



# PEPTÍDEOS ANTIBIÓTICOS

Peptídeos antibióticos produzidos por aracnídeos

## Sirlei Daffre

Doutora em Bioquímica  
Professora Assistente Doutora do Departamento de Parasitologia, ICB, USP  
sidaffre@icb.usp.br

## Antônio Miranda

Doutor em Ciências  
Professor Adjunto do Departamento de Biofísica, UNIFESP  
miranda.biof@epm.br

## M. Teresa M. Miranda

Doutora em Bioquímica  
Professora Livre-Docente do Departamento de Bioquímica, IQ, USP  
mtmirand@iq.usp.br

## Philippe Bulet

Doutor em Biologia e Fisiologia  
Diretor de Pesquisa do Institut Biologie Moleculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Estrasburgo, França  
P.Bulet@ibmc.u-strasbg.fr

## Pedro I. da Silva Jr.

Doutor em Ciências  
Pesquisador do Instituto Butantan  
pisjr@usp.br

## Alessandra Machado

Doutora em Química Orgânica  
Pós-Doutora do Departamento de Bioquímica, IQ, USP  
Amachado@iq.usp.br

## Andréa C. Fogaça

Doutoranda em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, ICB, USP  
deafof@usp.br

## Daniel M. Lorenzini

Doutorando em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, ICB, USP  
dloren@usp.br

## Lourivaldo S. Pereira

Doutorando em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, ICB, USP  
lourival@usp.br

## Marcos A. Fázio

Doutorando em Biologia Molecular, UNIFESP  
fazio.biof@infa.epm.br

## Eliane Esteves

Mestranda em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, ICB, USP  
eli\_esteves@hotmail.com

## Marcelo R. Burgierman

Mestrando em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, ICB, USP  
marusso@zipmail.com.br

Fotos cedidas pelos autores

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana. Esse fato é devido, em grande parte, ao surgimento de microorganismos multi-resistentes aos antibióticos. Portanto, apesar da disponibilidade de um grande número de antibióticos de última geração, torna-se ainda fundamental buscar compostos que possam atuar como novas drogas a serem utilizadas no combate as doenças infecciosas (Lohner & Staudegger, 2001).

O surgimento do grande número atual de cepas bacterianas resistentes pode ter várias origens, sendo uma delas decorrente do próprio tipo de vida do ser humano. O principal fator é, sem dúvida, o consumo excessivo e inapropriado dos antibióticos por homens, outros animais e na agricultura. A prescrição do antibiótico é geralmente empírica e sem a identificação prévia

do agente patogênico através de exames laboratoriais. Além disso, a sua venda sem exigência de uma prescrição médica em alguns países, associada ao suprimento irregular desse medicamento, à baixa qualidade da medicação e ao seu mal uso pelos pacientes (que muitas vezes não completam o tratamento), contribuem para a seleção de novos microorganismos multiresistentes. Associada a isso, uma grande quantidade de agentes antimicrobianos vem sendo usado na agropecuária para promover o crescimento de plantas e animais, o que ocasiona um aumento da resistência de microorganismos que são transmitidos para o homem. Ao mesmo tempo, o aumento da migração da população e o transporte de animais ou de produtos de origem animal trazem doenças para áreas onde nunca haviam se instalado, resultando no espalhamento de microorganismos resistentes aos antibióticos. Mudanças

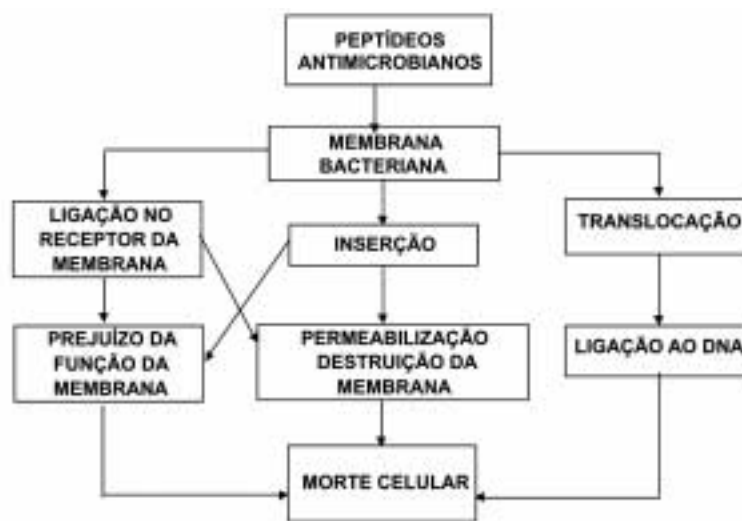


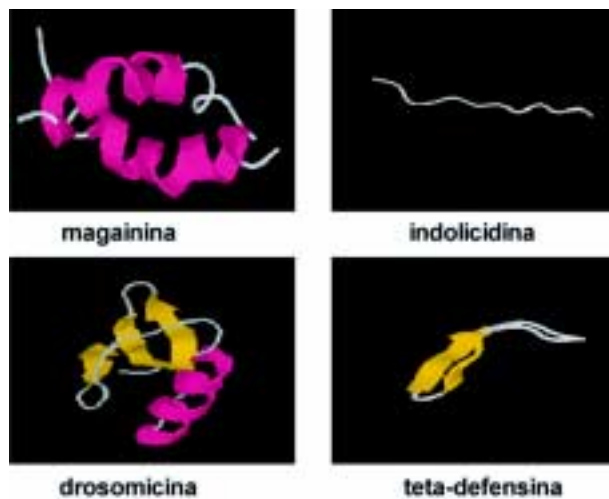
Figura 1. Possíveis mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos (Lohner, 2001)

ambientais, tais como desmatamento e alterações climáticas também proporcionam contato mais íntimo dos homens com animais e insetos que transmitem doenças muitas vezes desconhecidas (Lohner & Staudegger, 2001).

