

**Paula Jimena Segura Ramírez**

**Análise transcriptômica e proteômica da resposta imune inata em diplópodes  
(*Rhinocricus* sp.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia - Universidade de São Paulo / Instituto Butantan / Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior

Versão original

São Paulo  
2021

## Resumo

Segura-Ramírez PJ. Análise transcriptômica e proteômica da resposta imune inata em diplópodes (*Rhinocricus* sp.). [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2021.

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos da medicina no último século, atualmente as doenças infecciosas e a resistência antimicrobiana representam um dos maiores desafios da saúde em escala mundial. Em vista disso, as pesquisas destinadas a descobrir novas fontes de antibióticos não convencionais têm-se tornado cada vez mais frequentes. Nesse contexto, os diplópodes surgem como uma fonte promissora de moléculas com potencial antimicrobiano. Pouco se sabe sobre sua resposta imune contra microrganismos patogênicos, o que é muito intrigante considerando que o sucesso evolutivo dos diplópodes se deve em grande parte a esse primitivo sistema de defesa, pois permitiu que colonizassem uma grande variedade de microhabitats caracterizados pela alta proliferação microbiana. Partindo do exposto acima, o objetivo deste trabalho foi estudar a resposta imune inata do diplópode *Rhinocricus* sp. mediante a aplicação de ferramentas transcriptômicas e proteômicas. Para a análise transcriptômica, os espécimes coletados foram separados em dois grupos: experimental (diplópodes imunizados com LPS) e controle (diplópodes não imunizados). Após 48 h, a hemolinfa de ambos os grupos foi extraída, os hemócitos foram obtidos e o transcriptoma das células imunes foi sequenciado. Dos 9.398 transcritos resultantes, 126 foram agrupados em uma categoria denominada “Componentes imunológicos”, realizando anotação manual. Entre esses transcritos, 21 (17%) não mostraram alterações nos níveis de expressão, enquanto a expressão de 105 (83%) foi alterada pela inoculação de LPS. Especificamente, a expressão de 70 (55%) desses transcritos foi regulada positivamente e a de outros 35 (28%) foi regulada negativamente. Vale destacar que, os 126 transcritos foram divididos em subcategorias correspondentes a diferentes respostas defensivas, das quais a coagulação e a melanização apresentaram as maiores porcentagens de expressão relativa. Para a análise proteômica, a hemolinfa foi extraída e dois tipos de amostras foram obtidos: plasma e hemócitos. As amostras foram pré-fracionadas e as eluições resultantes foram submetidas à CLAE-FR. A atividade antimicrobiana das frações cromatográficas foi avaliada através de ensaios de inibição de crescimento em meio líquido contra *Escherichia coli* SBS 363, *Micrococcus luteus* A270, *Candida albicans* MDM8 e *Aspergillus niger*. Posteriormente, as frações antimicrobianas foram analisadas por espectrometria de massas. No total, 4 peptídeos com atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos foram isolados e denominados RP40–16, RP40–19, RP40–20/1 e RP40–20/2. Nessas moléculas, foi observada uma ausência de efeitos citotóxicos contra células Vero e de efeitos hemolíticos contra eritrócitos humanos. A análise com ferramentas bioinformáticas sugeriu que esses peptídeos podem estar encriptados em proteínas maiores presentes no plasma, das quais podem ser liberados pela ação de proteases endógenas. Vale mencionar que, a consulta no banco de dados de proteínas criado durante a anotação funcional do transcriptoma revelou que, os 4 peptídeos coincidem com fragmentos específicos de proteínas depositadas no banco de dados. Em conclusão, a aplicação de ferramentas transcriptômicas e proteômicas no estudo da resposta imune inata de *Rhinocricus* sp., ampliou o conhecimento existente sobre estes organismos pobremente estudados, já que gerou informações que se complementam, oferecendo uma visão mais clara da maneira na qual funciona o sistema imune dos diplópodes e do seu potencial biotecnológico.

**Palavras-chave:** Diplópodes. Hemolinfa. Imunidade inata. Peptídeos antimicrobianos. *Rhinocricus*.

## Abstract

Segura-Ramírez PJ. Transcriptomic and proteomic analysis of the innate immune response in diplopods (*Rhinocricus* sp.). [Master's thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2021.

Despite scientific and technological advances in medicine over the last century, infectious diseases and antimicrobial resistance represent one of the greatest global health challenges today. As a result, researches aimed at discovering new sources of unconventional antibiotics have become increasingly frequent. In this context, diplopods emerge as a promising source of molecules with antimicrobial potential. Little is known about their immune response against pathogenic microorganisms, which is very intriguing considering that the evolutionary success of diplopods is largely due to this primitive defense system, since it allowed them to colonize a wide variety of microhabitats characterized by the high microbial proliferation. Based on the above, the aim of this work was to study the innate immune response of the diplopod *Rhinocricus* sp. through the application of transcriptomic and proteomic tools. For the transcriptomic analysis, the collected specimens were separated into two groups: experimental (diplopods immunized with LPS) and control (non-immunized diplopods). After 48 h, the hemolymph of both groups was extracted, hemocytes were obtained and the transcriptome of the immune cells was sequenced. Of the 9,398 resulting transcripts, 126 were grouped into a category called “Immune components”, performing manual annotation. Among these transcripts, 21 (17%) showed no changes in expression levels, while the expression of 105 (83%) was altered by LPS inoculation. Specifically, the expression of 70 (55%) of these transcripts was up-regulated and that of another 35 (28%) was down-regulated. It is noteworthy that the 126 transcripts were divided into subcategories corresponding to different defense responses, of which coagulation and melanization had the highest percentages of relative expression. For the proteomic analysis, hemolymph was extracted and two types of samples were obtained: plasma and hemocytes. The samples were pre-fractionated and the resulting elutions were submitted to RP-HPLC. The antimicrobial activity of the chromatographic fractions was evaluated through liquid growth inhibition assays against *Escherichia coli* SBS 363, *Micrococcus luteus* A270, *Candida albicans* MDM8 e *Aspergillus niger*. Subsequently, the antimicrobial fractions were analyzed by mass spectrometry. In total, 4 peptides with antimicrobial activity against different microorganisms were isolated and named RP40–16, RP40–19, RP40–20/1 and RP40–20/2. In these molecules, an absence of cytotoxic effects against Vero cells and of hemolytic effects against human erythrocytes was observed. The analysis with bioinformatics tools suggested that these peptides may be encrypted in larger proteins present in the plasma, from which they may be released by the action of endogenous proteases. It is worth mentioning that the search in the protein database created during the functional annotation of the transcriptome revealed that the 4 peptides matched specific fragments of proteins deposited in the database. In conclusion, the application of transcriptomic and proteomic tools in the study of the innate immune response of *Rhinocricus* sp., expanded the existing knowledge about these poorly studied organisms, as it generated information that complement each other, offering a clearer view of the way in which the diplopod's immune system works and its biotechnological potential.

**Keywords:** Diplopods. Hemolymph. Innate immunity. Antimicrobial peptides. *Rhinocricus*.

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), apesar dos grandes avanços feitos no campo da terapia antibiótica desde começos do século XX, as doenças infecciosas continuam sendo importantes causas de morte na população humana devido à grande habilidade dos microrganismos para desenvolver resistência rapidamente, comprometendo assim a eficácia dos antibióticos disponíveis no mercado atualmente (Garcia et al., 2013). Isso tem motivado o desenvolvimento de pesquisas destinadas a descobrir novas fontes de antibióticos não convencionais.

Como resultado, o estudo do sistema imunológico e a caracterização de moléculas bioativas isoladas da hemolinfa de grupos como os insetos, os crustáceos e os aracnídeos, são temas que têm recebido grande atenção de especialistas na área de pesquisa aplicada nos últimos anos, já que a ampla distribuição e a sobrevivência destes artrópodes em ambientes com grande proliferação microbiana são consequências, em grande parte, do sucesso dos seus mecanismos de reconhecimento e combate a diferentes tipos de microrganismos potencialmente patogênicos (Al Souhail et al., 2016; Anbuhezian et al., 2018; Basseri et al., 2016; Bednaski et al., 2015; Fredrick, Ravichandran, 2012; Riciluca et al., 2012).

