wei JF. Purification and characterization of a novel antithrombotic peptide from *Scolopendra subspinipes mutilans*. J Ethnopharmacol 2013;145:182–6.

[22] Hetru C, Bulet P. Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. Methods Mol Biol 1997;78:35–49.

[23] Seidler J, Zinn N, Boehm ME, Lehmann WD. De novo sequencing of peptides by MS/MS. Proteomics 2010;10:634–49.

[24] Atherton E, Sheppard RC. Solid phase peptide synthesis—a practical approach. 1st ed. Oxford, UK: Oxford University Press; 1989.

[25] Zhu WL, Song YM, Park Y, Park KH, Yang ST, Kim JI, et al. Substitution of the leucine zipper sequence in melittin with peptoid residues affects self-association, cell selectivity, and mode of action. Biochim Biophys Acta 2007;1768:1506–17.

[26] O'Driscoll NH, Labovitiadi O, Cushnie TPT, Matthews KH, Mercer DK, Lamb AJ. Production and evaluation of an antimicrobial peptide-containing wafer formulation for topical application. Curr Microbiol 2013;66:271–8.

[27] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM, editor. The proteomics protocols handbook. Humana Press; 2005. p. 571–607.

[28] Ayroza G, Ferreira ILC, Sayegh RSR, Tashima AK, da Silva PI Jr. Juruin: an antifungal peptide from the venom of the Amazonian Pink Toe spider, *Avicularia juruensis*, which contains the inhibitory cysteine knot motif. Front Microbiol 2012;3:324.

[29] Kuhn-Nentwig L, Müller J, Schaller J, Walz A, Dathe M, Nentwig W. Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). J Biol Chem 2002;277:11208–16.

[30] Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, He W, Norton RS, et al. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. Biochem J 2001;359:35–45.

[31] Imler JL, Bulet P. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. Chem Immunol Allergy 2005;86:1–21

[32] Bulet P, Stöcklin R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. Protein Pept Lett 2005;12:3–11.
[33] Moon SS, Cho N, Shin J, Seo Y, Lee CO, Choi SU. Jineol, a cytotoxic alkaloid from the centipede *Scolopendra subspinipes*. J Nat Prod 1996;59:777–9.
[34] Kim K, Kim H, Park K, Cho K. Structural characterization of a new antibiotic substance purified from *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch. J Korean Chem Soc 1998;42:236–9.
[35] Breckenridge L, Gorini L. Genetic analysis of streptomycin resistance in *Escherichia coli*. Genetics 1970;65:9–25.
[36] Yoon MA, Jeong TS, Park DS, Xu MZ, Oh HW, Song KB, et al. Antioxidant effects of quinoline alkaloids and 2,4-di-tert-butylphenol isolated from *Scolopendra subspinipes*. Biol Pharm Bull 2006;29:735–9.
[37] Moore AJ, Beazley WD, Bibby MC, Devine DA. Antimicrobial activity of cecropins. J Antimicrob Chemother 1996;37:1077–89.
[38] Albiol Matanic VC, Castilla V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. Int J Antimicrob Agents 2009;23:382–9.
[39] De Simone SG, Souza ALA. Peptídeos microbicidas: Uma alternativa viável para a terapia antimicrobiana [Microbial peptides: a viable alternative to antimicrobial therapy]. Brazil: Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento; 2002. p. 12–16.
[40] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat Rev Microbiol 2005;3:238–50