Assim sendo, várias medidas sócio-político-econômicas deveriam ser tomadas para a contenção do desenvolvimento e de transmissão de resistência antimicrobiana. Redução do uso inadequado e excessivo dos antibióticos no tratamento de doenças em geral, tanto humanas quanto de animais domésticos e da própria agricultura, poderia ser uma dessas medidas. Paralelamente, para que se consiga um efetivo controle das doenças infecciosas, tornou-se vital investir em pesquisa e em pesquisadores que possam se dedicar à busca de substâncias naturais ou sintéticas que exibam atividades antimicrobianas específicas e, acima de tudo, que as exerçam através de mecanismos de ação alternativos daqueles dos antibióticos disponíveis.

Nesse contexto, a pesquisa, a purificação, e a caracterização química, biológica e estrutural de novas substâncias antimicrobianas provenientes da fauna e da flora brasileira são valiosas, uma vez que a própria evolução tratou de selecionar um vastíssimo espectro de substâncias eficientes que defendem contra infecções.

Diariamente, nós humanos estamos expostos a muitos patógenos em potencial através da ingestão, inalação e contato com superfícies infectadas. Como a resposta humoral e celular adaptativa requer a expansão clonal dos linfócitos B e T, e leva até 7 dias para poder realmente ficar ativa contra as infecções, ela não é a responsável pelo impedimento inicial da instalação desses organismos. Portanto, dependemos da resposta imune inata para nos defender de infecção (Janeway, 1998). Os efetores da resposta imune inata incluem as células fagocíticas, tais como neutrófilos e macrófagos, de outros leucócitos, incluindo mastócitos, das proteínas do soro, tais como as do sistema de complemento, e dos peptídeos antimicrobianos (Hancock & Diamond, 2000). Esses últimos são elementos primitivos da resposta imune



**Figura 2.** Estruturas tridimensionais da magainina (Hara *et al.*, 2001), indolicidina (Rozek *et al.*, 2000), drosomicina (Landon *et al.*, 1997) e teta-defensina (Trabi *et al.*, 2001). Representadas, em amarelo, a estrutura folha  $\beta$ -pregueada e, em rosa, a estrutura  $\alpha$ -hélice)

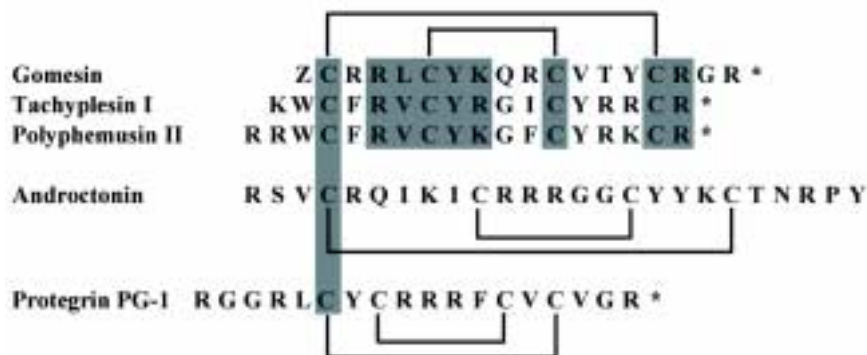
de todas as espécies de ser vivo, cujas vias de indução são relativamente conservadas em vertebrados, insetos e plantas (Hoffman *et al.*, 1999, Dangl & Jones, 2001). Recentemente, foi demonstrada a participação deles na modulação do processo inflamatório de mamíferos (Hancock & Diamond, 2000).

Mais de 700 peptídeos antimicrobianos já foram identificados em todas as espécies vivas, incluindo bactérias, fungos, insetos, moluscos, crustáceos, aracnídeos, plantas, pássaros, anfíbios, peixes, mamíferos, entre outros (<http://bbcm1.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm>). Em geral, são moléculas pequenas de até 5 kDa que exibem um alto teor de aminoácidos básicos e, pelo menos,

50% de aminoácidos hidrofóbicos (ver revisões em Andreu & Rivas, 1998; Bulet *et al.*, 1999; Hancock & Diamond, 2000). Apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. O mecanismo de ação mais bem conhecido é através da sua inserção na membrana celular que causa a destruição ou a permeabilização da mesma, levando o microorganismo à morte (Figura 1). Alternativamente, os peptídeos antimicrobianos podem se ligar a um receptor da membrana, levando a uma perda específica de sua função. Além disso, ao se translocarem através da membrana, essas moléculas podem atuar intracelularmente, impedindo a síntese de metabólitos importantes para o microorganismo. Por atuarem em diferentes compartimentos celulares, esses compostos tornam-se

candidatos promissores para o desenvolvimento de drogas importantes no combate a patógenos resistentes aos antibióticos convencionais (Lohner, 2001).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser agrupados de acordo com suas propriedades químicas e estruturais em 2 classes: lineares e cíclicos. Os lineares, não apresentam o aminoácido cisteína em sua composição, e podem ser subdivididos nos que formam uma  $\alpha$ -hélice anfipática após contato com a membrana celular (por exemplo, magainina de sapo, Hara *et al.*, 2001) e os ricos em um determinado tipo de aminoácido, tais como prolina, histidina e triptofano (por exemplo, indolicidina de bovino, Rozek *et al.*, 2000). Os



**Figura 3.** Alinhamento da gomesina com outros peptídeos antimicrobianos: taquiplesina e polifemusina de límulos, androctonina de escorpião e protegrina de suíno (Silva, Jr. *et al.*, 2000)