No caso dos diplópodes, os estudos têm-se centrado na importante função ecológica que desempenham estes organismos como recicladores, dado que devolvem ao solo substâncias químicas que as plantas reutilizam (Bueno-Villegas, 2012). Por outro lado, existem evidências fósseis que indicam que além de ser um dos primeiros grupos de animais terrestres, os diplópodes foram pioneiros entre os artrópodes no desenvolvimento de defesa química contra seus predadores naturais (Shear, 2015). Porém, do sistema responsável pela defesa dos diplópodes contra a invasão de microrganismos patogênicos, se desconhece informação essencial para ter uma visão completa do seu funcionamento. Esta falta de conhecimento se torna ainda mais intrigante considerando que, a esse complexo e primitivo sistema de defesa imune se deve o grande sucesso evolutivo dos diplópodes, pois lhes permitiu manter sua integridade como grupo e colonizar uma grande variedade de microambientes terrestres como a serapilheira, os troncos apodrecidos, os talos de plantas, o dossel florestal, as plantas epífitas e esporadicamente, os cadáveres de animais (Bueno-Villegas, 2012).

Partindo do exposto anteriormente, acredita-se que através do uso combinado de ferramentas transcriptômicas e proteômicas poderá aumentar-se o conhecimento que se tem sobre o sistema imune inato dos diplópodes e seu potencial biotecnológico, já que haverá uma integração de informações obtidas de diversas fontes.

## 1.1 Aspectos gerais sobre a classe Diplopoda

Os diplópodes (Diplopoda) são uma classe de artrópodes terrestres que, juntamente com as classes Chilopoda, Pauropoda e Symphyla, formam o subfilo Myriapoda (Geoffroy, 2015). No Brasil são popularmente conhecidos como embuás, gongolôs e piolhos-de-cobra, sendo este último termo utilizado principalmente no estado de São Paulo. Na literatura científica também são denominados milípedes, devido ao grande número de patas que apresentam (Perez, 2011).

Os diplópodes constituem um dos grupos mais antigos do reino Animal com representantes que surgiram durante o período Ordoviciano, há aproximadamente 450 milhões de anos (Bueno-Villegas, 2012). Estes organismos encontram-se entre os grupos mais diversos e abundantes no meio terrestre, cerca de 15.000 espécies já foram descritas e estima-se que o número total que pode existir é de 80.000 (Geoffroy, 2015; Sierwald, Bond, 2007).

### 1.1.1 *Morfologia Externa*

O corpo dos diplópodes é formado por três seções: cabeça, tronco e télson (Figura 1A). A cabeça possui dois pares de peças bucais, as mandíbulas e o gnatoquilário, formado a partir das maxilas (Figura 1B). Esta estrutura que forma o "piso" da cavidade bucal, é composta de várias placas e apresenta órgãos sensoriais. A cabeça também possui estruturas sensoriais, incluindo um par de antenas, órgãos de Tömösváry e estruturas receptoras de luz chamadas de ocelos, localizadas em cada lado da cabeça, embora algumas espécies sejam cegas (Figura 1B) (Geoffroy, 2015).

O tronco é comprido e cilíndrico e, às vezes, exhibe projeções laterais proeminentes. O primeiro segmento por trás da cabeça não apresenta patas e denomina-se colum (Figura 1B), seguido por três segmentos "torácicos" ou haplossegmentos, com um par de patas cada um. Os segmentos restantes denominam-se diplossegmentos ou segmentos duplos, são formados pela fusão de dois segmentos embrionários e possuem dois pares de patas cada um (Figura 1C) (Geoffroy, 2015). Esta última característica diferencia os diplópodes do restante dos miriápodes e daí derivam os nomes científico e comum com os quais a classe é conhecida (Diplopoda e diplópodes, respectivamente) (Bueno-Villegas, 2012). Em machos adultos, um ou dois pares de patas são fortemente modificadas em estruturas chamadas gonopódios (Figuras 1B e 1C), que utilizam para transferir o esperma à fêmea durante a cópula. Em fêmeas adultas, as vulvas se abrem atrás do segundo par de patas. Os segmentos corporais são compostos por um

prozonito anterior e um metazonito posterior nos quais as glândulas de defesa emparelhadas se abrem (Geoffroy, 2015).

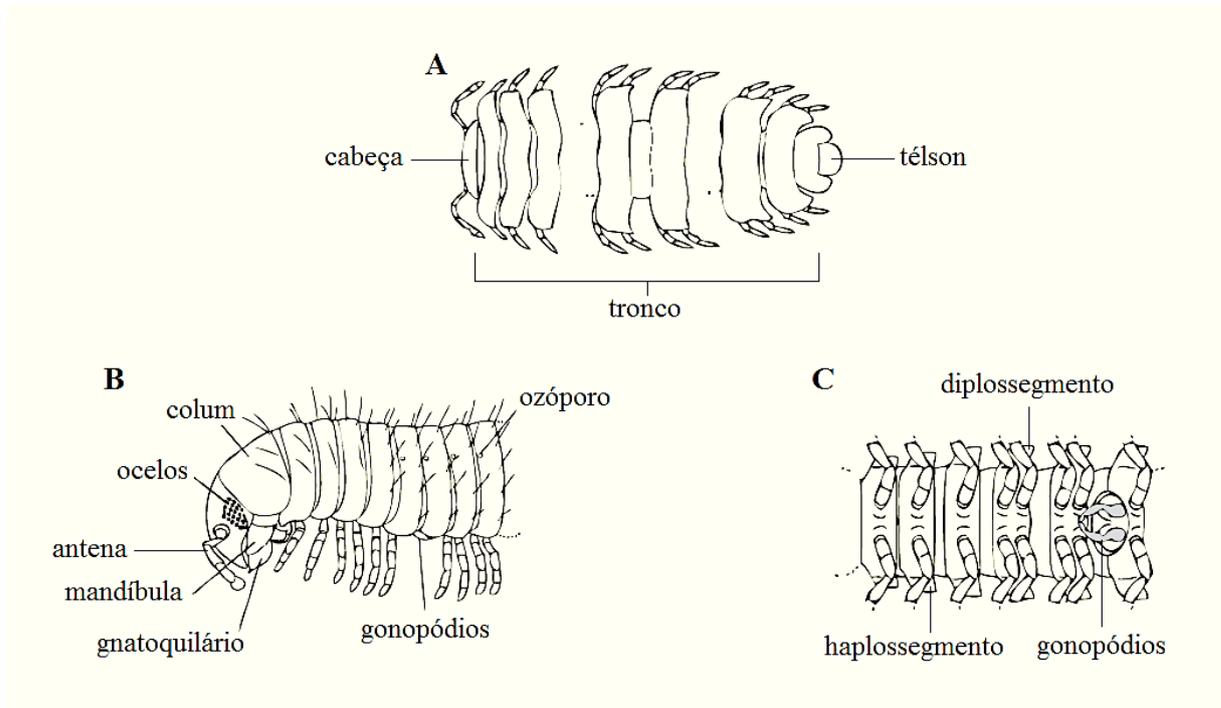
O télson consiste num anel pré-anal sem patas, um par de válvulas anais que se abrem durante a defecação, e uma pequena escama debaixo do ânus. Entre os segmentos posteriores que apresentam patas e o télson, existem vários segmentos ápodes e uma zona de proliferação onde os futuros segmentos começam seu desenvolvimento (Sierwald, Bond, 2007).

A cutícula, profundamente calcificada, consiste em um tergito dorsal fortemente modificado, um esternito ventral e pleuritos laterais (Geoffroy, 2015).

As patas locomotoras são constituídas por sete ou oito segmentos: coxa, trocânter, pré-fêmur, fêmur, pós-fêmur, tibia, tarso e garra. A locomoção dos diplópodes é bastante complicada. Cada pata dá um passo com um estágio propulsivo seguido de um estágio de recuperação. As patas do lado direito se movem em fase com as do lado esquerdo, mas cada pata está fora de fase com as patas imediatamente anteriores e posteriores. Isso causa a espetacular onda metacrônica que é tão característica dos diplópodes. Apesar de serem conhecidos comumente como milípedes, não existem registros de diplópodes que tenham mil patas: as espécies comuns têm entre 34 e 400 patas; porém, existem alguns indivíduos da espécie *Illacme plenipes* que apresentam cerca de 750 patas, o que é mais do que qualquer outra criatura na Terra (Bueno-Villegas, 2012; Geoffroy, 2015).

