
Resumo

Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa de *Acanthoscurria rondoniae* (Mygalomorphae, Theraphosidae)

Katie Cristina Takeuti Riciluca, Pedro Ismael da Silva Jr. (Orientador)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, Brasil – 2011.

RESUMO

Todos os organismos vivos, abrangendo desde microrganismos até plantas e animais, evoluíram de forma a desenvolver mecanismos para ativamente defender-se contra o ataque de patógenos. Peptídeos antimicrobianos são importantes componentes do sistema imune dos vertebrados e invertebrados podendo ser agrupados de acordo com suas propriedades químicas e estruturais. Podem agir na membrana plasmática de microrganismos formando poros na bicamada de fosfolípidos ou ser internalizado e atuar sobre alvos intracelulares. Estudos sobre a biodiversidade de moléculas antimicrobianas nos vários grupos de artrópodes podem ser importantes para se entender o processo imunológico de uma maneira mais ampla, possibilitando compreender as relações existentes entre os vários sistemas, bem como sua origem, além de poder contribuir para a produção e utilização de novas drogas para o uso na medicina e na agricultura. O objetivo deste trabalho foi verificar a produção de substâncias antimicrobianas, como observada em outros artrópodes, utilizando a aranha *Acanthoscurria rondoniae* como exemplo, por meio da purificação e caracterização de moléculas presentes na hemolinfa e caracterizando-as para um entendimento mais amplo dos processos envolvidos no sistema imune de aracnídeos e dos artrópodes em geral. Neste trabalho foram encontradas três frações com atividade antimicrobiana nos hemócitos que apresentaram massa molecular de 2.270,3 Da, 418,2 Da e 10.111,8 Da, respectivamente. Essas massas, quando comparadas às encontradas em *A. gomesiana*, mostram similaridade com a gomesina, mygalina e acanthoscurrina, podendo indicar que as duas espécies apresentam as mesmas moléculas antimicrobianas em seus hemócitos. No plasma, foram encontradas seis frações, mas somente uma, que apresentou massa molecular de 1.236,776 Da, foi caracterizada, e recebeu o nome de rondonina em homenagem à espécie estudada. Pela primeira vez foi observado em aracnídeos um peptídeo antimicrobiano que provavelmente é processado a partir da hemocianina, um fragmento C-terminal. É um peptídeo de baixa massa molecular e que teve sua sequência primária elucidada IIIQYEGHKK, com identidade com um fragmento C-terminal da subunidade “D” da hemocianina da aranha *Eurypelma californicum* e, quando comparada ao banco de dados dos hemócitos de *Acanthoscurria gomesiana*, mostrou identidade com um fragmento da hemocianina da subunidade “D” e 90% de identidade com um fragmento da subunidade “F”. Também foi encontrada no plasma de *Vitalius wacketi*, *Nhandu coloratovillosus*, *A. gomesiana*, *Lasiadora parahybana*. Rondonina foi sintetizada e sua atividade contra bactérias gram-negativas, gram-positivas, fungos e leveduras foi avaliada. Como antifúngico, em concentração na faixa de micromolar (μM), em 10 minutos, não se encontrou conídios viáveis. Não apresenta atividade hemolítica, o que pode permitir o desenvolvimento de uma nova droga responsável no combate a microrganismos patógenos.

PALAVRAS-CHAVE: Aranha/imunologia. Hemolinfa. Peptídeos/isolamento & purificação. Hemocianina. Aracnídeos.

Resume

Purification and characterization of antimicrobial peptides in the haemilymph of the Acanthoscurria rondoniae spider (Mygalomorphae, Theraphosidae)

Katie Cristina Takeuti Riciluca, Pedro Ismael da Silva Jr. (Orientador)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, Brasil – 2011.

RESUME

All living organisms, ranging from microorganisms to plants and animals have developed mechanisms to defend themselves against attack by pathogens. Antimicrobial peptides are important components of the immune system of vertebrates and invertebrates and can be grouped according to their chemical and structural properties. They may act in the plasma membrane of microorganisms forming pores in phospholipid bilayer or be internalized and act on intracellular targets. Studies on the biodiversity of antimicrobial molecules in various groups of arthropods may be important for understanding the immunological process in a more comprehensive, enabling to understand the relationships between the various systems, as well as its source, and can contribute to the production and use of new drugs for use in medicine and agriculture. The objective of this study was to evaluate the production of antimicrobial substances, as observed in other arthropods, the spider *Acanthoscurria rondoniae* using as an example, through purification and characterization of molecules present in the hemolymph and characterized them to a broader understanding of the processes involved in the system immune arachnids and arthropods in general. In this work we found three fractions with antimicrobial activity in haemocytes that had a molecular mass of 2,270.3 Da, 418.2 Da and 10,111.8 Da, respectively. These masses compared to those found in *A. gomesiana* show similarity to gomesina, and mygalina acanthoscurrina, which may indicate that the two species have the same antimicrobial molecules in their haemocytes. In plasma, six fractions were found, only one more was characterized, which showed a molecular mass of 1,236.776 Da, was named in honor rondonina the species studied. Was first observed in arachnids an antimicrobial peptide is probably processed from the hemocyanin, a C-terminal fragment. It is a low molecular weight peptide and had his primary sequence elucidated IIIQYEGHKH with identity with a Cterminal fragment of the subunit “D” of the spider *Eurypelma californicum* hemocyanin, and when compared to the database of the haemocytes of *Acanthoscurria gomesiana*, this showed identity with a fragment of the hemocyanin subunit “D” and 90% identity with a fragment of the subunit “F”. Also found in *plasma Vitalius wacketi*, *Nhandu coloratovillosus*, *A. gomesiana*, *Lasiadora parahybana*. Rondonina was synthesized and its activity against gram-negative, gram-positive bacteria, fungi and yeast was evaluated. Rondonina is an antifungal that in 10 minutes is not any viable conidia, acting in concentration in the micromolar range (mM). It has no hemolytic activity, which may allow the development of a new drug responsible for combating pathogenic microorganisms.

KEYWORDS: Antimicrobial Peptides. Hemocyanin fragment. Rondonin. *Acanthoscurria rondoniae*. Tarantula spider.