Peptídeos	Fonte	Massa Molecular	Atividade Antimicrobiana	Seqüência de aminoácidos	Similaridade
Gomesina	Hemócitos	2.270 Da	Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, Fungos e <i>Leishmania</i> (L.) <i>amazonensis</i>	Z <sup>+</sup> CRRLCYKQRCVITYCR GRa  *Z <sup>-</sup> : ácido piroglútmico Ra: arginina amidada	Taquiplasinas e Polifemusinas (limulos), Androctonina (escorpião) e Protegrina (suínos)
Acanthoscurrina (2 isoformas)	Hemócitos	10.111 Da 10.225 Da	Bactérias Gram-negativas, leveduras	DVYKGGGGGGRYGGGRY GGGGGYGGGLGGGGLG GGGLGGGKGLGGGGLG GGGLGGGGGLGGGLGG GKGI GGGGLGGGLGG GGGLGGGLGGGKGLGG GGGLGGGLGGGRRGG(G) Y(G)GGCCYGGCYGGCY GGGKYKG	Peptídeos ricos em glicina: a) relacionados com defesa em plantas e, b) antifúngicos de insetos
Mygalina	Hemócitos	417 Da	Bactérias Gram-negativas	Cys-Asx ligado a um derivado de dopamina	5-S-GAD de dípteros
Theraphosinina	Plasma	4.052 Da	Bactérias Gram-positivas	ETDXEAHRXRASRGPLV NDINGXENGXYNPN (31 aminoácidos – seqüência parcial)	Não apresenta similaridade com proteínas e peptídeos antimicrobianos

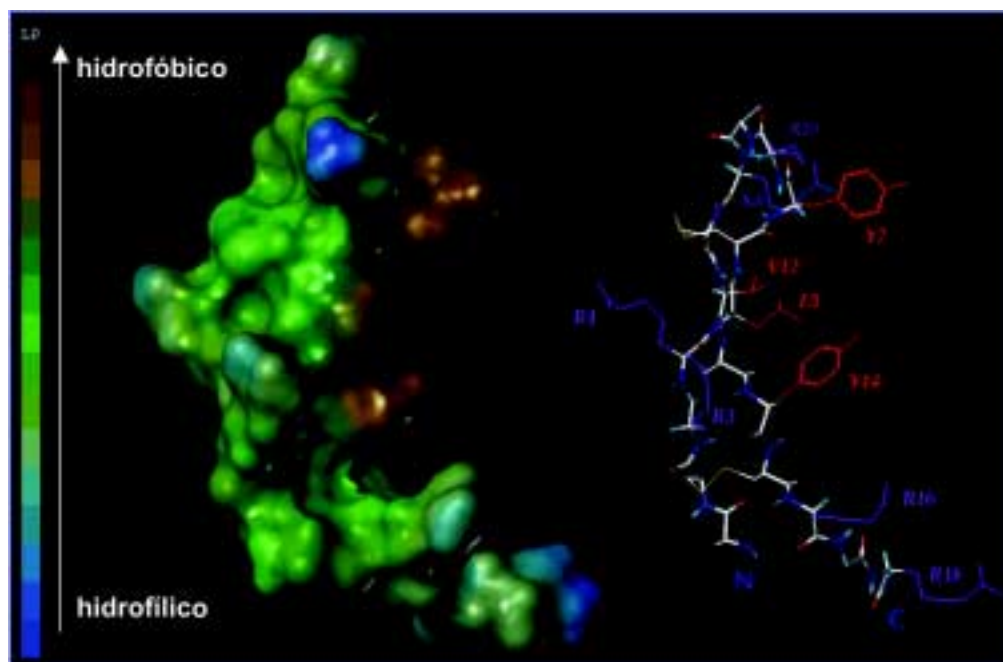
**Tabela 1.** Peptídeos antimicrobianos isolados da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*

cíclicos são peptídeos que apresentam resíduos de cisteína em sua estrutura, podendo ter as extremidades amino-terminal abertas (por exemplo, drosomicina da mosca *Drosophila melanogaster*, Landon et al.1997) ou as extremidades fechadas (por exemplo, teta-defensina de macaco, Trabi et al. 2001) (Figura 2).

#### Gomesina e outros peptídeos antimicrobianos da aranha caranguejeira

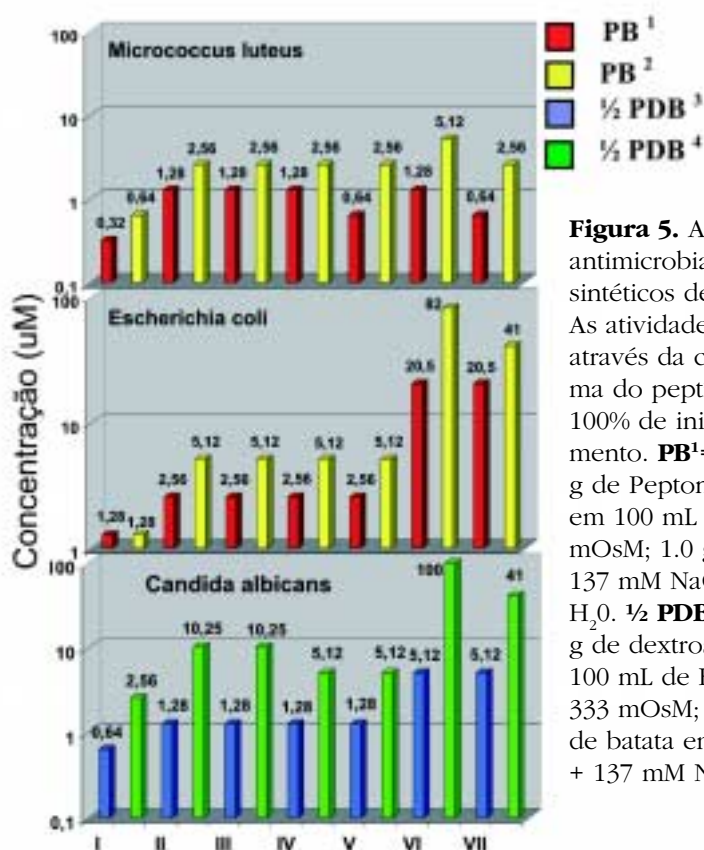
Entre os invertebrados, os estudos que visam caracterizar a estrutura e a atividade dos peptídeos antimicrobianos, assim como a regulação gênica deles concentram-se, principalmente, no grupo dos insetos (Bullet et al.,