### 1.1.2 Anatomia interna

Os milípedes respiram por dois pares de espiráculos localizados ventralmente em cada segmento perto da base das patas. Cada abertura concede passagem a uma cavidade interna que pode armazenar oxigênio e conecta com um sistema traqueal. O coração estende-se por todo o comprimento do corpo, com uma aorta que se estende até à cabeça. O trato digestivo é um tubo que compreende os intestinos anterior, médio e posterior, e está ligado a órgãos associados como as glândulas salivares, as glândulas maxilares (órgãos nefridiais), o corpo adiposo e os túbulos de Malpighi envolvidos na osmorregulação e excreção. O cordão nervoso ventral consiste em gânglios segmentados emparelhados. Está dilatado na cabeça para formar o cérebro e está associado à atividade neurosecretora. Os órgãos reprodutores se abrem anteriormente no lado ventral do terceiro segmento do corpo: ovários e vulvas emparelhados, testículos tubulares e pênis bilobado (Geoffroy, 2015; Shelley, 1999).



**Figura 1 – Aspectos gerais da morfologia dos diplópodes.** (A) Ordem Polydesmida, aspecto dorsal das partes anterior, média e posterior do corpo. (B) Ordem Julida, cabeça e primeiros 9 segmentos do corpo de um macho mostrando algumas estruturas gerais. (C) Ordem Polydesmida, vista ventral de um macho mostrando o par de gonopódios (em cinza), os haplossegmentos e os diplossegmentos. Adaptado de Bueno-Villegas (2012).

### 1.1.3 Reprodução e crescimento

Todos os diplópodes têm fertilização interna, na qual o macho é responsável por transferir o esperma diretamente à fêmea durante a cópula, exceto na ordem Polyxenida, onde os machos depositam espermatóforos em redes que segregam com glândulas especiais, e os espermatóforos são depois recolhidos pelas fêmeas, guiadas por uma seda com um sinal químico depositada pelos machos. As fêmeas dos diplópodes depositam ovos, onde posteriormente os juvenis eclodem (Bueno-Villegas, 2012).

Todos os diplópodes são anamórficos, ou seja, nascem do ovo com um número reduzido de segmentos e patas, que posteriormente aumentam com cada muda. Algumas das espécies param de realizar mudas quando atingem certo número de diplossegmentos, e isso geralmente coincide com a maturidade sexual. O tamanho dos diplópodes adultos varia de alguns milímetros a cerca de 30 cm de comprimento (Bueno-Villegas, 2012; Geoffroy, 2015).

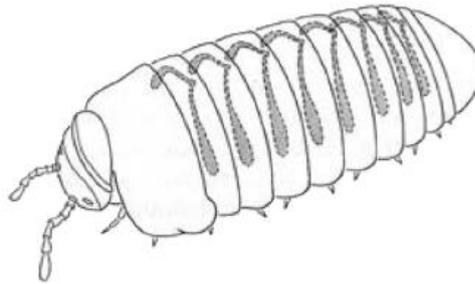
#### *1.1.4 Ecologia*

Os diplópodes apresentam uma ampla distribuição e com exceção da Antártida, encontram-se em qualquer parte do mundo: de desertos a florestas tropicais e do nível do mar a mais de 3 mil metros acima do nível do mar. Eles vivem em qualquer microambiente terrestre: na serapilheira e aproximadamente a um metro de profundidade da superfície, em troncos apodrecidos, em talos de plantas, no dossel florestal e em plantas epífitas, principalmente em bromélias. Esporadicamente, estes organismos são encontrados em cadáveres de animais, embora ainda não esteja claro se estão ali alimentando-se ou aproveitando a umidade que o cadáver oferece. Algumas espécies podem sobreviver às inundações de água doce e outras vivem perto da costa marítima, podendo sobreviver em condições parcialmente salinas. Os diplópodes podem ser observados principalmente durante a estação das chuvas (Bueno-Villegas, 2012; Geoffroy, 2015).

A grande maioria das espécies de diplópodes vive no solo e têm a facilidade de escavar. Portanto, a influência destes organismos nesse meio é de tipo física e química, pois ao perfurar, eles quebram os níveis superiores e alteram a natureza física do solo, aumentam a porosidade, a capacidade de retenção de água e influenciam os processos de transporte de nutrientes. Diferentemente das centopeias predadoras, os diplópodes são organismos fragmentadores, detritívoros e alimentam-se de vegetação em decomposição que eles modificam mediante a digestão. Posteriormente, com a deposição de suas fezes, eles liberam componentes nitrogenados, estimulando a ação das bactérias responsáveis por até 90% do trabalho químico durante os processos de decomposição do material vegetal. A quantidade de alimento ingerida diariamente está diretamente relacionada à densidade populacional e à biomassa. Em florestas onde as densidades são altas, estima-se que os diplópodes sejam responsáveis pelo consumo de até 31% da biomassa total de serapilheira produzida em um ano. Considerando isso, não há dúvida da importância desses organismos nos diferentes ecossistemas em que vivem, motivo pelo qual atualmente são considerados como engenheiros dos ecossistemas, juntamente com as formigas, os besouros, os cupins e as minhocas (Bueno-Villegas, 2012).

Os milípedes são predados por uma ampla variedade de animais, incluindo répteis, anfíbios, aves, mamíferos e insetos. Em consequência, estes organismos contam com um mecanismo de defesa química que consiste em uma série de glândulas “odoríferas” ou “repugnatórias” localizadas nos costados do corpo (Figura 2), as quais secretam substâncias pestilentas e irritantes através de poros microscópicos chamados ozóporos (Figuras 1B), quando o animal é perturbado, e podem ser fatais para outros artrópodes ou inclusive para pequenos

vertebrados em espaços confinados (Sierwald, Bond, 2007). Devido a isto, desde começos da década de 1980 têm-se caracterizado um grande número de substâncias defensivas de diferentes espécies de diplópodes, entre as quais se encontram fenóis, terpenos, benzoquinonas, ésteres de ácidos graxos, compostos alifáticos, alcaloides e cianogênicos (Shear, 2015).



**Figura 2 – Estrutura das glândulas defensivas do diplópode *Glomeris marginata*.** Distribuição das glândulas no animal intacto; oito glândulas se abrem através de um único poro na região dorsal média, começando na membrana intersegmentar imediatamente anterior ao diplossegmento 4. Adaptado de Shear (2015).

## 1.2 Sistema imune dos invertebrados

Diferentemente dos vertebrados, que contam com anticorpos e células T e B antígeno-específicas, os invertebrados não possuem um sistema de defesa altamente sofisticado. Apesar das evidências recentes que indicam que estes organismos podem ter uma resposta imune patógeno-dependente (o que sugere a presença de uma memória imunológica conhecida como “*immune priming*”), os invertebrados geralmente devem apoiar-se em mecanismos imunes inatos (Melillo et al., 2018). Os microrganismos invasores devem, em primeiro lugar, superar várias barreiras físicas e químicas como exoesqueletos, cutículas ou mucos. As complexas vias celulares e humorais da imunidade inata representam a segunda linha de defesa. Os mecanismos celulares incluem cicatrização de feridas, fagocitose de microrganismos invasores, reações de encapsulação e formação de nódulos. Além disso, os invertebrados possuem uma ampla gama de fatores antimicrobianos como lisozimas, proteases, proteínas citolíticas, peptídeos antimicrobianos (PAMs), fatores de coagulação e cascatas proteolíticas dependentes de ativação enzimática. Por último, mas não menos importante, a defesa humoral também inclui receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), que frequentemente se apoiam em interações lectina-sacarídeo para reconhecer estruturas altamente conservadas presentes em muitos microrganismos diferentes. Consequentemente, as vias celulares e humorais da defesa inata são orquestradas por fatores do tipo citocina (Bilej, 2015).