1999). Já há alguns anos, o grupo de pesquisa da Dra. Sirlei Daffre (Departamento de Parasitologia, ICB-USP) vem trabalhando ativamente na identificação e caracterização de peptídeos em duas espécies de aracnídeos: a aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana* e o carrapato de boi *Boophilus microplus*. Esses peptídeos são importantes para a defesa desses animais contra infecções e, como tal, poderão ser usados no desenvolvimento de novas drogas para uso na medicina e na agricultura. Nos últimos anos, o referido grupo passou a contar com a colaboração de outros três grupos de pesquisa: o da Dra. M. Teresa M. Miranda (Departamento de Bioquímica, IQ-USP), o do Dr Philippe Bulet (Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS, Estrasburgo, França) e o do Dr. Antonio Miranda (Departamento de Biofísica, UNIFESP). Quatro peptídeos foram isolados da hemolinfa (sangue) da aranha caranguejeira (Tabela I; Silva Jr., 2000). Um deles, denominado gomesina, apresentou um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos e o parasita causador da leishmaniose (Silva Jr., 2000; Sil-



**Figura 4.** Estrutura tridimensional da gomesina determinada por ressonância magnética nuclear (RMN). À direita, a representação esquemática da molécula (Mandard *et al.*, 2001)

	Nome	Sequência
I	Gomesina	Z-C-R-R-L-C-Y-K-Q-R-C-V-T-Y-C-R-G-R-NH <sub>2</sub>
II	[Cys(Acm) <sup>2,11</sup> ]-gomesina	Z-C-R-R-L-C-Y-K-Q-R-C-V-T-Y-C-R-G-R-NH <sub>2</sub> Acm Acm
III	[Cys(Acm) <sup>2,13</sup> ]-gomesina	Z-C-R-R-L-C-Y-K-Q-R-C-V-T-Y-C-R-G-R-NH <sub>2</sub> Acm Acm Acm
IV	[Ser <sup>4,11</sup> ]-gomesina	Z-C-R-R-L-S-Y-K-Q-R-S-V-T-Y-C-R-G-R-NH <sub>2</sub>
V	[Ser <sup>2,13</sup> ]-gomesina	Z-S-R-R-L-C-Y-K-Q-R-C-V-T-Y-S-R-G-R-NH <sub>2</sub>
VI	[Cys(Acm) <sup>2,K,11,13</sup> ]-gomesina	Z-C-R-R-L-C-Y-K-Q-R-C-V-T-Y-C-R-G-R-NH <sub>2</sub> Acm Acm Acm Acm
VII	[Ser <sup>2,K,11,13</sup> ]-gomesina	Z-S-R-R-L-S-Y-K-Q-R-S-V-T-Y-S-R-G-R-NH <sub>2</sub>



**Figura 5.** Atividades antimicrobianas dos análogos sintéticos de gomesina (Gm). As atividades são expressas através da concentração mínima do peptídeo que causa 100% de inibição de crescimento. **PB<sup>1</sup>**= 217 mOsM; 1.0 g de Peptona + 86 mM NaCl em 100 mL de H<sub>2</sub>O. **PB<sup>2</sup>**= 367 mOsM; 1.0 g de Peptona + 137 mM NaCl em 100 mL de H<sub>2</sub>O. **½ PDB<sup>3</sup>** = 79 mOsM; 1.2 g de dextrose de batata em 100 mL de H<sub>2</sub>O). **½ PDB<sup>4</sup>** = 333 mOsM; 1.2 g de dextrose de batata em 100 mL de H<sub>2</sub>O + 137 mM NaCl

mente (cinco argininas e uma lisina). Apresenta um alto grau de similaridade com a família dos peptídeos básicos dos límulos: taquiplesinas e polifemusinas (50%; Nakamura et al., 1988; Miyata et al., 1989), da androctonina isolada do escorpião (23%; Ehret-Sebatier et al., 1996) e da protegriina presente em leucócitos de suínos (17%; Kokryakov et al., 1993) (Figura 3). A disposição das pontes dissulfeto, Cys1-Cys4 e Cys2-Cys3, é idêntica para todos estes peptídeos, sugerindo que a gomesina pode adotar uma estrutura "β-hairpin" como a encontrada nas taquiplesinas (Kawano et al., 1990; Tamamura et al., 1993), protegriinas (Aumelas et al., 1996; Fahrner et al., 1996), e androctonina (Mandard et al., 1999). Resultados recentes da análise da gomesina por ressonância magnética nuclear (RMN) em solução comprovam a ocorrência dessa estrutura na molécula (Mandard et al., 2001; Figura 4). A gomesina forma uma estrutura do tipo "β-hairpin" com folhas beta pregueadas anti-paralelas ligadas por uma volta β estabilizada por duas pontes dissulfeto. Ela ainda apresenta uma característica anfipática bem definida, de forma similar às estruturas determinadas para seus análogos taquiplesina e protegriina. Esse tipo de estrutura foi observado tam-

va Jr. et al., 2000). É um octadecapeptídeo de massa molecular equivalente a 2270,4 Da apresentando quatro resíduos de cisteína envolvidos em duas pontes dissulfeto (2-15 e 6-11), um ácido piroglutâmico na extremidade N-terminal e uma arginina α-amidada como resíduo C-terminal. Sua estrutura cícli-

ca com terminação aberta apresentando um ácido piroglutâmico N-terminal e a amidação C-terminal possivelmente protegem o peptídeo contra degradação por proteases. A gomesina é um peptídeo altamente básico (pI calculado de 12,7), pois contém seis resíduos de aminoácidos carregados positiva-

também em vários outros peptídeos antimicrobianos, cujos aminoácidos básicos (carregados positivamente em pH fisiológico) seriam responsáveis pela interação inicial eletrostática com os grupos carregados negativamente dos lipídeos das membranas dos microorganismos. Posteriormente, ocorreria a

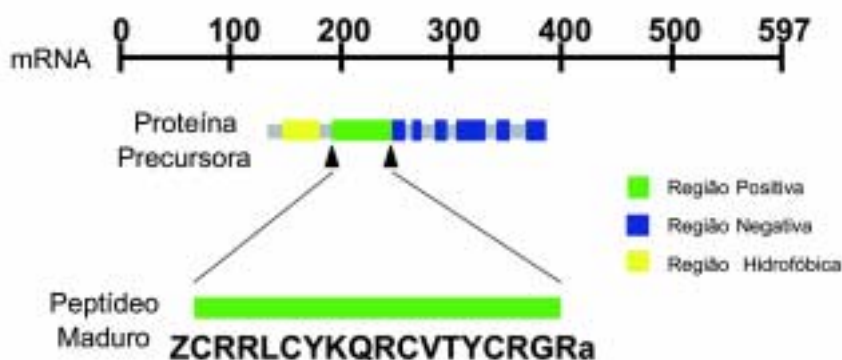
inserção da porção hidrofóbica dos peptídeos na membrana, promovendo a sua uma desestabilização (Oren & Shai, 1998).

A gomesina mostrou uma forte ação antimicrobiana contra 14 bactérias Gram-positivas, 10 bactérias Gram-negativas, 9 fungos filamentosos e 5 leveduras (Silva Jr. et al., 2000). Entre esses microorganismos, existem várias bactérias causadoras de infecções hospitalares, tais como a *Staphylococcus aureus*, a *Staphylococcus saprophiticus*, a *Streptococcus pyogenes* e a *Pseudomonas aeruginosa*. Além de causadoras de infecções hospitalares, a *Staphylococcus aureus* causa meningite e furúnculos, a *Staphylococcus saprophiticus* provoca infecção no trato urinário e a *Streptococcus pyogenes*, a febre reumática. Ainda como patogênicas aparecem a *Klebsiella pneumoniae*, causadora da pneumonia, a *Listeria monocytogenes*, associada à meningite e pneumonia, a *Candida albicans*, responsável pela candidíase, a *Cryptococcus neoformans*, causadora da meningite, a *Salmonella thyphimurium*, responsável pela salmonelose e a *Trichophyton mentagrophytes*, causadora da micose superficial.

Embora apresente uma certa atividade hemolítica (Silva Jr. et al., 2000), a gomesina tem-se mostrado um antimicrobiano com um grande potencial para aplicações terapêuticas em humanos, outros animais e em plantas. Essa afirmação decorre da combinação das seguintes propriedades: amplo espectro de atividade, rápida ação antimicrobiana e características estruturais que conferem alta estabilidade à molécula.

### Gomesina: importância das pontes dissulfeto para sua atividade

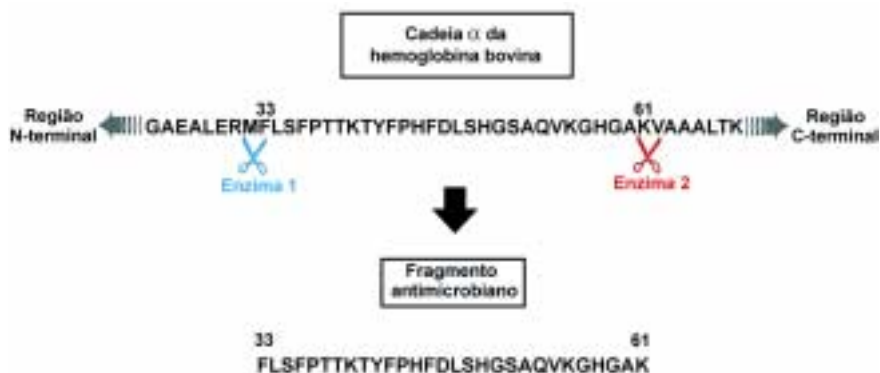
Com o objetivo de elucidar a importância das pontes dissulfeto na expressão da atividade biológica desse peptídeo e, ao mesmo tempo, buscar análogos mais seletivos e/ou mais estáveis à degradação enzimática que ele, foram sintetizados manualmente pelo método da fase sólida, os compostos listados na **Figura 5**. Esses compostos foram purificados por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) e caracterizados por RP-HPLC e cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa do tipo electrospray (LC/MS). As atividades antimicrobianas foram