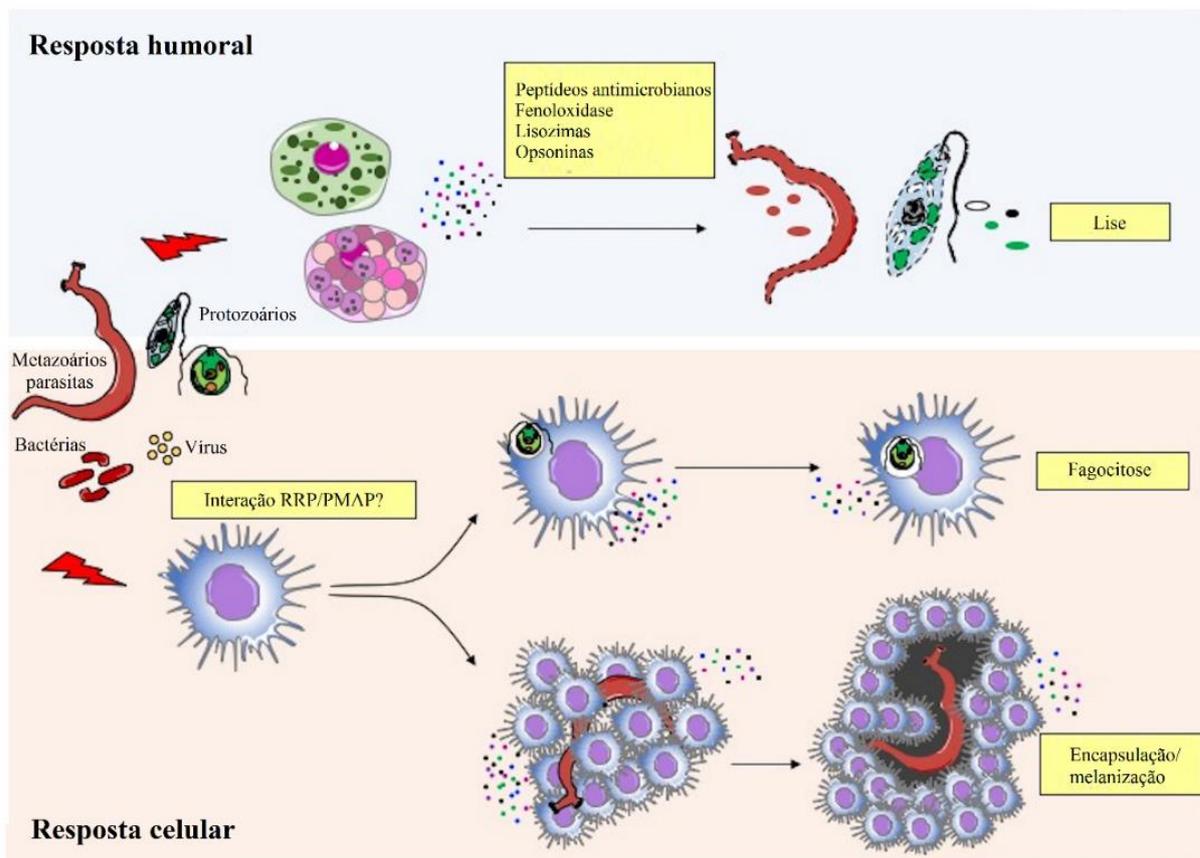
### 1.2.1 Hemócitos

Os hemócitos estão presentes no lúmen vascular e na cavidade celômica de todos os animais celomados. Nos invertebrados, muitos tipos de hemócitos têm sido descritos, com crescente diversidade e especialização, dependendo do tamanho corporal e da complexidade anatômica (Buchmann, 2014). Os hemócitos são geralmente dotados de capacidades defensivas, por exemplo, atividades fagocíticas, encapsulantes e microbicidas que contribuem nas respostas celulares e humorais do sistema imune. Os tipos de hemócitos defensivos mais comuns são as células fagocitárias (fagócitos) e as células granulares (granulócitos) (Melillo et al., 2018).

Os hemócitos granulares são células citotóxicas que sintetizam e armazenam moléculas bioativas dentro de grânulos. Os grânulos liberam seu conteúdo (degranulação) quando as células são expostas a endotoxinas, substâncias estranhas ou células estranhas, e a atividade dos fatores derivados dos grânulos contribui para eliminar os invasores do corpo. Nas células granulares do caranguejo-ferradura, os grânulos contêm fatores de coagulação, precursores de várias enzimas e moléculas antibacterianas. Por outro lado, nos hemócitos granulares dos insetos, os grânulos contêm principalmente profenoloxidase (proPO), o precursor da enzima responsável pela encapsulação/melanização (Melillo et al., 2018).

Os hemócitos fagocitários são células altamente aderentes que variam em número e capacidade fagocítica entre táxons. As espécies que se alimentam por filtração geralmente têm os fagócitos mais eficientes entre os invertebrados, enquanto as taxas fagocíticas nos hemócitos fagocitários dos crustáceos são as mais baixas. *In vivo*, a fagocitose é facilitada pela presença de opsoninas, proteínas plasmáticas que se ligam à superfície dos microrganismos, aumentando assim o reconhecimento e a captação pelos fagócitos. As opsoninas incluem RRP's solúveis, proteínas de adesão celular (em artrópodes) e lectinas (Melillo et al., 2018).

Os principais mecanismos da resposta imune dos invertebrados estão resumidos na Figura 3 e são descritos abaixo detalhadamente.



**Figura 3 – Mecanismos de resposta imune em invertebrados.** Os efetores humorais e celulares cooperam para conseguir a eliminação de patógenos invasores. O sistema imunológico reconhece agentes estranhos (parasitas, vírus, bactérias) e responde com a produção de proteínas (resposta humoral) e a migração de células imunes (resposta celular). Adaptado de Melillo et al. (2018).

### 1.2.2 Fagocitose

A fagocitose é um complexo processo evolutivamente conservado, baseado no reconhecimento, internalização e destruição intracelular de microrganismos invasores, células próprias danificadas ou corpos apoptóticos. Os RRs servem como um mecanismo de vigilância na primeira etapa de todo o processo. Sua ligação a moléculas da superfície microbiana denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs) ou padrões moleculares associados a micróbios (PMAMs), por exemplo, peptidoglicanos, lipopolissacarídeos (LPS), ácido lipoteicoico e  $\beta$ -1,3-glucano, desencadeia diversas respostas, como a fagocitose ou a encapsulação, seguida da melanização e a síntese de várias proteínas antimicrobianas (Figura 3). A internalização é facilitada pelo sistema citoesquelético contrátil actina-miosina. Na internalização, os patógenos se ligam e ativam os RRs, promovendo o acúmulo de fosfatidilinositol 3-fosfato no fagossomo através da ativação da enzima fosfatidilinositol 3-quinase e o recrutamento de proteínas do tipo ubiquitina diretamente na

membrana do fagossomo. Tudo isso permite a fusão dos lisossomos e a maturação dos fagolisossomos. A ligação e internalização de possíveis patógenos é aprimorada pelas opsoninas (Bilej, 2015).

O material ingerido acumulado no fagossomo é fundido com o lisossomo, levando à degradação. A degradação pode ser dependente ou independente de oxigênio. A degradação dependente de oxigênio leva à produção de espécies reativas de oxigênio, enquanto a degradação independente de oxigênio depende da liberação de grânulos contendo enzimas proteolíticas, lisozimas e proteínas antimicrobianas (Bilej, 2015).

### *1.2.3 Encapsulação*

A encapsulação é um mecanismo de defesa imune dos invertebrados mediado por células, que visa eliminar parasitas multicelulares, grandes demais para serem fagocitados, de tecidos e hemolinfa. Os hemócitos envolvidos nesse processo aderem-se uns aos outros e na superfície de partículas estranhas através de moléculas de adesão, formando um revestimento com várias camadas celulares. Quando a cápsula está totalmente formada, os hemócitos iniciam um processo de melanização da mesma, altamente eficiente no isolamento dos invasores (Figura 3). A melanização ocorre após a ativação da proPO, que é liberada pelas células granulares. Os hemócitos também liberam fatores citotóxicos para matar os invasores. A formação de cápsulas causa uma redução acentuada no número de hemócitos circulantes, que retornam aos níveis normais em poucos dias (Melillo et al., 2018).

### *1.2.4 Cascatas proteolíticas*

Várias reações do sistema imunológico dos invertebrados são controladas por cascatas proteolíticas que são desencadeadas por RRP.

Após a invasão de patógenos, a maioria dos invertebrados forma rapidamente um gel para capturar bactérias e outros intrusos na hemolinfa. O melhor exemplo é o sistema de coagulação do caranguejo-ferradura. Os hemócitos deste organismo contêm grânulos densos com inúmeras proteínas. Quando as células são expostas a LPS, resulta na degranulação e formação de coágulos. O processo é rápido, sendo concluído em 90 s. A cascata mediada por LPS é baseada em três tipos de zimogênios de serino-proteases (fator C, fator B e uma enzima pró-coaguladora) e uma proteína formadora de gel, o coagulogênio. O LPS primeiro ativa autocataliticamente o zimogênio do fator C. O fator C ativa o fator B, que por sua vez converte

a enzima pró-coaguladora em enzima coaguladora. Cada ativação procede por proteólise limitada. A enzima de coagulação resultante cliva duas ligações peptídicas no coagulogênio para produzir um gel de coagulina insolúvel. Paralelamente, há uma cascata de coagulação desencadeada pelo  $\beta$ -1,3-D-glucano. Um zimogênio da serino-protease correspondente, fator G, é clivado e ativa a enzima pró-coaguladora. Na etapa final da cascata de coagulação, o coagulogênio é convertido em coagulina insolúvel através de proteólise limitada (Bilej, 2015).

Nagai e Kawabata (2000) descobriram que a cascata de coagulação está ligada à ativação da proPO, que faz parte da cascata da fenoloxidase (PO), outro processo importante e amplamente distribuído em invertebrados. A proPO é precursora da PO, e é sintetizada constitutivamente por granulócitos, liberada e ativada em resposta a compostos microbianos ou fatores endógenos produzidos após danos nos tecidos. A PO ativa inicia a oxidação de monofenóis e difenóis em ortoquinonas, que polimerizam em melanina que, por sua vez, leva à melanização de microrganismos ou tecidos danificados. A melanina atua como um escudo físico que impede ou atrasa o crescimento de parasitas. Os intermediários tóxicos das quinonas também contribuem na reação defensiva (Melillo et al., 2018).

### 1.2.5 *Lisozimas*

As lisozimas, descobertas na década de 1920 por Alexander Fleming (1922), são enzimas antibacterianas amplamente distribuídas nos reinos animal e vegetal. Estas moléculas exibem atividade hidrolítica e clivam especificamente as ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas entre a N-acetilglucosamina e o ácido N-acetilmurâmico do peptidoglicano. O peptidoglicano é um heteropolímero essencial e único da parede celular bacteriana que fornece resistência estrutural e protege o protoplasto osmoticamente sensível. Assim, o rompimento da estrutura de peptidoglicano presente nas paredes celulares bacterianas tem consequências fatais para as bactérias e resulta na lise celular (Bilej, 2015).

Além da atividade muramidase, a maioria das lisozimas também possui atividade quitinase, provavelmente como resultado da similaridade entre o peptidoglicano e a quitina. Além disso, recentemente descobriu-se que algumas lisozimas e quitinases são estruturalmente relacionadas (Bilej, 2015; Wohlkönig, 2010).

### 1.2.6 PAMs

Os PAMs são componentes importantes das defesas naturais da maioria de organismos vivos. Este grupo de moléculas endógenas, que são em sua maioria codificadas geneticamente, constituem um mecanismo primitivo de defesa imune. São peptídeos relativamente pequenos (<10 kDa), têm entre 10 e 50 aminoácidos, e são geralmente catiônicos e anfipáticos, o que lhes permite associar-se à bicamada lipídica que compõe a membrana celular (Garcia et al., 2013). Estas moléculas têm sido isoladas de uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas, artrópodes, peixes, anfíbios e mamíferos; e são obtidas de diferentes fontes, como macrófagos, neutrófilos, células epiteliais, hemócitos, corpos gordurosos, trato reprodutivo, etc. Este grupo de peptídeos exibe uma ampla gama de propriedades biológicas, desde a neutralização direta de células cancerígenas e patógenos invasores, como bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas, fungos, leveduras, vírus e protozoários parasitas, até a modulação da resposta imune do hospedeiro (Reddy, 2004; Téllez, Cataño, 2010).

Os mecanismos de ação clássicos dos PAMs envolvem danos à membrana celular dos microrganismos. Estes mecanismos moleculares de permeação e ruptura da membrana dependem de vários parâmetros, como a sequência de aminoácidos, a estrutura secundária, a carga, a hidrofobicidade e a concentração dos PAMs (Giuliani et al., 2007). Por outro lado, existe um grande número de evidências que sugerem que os PAMs, que geralmente são básicos, reconhecem os fosfolipídios aniônicos presentes na camada externa da membrana bacteriana. Predominantemente, fosfolipídios aniônicos como fosfatidilglicerol, cardiolipina ou fosfatidilserina, estão presentes na superfície externa da membrana destes microrganismos, enquanto nas células de mamíferos, os fosfolipídios aniônicos estão presentes no lado citoplasmático da membrana. Além disso, as membranas celulares dos mamíferos são ricas em fosfolipídios zwitteriônicos (com carga neutra), como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina ou esfingomiélna. Por outro lado, o colesterol, um componente importante da membrana celular dos mamíferos, pode estabilizar a bicamada lipídica ou interagir diretamente com os PAMs, reduzindo a atividade dos mesmos. Isto indica que a composição da membrana é um fator determinante pelo qual os PAMs atacam seletivamente as membranas microbianas (Guilhelmelli et al., 2013).

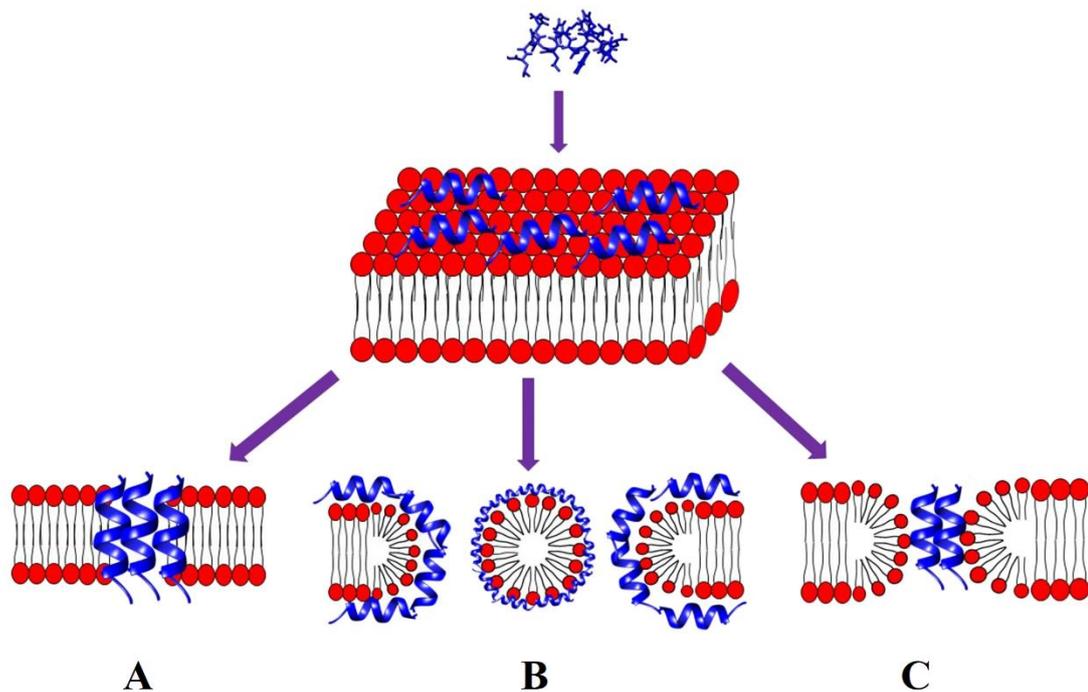
Vários defeitos podem ser induzidos na membrana pelos PAMs, dentre eles destacam-se a formação de poros, a separação de fases e a ruptura da bicamada lipídica. Os modelos de “barril”, “carpete” e “poro toroidal” podem explicar a ação membranolítica dos PAMs (Teixeira et al., 2012).