**Figura 6.** Processamento da Gomesina. O transcrito do gene da gomesina é traduzido em uma proteína precursora de 9,7kDa. Essa proteína apresenta um peptídeo sinal (amarelo) e uma região carboxi terminal carregada negativamente (azul). A proteína precursora é processada pela remoção do peptídeo sinal e da região carboxi-terminal, a glutamina da extremidade amino-terminal é modificada em ácido piroglutâmico e a arginina carboxi-terminal é amidada

determinadas pelo ensaio líquido de inibição de crescimento contra *Micrococcus luteus* (bactéria Gram-positiva), *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa) e *Cândida albicans* (levedura),

para os três microorganismos testados, tanto nos meios com baixa concentração de NaCl (86 mM; PB<sup>1</sup>) ou sem sal (PDB<sup>3</sup>), como naqueles com uma concentração fisiológica de NaCl compará-



**Figura 7.** Possível mecanismo de processamento da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina bovina no intestino do carrapato de boi *B. microplus* e geração do fragmento antimicrobiano 33-61. A cadeia  $\alpha$  é clivada entre os resíduos de metionina (32) e de fenilalanina (33) pela **enzima 1** e entre os resíduos de lisina (61) e valina (62) pela **enzima 2**, gerando o peptídeo antimicrobiano

sendo expressas através da concentração mínima do peptídeo que causa 100% de inibição de crescimento (Silva Jr et al., 2000). Como pode ser observado na **Figura 5**, os análogos que apresentam somente uma das pontes dissulfeto, os monocíclicos {[Cys(Acm)6, 11], [Cys(Acm) 2,15], [Ser6,11] e [Ser2,15] - Gomesina}, foram de 2 a 4 vezes menos ativos que a gomesina nativa

vel ao do soro humano (137 mM NaCl; PB<sup>2</sup> e PDB<sup>4</sup>). Já os análogos sem as duas pontes dissulfeto, os lineares {[Ser2,6,11,15] e [Cys(Acm)2,6,11,15] Gm} foram de 2 a 16 vezes menos ativos que a gomesina nativa, na ausência e em baixa concentração de NaCl, sendo essa atividade reduzida mais ainda nos meios com uma concentração de 137 mM de NaCl (cerca de 4 a 64 vezes).

Observamos que há uma variação nesta redução dependendo do microorganismo, sendo significativamente maior para *E.coli* (32 a 64 vezes). A influência do sal na atividade da gomesina pode ser explicada pelo fato de o sódio estar competindo com os grupos carregados positivamente da gomesina durante a interação inicial eletrostática entre estes e os grupos carregados negativamente da membrana celular do microorganismo (Fázio *et al.*, 2001).

É extremamente importante esclarecer que embora os análogos sintetizados tenham apresentado atividades antimicrobianas mais baixas do que a gomesina nativa, eles exibiram atividades hemolíticas reduzidas em relação à dela: de 2 a 11 vezes na concentração de 100  $\mu$ M. Esses resultados sugerem que ambas as pontes dissulfeto são importantes para a expressão da atividade antimicrobiana da gomesina e que os análogos estudados apresentam uma especificidade de ação diferenciada contra certos microorganismos. Isso ocorre, muito provavelmente, devido às variações da composição da membrana de cada microorganismo, afetando na interação inicial eletrostática entre os grupos carregados positivamente da gomesina com os grupos negativos da membrana, e/ou na inserção da gomesina na porção hidrofóbica da membrana. Estudos envolvendo modificações adicionais da gomesina estão sendo realizados com o objetivo de se obter em análogos mais ativos e seletivos não hemolíticos.

### **Precursor da gomesina**

Através da clonagem do cDNA da gomesina, verificamos que esse peptídeo é traduzido na forma de uma proteína precursora de 9,7 kDA (Figura 6, Lorenzini *et al.*, 2001). Essa proteína apresenta um peptídeo sinal, indicando que o precursor da gomesina é direcionado ao retículo endoplasmático, que está provavelmente ligado à via de transporte para vesículas exocíticas para a liberação do peptídeo no meio extracelular. A região carboxi-terminal da proteína precursora é composta de aminoácidos ácidos, enquanto que a região que corresponde ao peptídeo maduro é composta de aminoácidos básicos. A porção carboxi-terminal carregada negativamente pode interagir com a parte catiônica do peptídeo para estabilizar a conformação do precursor



**Aranha caranguejeira**  
*Acanthoscurria gomesiana*

e permitir o processamento proteolítico ou ainda proteger a célula produtora de interações de suas membranas com a região básica do peptídeo, evitando assim a atividade tóxica contra a mesma.

A gomesina encontra-se armazenada nos grânulos dos hemócitos, como evidenciado por técnicas de imunofluorescência usando o anticorpo anti-gomesina, sendo secretada para o plasma da aranha pelo menos 2 horas após uma infecção experimental. Verificou-se que o gene que codifica para o peptídeo é transcrito predominantemente nos hemócitos de animais não infectados experimentalmente, tendo uma baixa expressão nos outros tecidos analisados: coração, intestino, hepatopâncreas, ovários, músculos e glândula de veneno (Lorenzini *et al.*, 2001).

### **Fragmento da hemoglobina bovina com atividade antimicrobiana no intestino do carrapato**

A investigação da produção de peptídeos antimicrobianos em outro aracnídeo, o carrapato de boi *Boophilus microplus*, feito no nosso laboratório, forneceu-nos um resultado surpreendente. Foi identificado um fragmento da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina bovina referente à região compreendida entre os resíduos 33 ao 61, com propriedades antimicrobianas (Fogaça *et al.*, 1999). Esse peptídeo, com massa molecular de 3.205,6 Da, foi inicialmente isolado

do intestino do carrapato. Para determinar seu espectro de ação, sintetizou-se quimicamente o mesmo que, após caracterização apropriada, foi testado contra várias cepas de bactérias e de fungos. Observou-se que o fragmento da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina bovina age em concentrações micromolares apenas contra bactérias Gram-positivas e contra fungos, não tendo sido ativo contra bactérias Gram-negativas. No entanto, a molécula da hemoglobina intacta não apresenta atividade antimicrobiana quando testada em concentrações superiores à do fragmento 33-61 da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina bovina. Verificou-se também que esse fragmento apresenta atividade hemolítica baixa, descartando uma possível função digestiva.