No “modelo de barril”, os peptídeos anfipáticos agregam-se na superfície externa da bicamada lipídica e reorientam-se de modo que a face catiônica fica virada para os grupos fosfato. Ao atingir uma concentração crítica, os peptídeos inserem-se perpendicularmente na membrana, mantendo as regiões hidrofóbicas ligadas às caudas dos fosfolipídios enquanto as regiões hidrofílicas ficam expostas, formando grandes poros transmembranares (Figura 4A). Esses poros facilitam o fluxo livre de íons e moléculas pequenas, permitindo a fuga do conteúdo citoplasmático (Giuliani et al., 2007).

No “modelo de carpete”, os PAMs são eletrostaticamente ligados às cabeças dos fosfolipídios aniônicos em vários pontos, cobrindo a superfície da membrana de maneira semelhante a um carpete. Em uma concentração crítica, os peptídeos podem formar orifícios toroidais transitórios na bicamada, permitindo que PAMs adicionais acessem à membrana. A partir disto, a membrana se desintegra e forma micelas após a ruptura da curvatura da bicamada (Figura 4B). Nesta perspectiva, a ruptura da estrutura da membrana ocorre de maneira dispersiva, em vez da formação de canais, e os peptídeos não se inserem necessariamente no núcleo hidrofóbico da membrana (Teixeira et al., 2012).

No “modelo de poro toroidal”, os PAMs induzem continuamente a flexão em camadas da membrana através de um poro. A constituição do poro toroidal implica que as faces polares dos peptídeos se associem às cabeças hidrofílicas dos fosfolipídios devido a sua flexão. Portanto, os lipídios da bicamada se inclinam a partir da sua estrutura lamelar normal e as duas camadas da membrana se conectam, gerando uma curva contínua de cima para baixo em forma de poro toroidal (Figura 4C). Isso cria uma tensão elástica desfavorável que pode culminar na formação de defeitos transitórios e, finalmente, na desintegração dos poros. O “modelo de poro toroidal” difere do “modelo de barril”, pois no primeiro os peptídeos estão sempre associados às cabeças hidrofílicas dos fosfolipídios, mesmo quando inseridos perpendicularmente na bicamada lipídica (Teixeira et al., 2012).

Embora os PAMs catiônicos possam interagir eletrostaticamente com a superfície das membranas celulares carregadas negativamente, alguns PAMs rompem a membrana celular por interação específica com compostos presentes nela, enquanto outros têm como alvo moléculas intracelulares (Ageitos et al., 2017). Estes peptídeos não membranolíticos modulam determinadas vias metabólicas centrais após atravessar a membrana e obter acesso a alvos intracelulares, como DNA, RNA, enzimas e organelas como mitocôndrias (Teixeira et al., 2012).



**Figura 4 – Mecanismos de ação dos PAMs.** (A) No “modelo de barril”, os peptídeos atravessam a membrana e formam um poro com a porção hidrofílica revestindo o mesmo. (B) O “modelo de tapete” é caracterizado pela cobertura da superfície da membrana pelo peptídeo de maneira semelhante a um tapete, seguido por uma ação de tipo detergente que rompe a estrutura da bicamada lipídica. (C) O “modelo toroidal” difere do “mecanismo de barril”, pois nesse modelo a porção hidrofílica do peptídeo está associada às cabeças polares dos fosfolípidios. Adaptado de Manniello et al. (2021).

Considerando tudo isso, os PAMs emergem como candidatos promissores para o controle de doenças infecciosas devido às suas baixas taxas de resistência, atividade potente e diversos mecanismos de ação (Peters et al., 2010).

## 2 CONCLUSÕES

A aplicação de ferramentas transcriptômicas e proteômicas no estudo da resposta imune inata do diplópode *Rhinocricus* sp., gerou informações que se complementam, oferecendo uma visão mais clara das estratégias utilizadas por este organismo pouco estudado até agora, para sobreviver a ferimentos e à invasão de microrganismos patogênicos.

Dos 9.398 transcritos obtidas durante a montagem *de novo* do transcriptoma, foram identificados 126 que estão envolvidos em processos celulares e humorais da resposta imune inata, e a possível função de cada um deles foi atribuída com base na similaridade da sequência com genes previamente caracterizados. O número reduzido de transcritos identificados deixa em evidência que, apesar do crescente interesse no estudo do subfilo Myriapoda, motivo pelo qual vários conjuntos de dados moleculares têm sido criados nos últimos anos, há pouquíssima informação disponível sobre esses organismos nos bancos de dados públicos.

Os valores de expressão relativa das 8 diferentes subcategorias de componentes imunológicos criadas neste estudo (regulação, reconhecimento, fagocitose, encapsulação, melanização, coagulação, hipóxia e moléculas antimicrobianas), mostraram que apesar de depender tanto dos mecanismos celulares quanto dos humorais para garantir sua sobrevivência, as respostas defensivas que envolvem cascatas proteolíticas desempenham um papel fundamental no sistema imune inato de *Rhinocricus* sp., principalmente a coagulação da hemolinfa, que está intimamente relacionada com a cicatrização de feridas e com a ação antimicrobiana.

A comparação dos valores de expressão relativa entre organismos imunizados e não imunizados revelou que um estímulo externo, neste caso a inoculação de LPS, causa uma expressão gênica diferencial nos diplópodes. Foi maior o número de genes relacionados à resposta imune inata regulados positivamente (70), do que o número de genes regulados negativamente (35) e o número de genes que não mostraram alterações nos níveis de expressão (21).

Foram isolados e caracterizados 4 potentes PAMs presentes no plasma de *Rhinocricus* sp.: RP40–16, RP40–19, RP40–20/1 e RP40–20/2. Nessas moléculas, não foram observados efeitos citotóxicos contra células Vero, nem efeitos hemolíticos contra eritrócitos humanos. Essas características apresentadas pelos peptídeos mostram a importância de estudar seus mecanismos de ação, assim como outras atividades biológicas que possam oferecer uma visão mais completa do seu potencial biotecnológico.

A consulta em diferentes bancos de dados e a análise com ferramentas bioinformáticas sugeriram que RP40–16 e RP40–19 podem estar encriptados em uma subunidade de hemocianina, enquanto RP40–20/1 e RP40–20/2 podem ter sua origem em uma proteína que contém tioéster, sendo liberados pela ação de proteases endógenas. Esses resultados permitem supor que existe um maior número de moléculas com atividade antimicrobiana na hemolinfa dos diplópodes do que o número reportado na análise do transcriptoma, já que muitas dessas moléculas podem ser o resultado da clivagem de proteínas de maior tamanho. Isso ressalta a importância do uso combinado de ferramentas ômicas na geração de dados sobre organismos pouco estudados.

O numeroso grupo de frações da hemolinfa que apresentaram atividade antimicrobiana (18 no total), deixou em evidência que os diplópodes são uma fonte promissora para a descoberta de moléculas com potencial para o desenvolvimento de antibióticos não convencionais. No entanto, é fundamental buscar estratégias para superar alguns obstáculos que surgem nas fases iniciais do estudo da hemolinfa desses organismos. Por exemplo, a baixa concentração do material proteico obtido, pode dificultar o processo de caracterização das moléculas antimicrobianas que geralmente são pequenas.

## REFERÊNCIAS

- Agaisse, H.; Perrimon, N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol. Rev.* **2004**, *198*, 72-82.
- Ageitos, J.M.; Sánchez-Pérez, A.; Calo-Mata, P.; Villa, T.G. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *133*, 117-138.
- Al Souhail, Q.; Hiromasa, Y.; Rahnamaeian, M.; Giraldo, M.C.; Takahashi, D.; Valent, B.; Vilcinskis, A.; Kanost, M.R. Characterization and regulation of expression of an antifungal peptide from hemolymph of an insect, *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.* **2016**, *61*, 258-268.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403-410.
- Apweiler, R.; Bairoch, A.; Wu, C.H.; Barker, W.C.; Boeckmann, B.; Ferro, S.; et al. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, D115-D119.
- Anbuchejian, R.; Ravichandran, S.; Karthick Rajan, D.; Tilivi, S.; Prabha Devi, S. Identification and functional characterization of antimicrobial peptide from the marine crab *Dromia dehaani*. *Microb. Pathog.* **2018**, *125*, 60-65.
- Arai, I.; Ohta, M.; Suzuki, A.; Tanaka, S.; Yoshizawa, Y.; Sato, R. Immunohistochemical analysis of the role of hemocytin in nodule formation in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Sci.* **2013**, *13*, 125.
- Ashburner, M.; Ball, C.A.; Blake, J.A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J.M.; et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 25-29.
- Basseri, H.R.; Dadi-Khoeni, A.; Bakhtiari, R.; Abolhassani, M.; Hajihosseini-Baghdadabadi, R. Isolation and Purification of an Antibacterial Protein from Immune Induced Haemolymph of American Cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Arthropod-Borne Dis.* **2016**, *10*, 519-527.
- Baxter, R.H.G.; Contet, A.; Krueger, K. Arthropod Innate Immune Systems and Vector-Borne Diseases. *Biochemistry* **2017**, *56*, 907-918.
- Bednaski, A.V.; Trevisan-Silva, D.; Matsubara, F.H.; Boia-Ferreira, M.; Olivério, M.M.; Gremski, L.H.; Cavalheiro, R.P.; De Paula, D.M.B.; Paredes-Gamero, E.J.; Takahashi, H.K.; Toledo, M.S.; Nader, H.B.; Veiga, S.S.; Chaim, O.M.; Senff-Ribeiro, A. Characterization of Brown spider (*Loxosceles intermedia*) hemolymph: Cellular and biochemical analyses. *Toxicon* **2015**, *98*, 62-74.
- Bilej, M. Mucosal Immunity in Invertebrates. In *Mucosal Immunology*, 4th ed.; Mestecky, J., Strober, W., Russell, M.W., Kelsall, B.L., Cheroutre, H., Lambrecht, B.N., Eds.; Academic Press: Los Angeles, CA, USA, 2015; pp. 135-144. ISBN 978-0-12-415847-4.
- Buchmann, K. Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 459.

Bueno-Villegas, J. Diplópodos: los desconocidos formadores de suelo. *Biodiversitas* **2012**, *102*, 2-5.

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.

Cerenius, L.; Söderhäll, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* **2004**, *198*, 116-126.

Cerenius, L.; Söderhäll, K. Coagulation in invertebrates. *J. Innate Immun.* **2011**, *3*, 3-8.

Chaparro, E.; da Silva, P.I., Jr. Lacrain: The first antimicrobial peptide from the body extract of the Brazilian centipede *Scolopendra viridicornis*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2016**, *48*, 277–285.

Chaparro-Aguirre, E.; Segura-Ramírez, P.J.; Alves, F.L.; Riske, K.A.; Miranda, A.; Silva Júnior, P.I. Antimicrobial activity and mechanism of action of a novel peptide present in the ecdysis process of centipede *Scolopendra subspinipes subspinipes*. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13631.

Chipman, A.D; Ferrier, D.E.K.; Brena, C.; Qu, J.; Hughes, D.S.T.; Schröder, R.; et al. The First Myriapod Genome Sequence Reveals Conservative Arthropod Gene Content and Genome Organisation in the Centipede *Strigamia maritima*. *PLoS Biol.* **2014**, *12*, e1002005.

Coates, C.J.; Decker, H. Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 293-317.

Dasgupta, S.K.; Thiagarajan, P. The role of lactadherin in the phagocytosis of phosphatidylserine-expressing sickle red blood cells by macrophages. *Blood* **2005**, *106*, 3773.

Dennison, S.R.; Harris, F.; Mura, M.; Phoenix, D.A. An atlas of anionic antimicrobial peptides from amphibians. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2018**, *19*, 823–838.

Destoumieux-Garzón, D.; Saulnier, D.; Garnier, J.; Jouffrey, C.; Bulet, P.; Bachère E. Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47070–47077.

Dewitt, S.; Hallett, M.B. Calpain Activation by Ca<sup>2+</sup> and Its Role in Phagocytosis. In: *Molecular and Cellular Biology of Phagocytosis. Advances in Experimental Medicine and Biology*; Hallett, M.B., Eds.; Springer: Cham, 2020; vol. 1246, pp. 129–151.

Dostálová, A.; Rommelaere, S.; Poidevin, M.; Lemaitre, B. Thioester-containing proteins regulate the Toll pathway and play a role in *Drosophila* defence against microbial pathogens and parasitoid wasps. *BMC Biol.* **2017**, *15*, 79.

Edwards, M.; Zwolak, A.; Schafer, D.A.; Sept, D.; Dominguez, R.; Cooper, J.A. Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 677–689.

El Amri, C.; Nicolas, P. Plasticins: membrane-damaging peptides with ‘chameleon-like’ properties. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 895–909.

El-Zayat, S.R.; Sibaii, H.; Mannaa, F.A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull. Natl. Res. Cent.* **2019**, *43*, 187.

Fernández, R.; Edgecombe, G.D.; Giribet, G. Phylogenomics illuminates the backbone of the Myriapoda Tree of Life and reconciles morphological and molecular phylogenies. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 83.

Fredrick, W.S.; Ravichandran, S. Hemolymph proteins in marine crustaceans. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2012**, *2*, 496-502.

Fu, L.; Niu, B.; Zhu, Z.; Wu, S.; Li, W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 3150-3152.

Garcia, F.; Villegas, E.; Espino-Solis, G.P.; Rodriguez, A.; Paniagua-Solis, J.F.; Sandoval-Lopez, G.; Possani, L.D.; Corzo, G. Antimicrobial peptides from arachnid venoms and their microbicidal activity in the presence of commercial antibiotics. *J. Antibiot.* **2013**, *66*, 3-10.

Geer, L.Y.; Marchler-Bauer, A.; Geer, R.C.; Han, L.; He, J.; He, S.; et al. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, D492-D496.

Geoffroy, J.J. Subphylum Myriapoda, Class Diplopoda. In *Thorpe and Covich's Freshwater Invertebrates*, 4th ed.; Thorpe, J.H., Rogers, D.C., Eds.; Academic Press: Los Angeles, CA, USA, 2015; pp. 661-669. ISBN 978-0-12-385026-3.

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

Grabherr, M.G.; Haas, B.J.; Yassour, M.; Levin, J.Z.; Thompson, D.A.; Amit, I.; et al. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 644-652.

Guilhelmelli, F.; Vilela, N.; Albuquerque, P.; Derengowski, L.S; Silva-Pereira, I.; Kyaw, C.M. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 353.

Gurevich, V.V.; Gurevich, E.V. GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 125.

Hansen, S.; Selman, L.; Palaniyar, N.; Ziegler, K.; Brandt, J.; Kliem, A.; Jonasson, M.; Skjoedt, M.O.; Nielsen, O.; Hartshorn, K.; Jørgensen, T.J.D.; Skjødt, K.; Holmskov, U. Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 6096-6104.

Harris, F.; Dennison, S.R.; Phoenix, D.A. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2009**, *10*, 585-606.

He, Q.Y.; He, Q.Z.; Deng, X.C.; Yao, L.; Meng, E.; Liu, Z.H.; et al. ATDB: a uni-database platform for animal toxins. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, D293-D297.

Hetru C., Bulet P. Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. *Methods Mol. Biol.* **1997**, *78*, 35-49.

Hoffman, R.L. Classification of the Diplopoda. Geneva, Suica: Muséum d'Histoire Naturelle, **1980**, 1-237.

Johnson, E.E.; Wessling-Resnick, M. Iron metabolism and the innate immune response to infection. *Microbes Infect.* **2012**, *14*, 207-216.

Jung, S.; Dingley, A.J.; Augustin, R.; Anton-Erxleben, F.; Stanisak, M.; Gelhaus, C.; Gutschmann, T.; Hammer, M.U.; Podschun, R.; Bonvin, A.M.; Leippe, M.; Bosch, T.C.; Grötzinger, J. Hydramacin-1, structure and antibacterial activity of a protein from the basal metazoan Hydra. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 1896-1905.

Kanehisa, M.; Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 27-30.

Kim, S.Y.; Kim, S.; Bae, D.J.; Park, S.Y.; Lee, G.Y.; Park, G.M.; Kim, I.S. Coordinated balance of Rac1 and RhoA plays key roles in determining phagocytic appetite. *PLOS ONE* **2017**, *12*, e0174603.

Kotani, E.; Yamakawa, M.; Iwamoto, S.; Tashiro, M.; Mori, H.; Sumida, M.; et al. Cloning and expression of the gene of hemocytin, an insect humoral lectin which is homologous with the mammalian von Willebrand factor. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1260*, 245-258.

Lee, J.H.; Kim, I.W.; Kim, M.A.; Ahn, M.Y.; Yun, E.Y.; Hwang, J.S. Antimicrobial Activity of the Scolopendrasin V Peptide Identified from the Centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *27*, 43-48.

Lee, S.Y.; Kwon, T.H.; Hyun, J.H.; Choi, J.S.; Kawabata, S.I.; Iwanaga, S.; Lee, B.L. *In vitro* activation of pro-phenol-oxidase by two kinds of pro-phenol-oxidase-activating factors isolated from hemolymph of coleopteran, *Holotrichia diomphalia* larvae. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 50-57.

Lee, S.Y.; Lee, B.L.; Söderhäll, K. Processing of an antimicrobial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 7927-7933.

Lee, W.; Hwang, J.S.; Lee, D.G. A novel antimicrobial peptide, scolopendin, from *Scolopendra subspinipes mutilans* and its microbicidal mechanism. *Biochimie* **2015**, *118*, 176-184.

Li, B.; Dewey, C.N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **2011**, *12*, 323.

Li, W.; Godzik, A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1658-1659.

- Ma, B.; Zhang, K.; Hendrie, C.; Liang, C.; Li, M.; Doherty-Kirby, A.; Lajoie, G. PEAKS: Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 2337-2342.
- Manniello, M.D.; Moretta, A.; Salvia, R.; Scieuzo, C.; Lucchetti, D.; Vogel, H.; Sgambato, A.; Falabella, P. Insect antimicrobial peptides: potential weapons to counteract the antibiotic resistance. *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78*, 4259-4282.
- Melillo, D.; Marino, R.; Italiani, P.; Boraschi, D. Innate Immune Memory in Invertebrate Metazoans: A Critical Appraisal. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1915.
- Muta, T.; Hashimoto, R.; Miyata, T.; Nishimura, H.; Toh, Y.; Iwanaga, S. Proclotting enzyme from horseshoe crab hemocytes. cDNA cloning, disulfide locations, and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 22426-22433.
- Muta, T.; Miyata, T.; Misumi, Y.; Tokunaga, F.; Nakamura, T.; Toh, Y.; Ikehara, Y.; Iwanaga, S. Limulus factor C. An endotoxin-sensitive serine protease zymogen with a mosaic structure of complement-like, epidermal growth factor-like, and lectin-like domains. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 6554-6561.
- Nagai, T.; Kawabata, S. A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29264-29267.
- Nakamura, T.; Horiuchi, T.; Morita, T.; Iwanaga, S. Purification and properties of intracellular clotting factor, factor B, from horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) hemocytes. *J. Biochem.* **1986**, *99*, 847-857.
- Narayana, J.L.; Chen, J.Y. Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents. *Peptides* **2015**, *72*, 88-94.
- Ni, W.; Bao, J.; Mo, B.; Liu, L.; Li, T.; Pan, G.; Chen, J.; Zhou, Z. Hemocytin facilitates host immune responses against *Nosema bombycis*. *Dev. Comp. Immunol.* **2020**, *103*, 103495.
- Ning, J.; Liu, Y.; Cui, Z. Identification and functional analysis of a thioester-containing protein from *Portunus trituberculatus* reveals its involvement in the prophenoloxidase system, phagocytosis and AMP synthesis. *Aquaculture* **2019**, *510*, 9-21.
- Oddo, A.; Hansen, P.R. Hemolytic activity of antimicrobial peptides. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1548*, 427-435.
- Osorio, D; Rondón-Villarreal, P.; Torres, R. Peptides: A Package for Data Mining of Antimicrobial Peptides. *R J.* **2015**, *7*, 4-14.
- Park, S.H.; Jiang, R.; Piao, S.; Zhang, B.; Kim, E.H.; Kwon, H.M.; et al. Structural and functional characterization of a highly specific serpin in the insect innate immunity. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 1567-1575.
- Perdomo-Morales, R.; Montero-Alejo, V.; Corzo, G.; Besada, V.; Vega-Hurtado, Y.; González-González, Y.; et al. The trypsin inhibitor panulirin regulates the prophenoloxidase-activating system in the spiny lobster *Panulirus argus*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 31867-31879.

- Perez, D.G. Caracterização morfofisiológica dos hemócitos do diplópodo *Rhinocricus padbergi* antes e após exposição a substrato contendo lodo de esgoto. 2011. 88 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2011.
- Perkins, D.N.; Pappin, D.J.; Creasy, D.M.; Cottrell, J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551-3567.
- Peters, B.M.; Shirliff, M.E.; Jabra-Rizk, M.A. Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1001067.
- Pick, C.; Scherbaum, S.; Hegedüs, E.; Meyer, A.; Saur, M.; Neumann R; et al. Structure, diversity and evolution of myriapod hemocyanins. *FEBS J.* **2014**, *281*, 1818-1833.
- Ragland, S.A.; Criss, A.K. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006512.
- Ratner, S; Vinson, S.B. Phagocytosis and Encapsulation: Cellular Immune Responses in Arthropoda. *Integr. Comp. Biol.* **1983**, *23*, 185-194.
- Reddy, K.V.R.; Yedery, R.D.; Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *24*, 536-547.
- Rehm, P.; Meusemann, K.; Borner, J.; Misof, B.; Burmester, T. Phylogenetic position of Myriapoda revealed by 454 transcriptome sequencing. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2014**, *77*, 25-33.
- Riciluca, K.C.T; Sayegh, R.S.R; Melo, R.L.; Silva Jr, P.I. Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. *Results Immunol.* **2012**, *2*, 66-71.
- Schiffer, M.; Edmundson, A.B. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.* **1967**, *7*, 121-135.
- Segura-Ramírez, P.J.; Silva Júnior, P.I. *Loxosceles gaucho* Spider Venom: An Untapped Source of Antimicrobial Agents. *Toxins* **2018**, *10*, 522.
- Shear, W.A. The chemical defenses of millipedes (diplopoda): Biochemistry, physiology and ecology. *Biochem. Syst. Ecol.* **2015**, *61*, 78-117.
- Shelley, R.M. Centipedes and Millipedes, with emphasis on North American fauna. *Kansas School Nat.* **1999**, *45*, 1-15.
- Shokal, U.; Eleftherianos, I. Evolution and Function of Thioester-Containing Proteins and the Complement System in the Innate Immune Response. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 759.
- Sierwald, P.; Bond, J.E. Current Status of the Myriapod Class Diplopoda (Millipedes): Taxonomic Diversity and Phylogeny. *Annu. Rev. Entomol.* **2007**, *52*, 401-420.
- Söerhäll, K; Smith, V.J. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* **1983**, *7*, 229-339.

Télliez, G.A.; Castaño, J.C. Péptidos antimicrobianos. *Infectio* **2010**, *14*, 55-67.

Teixeira, V.; Feio, M.J.; Bastos, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.* **2012**, *51*, 149-177.

Torrent, M.; Andreu, D.; Nogués, V.M.; Boix, E. Connecting peptide physicochemical and antimicrobial properties by a rational prediction model. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e16968.

Williams, M.; Baxter, R. The structure and function of thioester-containing proteins in arthropods. *Biophys. Rev.* **2014**, *6*, 261-272.

Wohlkönig, A.; Huet, J.; Looze, Y.; Wintjens, R. Structural relationships in the lysozyme superfamily: significant evidence for glycoside hydrolase signature motifs. *PLOS ONE* **2010**, *5*, e15388.

Xue, S.; Liu, Y.; Zhang, Y.; Sun, Y.; Geng, X.; Sun, J. Sequencing and *De Novo* Analysis of the Hemocytes Transcriptome in *Litopenaeus vannamei* Response to White Spot Syndrome Virus Infection. *PLOS ONE* **2013**, *10*, e76718.

Zhang, J. Rates of conservative and radical nonsynonymous nucleotide substitutions in mammalian nuclear genes. *J. Mol. Evol.* **2000**, *50*, 56-68.

Zhang, W.; Chen, J.; Keyhani, N.O.; Zhang, Z.; Li, S.; Xia, Y. Comparative transcriptomic analysis of immune responses of the migratory locust, *Locusta migratoria*, to challenge by the fungal insect pathogen, *Metarhizium acridum*. *BMC Genomics* **2015**, *16*, 867.