Dados na literatura mostram que a hemoglobina é digerida dentro dos eritrócitos de mamíferos gerando fragmentos com diferentes atividades biológicas, tais como liberação de corticotropina *in vitro* e a marcação das doenças Alzheimer e isquemia, entre outras (Ivanov *et al.*, 1997). Recentemente, foi descrita a geração de fragmentos de hemoglobina com atividade antimicrobiana após seu tratamento *in vitro* com enzimas comerciais (Mak *et al.*, 2000; Froidevaux *et al.*, 2001). No entanto, até o momento, o único fragmento antimicrobiano da hemoglobina que é gerado fisiologicamente é o 33-61 da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina bovina, detectado no intestino do carrapato *B.*

*microplus* (Fogaça *et al.*, 1999). Com base nessas informações, foi analisado se os eritrócitos bovinos rompidos *in vitro* apresentavam atividade antimicrobiana. Nenhuma atividade foi detectada, sugerindo que a hemoglobina dever estar sendo processada no intestino do carrapato por enzimas produzidas neste órgão, gerando assim o fragmento 33-61 com propriedades antimicrobianas (Figura 7). Iniciou-se a investigação das enzimas intestinais de *B. microplus* responsáveis pela clivagem da hemoglobina e a geração do fragmento ativo. Após a incubação da hemoglobina bovina com um extrato de intestino de carrapatos, foi observada a expressão de atividade antimicrobiana. Essa foi inibida pela incubação simultânea com um inibidor de áspartico-proteinase (pepstatina) e um inibidor de cisteíno-proteinase (E-64). Esse resultado sugere que, pelo menos, duas enzimas - uma áspartico e uma cisteíno-proteinase - estejam envolvidas na geração do fragmento antimicrobiano a partir da proteólise da hemoglobina. A purificação e caracterização dessas enzimas estão sendo realizadas.

A presença de uma atividade antimicrobiana no intestino dos carrapatos é de extrema importância para a defesa contra infecções desses animais, uma vez que as fêmeas podem ingerir bactérias do couro do hospedeiro durante a alimentação. Além disso, após a alimentação, as fêmeas se desprendem do couro do bovino caindo ao solo, colocando seus ovos em um ambiente muitas vezes bastante contaminado por microorganismos. No entanto, não só o intestino dos carrapatos é susceptível às infecções. A presença de outros três peptídeos antibacterianos, contendo cisteína, na hemolinfa desses animais foi também detectada (Fogaça *et al.*, 2001). A presença de vários peptídeos antimicrobianos em um mesmo animal é importante para garantir um espectro de ação amplo contra vários tipos de patógenos, garantindo assim a sobrevivência do animal alvo. Além disso, os peptídeos podem atuar sinergisticamente durante o combate às infecções.

### Conclusão

Além de vitais para o entendimento da ação antimicrobiana fisiológica desempenhada nos aracnídeos estudados, os peptídeos detectados também poderão ser usados como moléculas

base para o desenvolvimento de novas drogas antibióticas. Como já descrito acima, não há dúvida de que, com o surgimento de novos microorganismos resistentes à antibióticos, existe a necessidade urgente de se desenvolverem novas classes de antibióticos. Peptídeos antimicrobianos purificados, de diversas espécies de animais, apresentam características desejáveis a uma nova classe de antibióticos: um largo espectro de atividade, incluindo isolados resistentes a antibióticos convencionais; matam rapidamente, evitando a seleção de mutantes resistentes; apresentam sinergia com outros antibióticos; neutralizam endotoxinas e, portanto, bloqueiam a resposta septicêmica; e podem matar microorganismos em animais modelos. No entanto, vários problemas precisam ser resolvidos para serem produzidos em escala industrial. Um deles é por apresentarem uma massa molecular relativamente grande em relação aos antibióticos usados comercialmente; terão então, que ser produzidos por técnicas de biologia molecular, de modo a obter-se moléculas recombinantes, com um custo mais baixo. Apesar de várias metodologias terem sido descritas, nenhuma delas até agora foi usada em escala industrial (Hancock & Scott, 2000). Uma alternativa seria a produção por recombinação em genética em plantas (Parizotto *et al.*, 2000). Outro problema é a toxicidade que alguns desses peptídeos apresentam contra células de mamíferos. Como citado anteriormente, isso poderá ser conseguido por meio de modificações químicas na estrutura dessas moléculas. Outro aspecto a ser considerado é a resistência desses peptídeos à ação proteolítica do nosso organismo. No entanto, existem estratégias para proteger os peptídeos contra proteases, tais como a de incorporá-los em lipossomos ou a de usar modificações químicas (Hancock & Scott, 2000). Já existem, pelo menos, cinco empresas no mundo trabalhando na produção e estabelecimento de peptídeos antimicrobianos como novos antibióticos: Magainin (EUA), PPL Therapeutics (Inglaterra), Intrabiotics (EUA), Micrologix (Canadá) e Entomed (França), o que indica ser esse um campo bastante promissor. Portanto, os peptídeos antimicrobianos não são somente importantes como componentes do sistema imune inato participando do combate às infecções, mas seus análogos

químicos ou recombinantes apresentam um grande potencial para serem aplicados como antibióticos no combate contra microorganismos resistentes a antibióticos conhecidos ou mesmo contra novos alvos.

### Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte técnico dado por Susana Pessoa de Lima e o trabalho dos alunos de Iniciação Científica Ernesto S. Nakayasu, Aline H. Fukuzawa e Luciana M. Kaku. Sirlei Daffre, M. Teresa M. Miranda e Antônio Miranda recebem bolsa produtividade do CNPq. Alessandra Machado, Andréa C. Fogaça, Daniel M. Lorenzini, Eliane Esteves, Lourivaldo dos Santos Pereira são bolsistas da FAPESP. Marcelo Russo Burgierman recebe bolsa da CAPES. Marcos Antônio Fázio é bolsista do CNPq. Este trabalho recebe apoio financeiro da FAPESP através do projeto Temático 98/11372-4 e do projeto individual 00/03642-3.

### Bibliografia

- Andreu, D.; Rivas, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47: 415-433, 1998.
- Aumelas, A.; Mangoni, M.; Roumestand, C.; Chiche, L.; Despaux, E.; Grassy, G.; Calas, B.; Chavanieu, A. Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur J Biochem* 237:575-583, 1996.
- Bulet, P.; C. Hetru; J. L. Dimarcq; D. Hoffmann. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol.* 23:329-44, 1999.
- Dangl, J.L.; Jones, J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833, 2001.
- Ehreth-Sabatier, L.; Loew, D.; Goyffon, M.; Fehlbaum, P.; Hoffmann, J.A.; Van Dorsslaer, A.; Bulet, P. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J. Biol. Chem.* 27147:29537-29544, 1996.
- Fahrner, R. L.; Dieckmann, T.; Harwig, S. S.; Lehrer, R. I.; Eisenberg, D. & Feigon, J. Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chem Biol.* 3:543-550, 1996.
- Fázio, M.A.; Daffre, S.; Miranda, M.T.M.; Bulet, P.; Miranda, M. Importance

- of the intramolecular disulfide bridges in the biological activity of gomesin. Proceedings Book of the 17th American Peptide Symposium 2001, in press.
- Fogaça, A. C.; Silva, Jr., P.I.; Miranda, M.T.M.; Bianchi, A.G.; Miranda, A. P.; Ribolla, P.E.; Daffre, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. J Biol. Chem. 274:25330-25334, 2000.
- Fogaça, A.C.; Miranda, A.; Daffre, S. Antimicrobial peptides from the cattle tick. Programa e Resumos da XXX Reunião anual da SBBq, pp.32, 2001.
- Froidevaux, R.; Krier, F.; Nedjar-Aroume, N.; Vercaigne-Marko, D., Kosciarz, E.; Ruckebusch, C.; Dhulster, P.; Guillochon D. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. FEBS Lett 23:159-63, 2001.
- Hancock, R.E.W. ; Diamond, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defense. Trends in Microbiology 8: 402-410, 2000.
- Hancock, R.E.W.; Scott, M.G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. PNAS 97: 8856-8861, 2000.
- Hara T.; Kodama, H.; Kondo, M.; Wakamatsu, K.; Takeda, A.; Tachi T.; Matsuzaki, K. Effects of peptide dimerization on pore formation: Antiparallel disulfide-dimerized magainin 2 analogue. Biopolymers 58:437-446, 2001.
- Hoffmann, J. A.; Kafatos, F. C.; Janeway, C. A.; Ezekowitz, R. A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science, 284:1313-1318, 2000.
- Janeway, C.A.Jr. Presidential address to the American Association of Immunologists. The road less traveled by: the role of innate immunity in the adaptive immune response. J. Immunol. 61: 539-544, 1998.
- Kawano, K.; Yoneya, T.; Miyata, T.; Yoshikawa, K.; Tokunaga, F.; Terada, Y. ; Iwanaga, S. Antimicrobial peptide, tachyplesin I, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). NMR determination of the beta-sheet structure. J Biol. Chem. 265:15365-15367, 1990.
- Kokryakov, V. N.; Harwig, S. S.; Panyutich, E. A.; Shevchenko, A. A.; Aleshina, G. M.; Shamova, O. V.; Korneva, H. A.; Lehrer, R. I. (1993) Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. FEBS Lett. 327:231-236, 1993.
- Landon, C.; Sodano, P.; Hetru, C.; Hoffmann, J.; Ptak M. Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. Protein Science 6: 1878-1884, 1997.
- Lohner, K. The role of membrane lipid composition in cell targeting of antimicrobial peptides. In "Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies. Lohner, K. (ed), Horizon Scientific Press, England, pp 149-165, 2001.
- Lohner, K.; Staudegger, E. Are we on the threshold of the post-antibiotic era?. In "Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies. Lohner, K. (ed), Horizon Scientific Press, England, pp 1-15, 2001.
- Lorenzini, D.; Fukuzawa, A.H.; Bijovsky, A.T.; Daffre, S. Molecular characterization of gomesin, an antimicrobial peptide from spider hemocytes. Programa e Resumos da XXX Reunião anual da SBBq, pp.32, 2001.
- Mak P.; Wójcik K.; Silberring J.; Dubin A. (2000). Antimicrobial peptides derived from heme-containing proteins: Hemocidins. Antonie van Leeuwenhoek 77: 197-207, 2000.
- Mandard, N.; Sy, D.; Maufrais, C.; Bonmatin, J. M.; Bulet, P.; Hetru, C.; Vovelle, F. Androctonin, a novel antimicrobial peptide from scorpion *Androctonus australis*: solution structure and molecular dynamics simulations in the presence of a lipid monolayer. J. Biomol. Struct. Dyn. 17:367-380, 1999.
- Mandard, N.; Bulet, S.; Caille, A.; Daffre, S.; Vovelle, F. Solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from spider. Submitted to European J. Biochem., 2001.
- Miyata, T.; Tokunaga, F.; Yoneya, T.; Yoshikawa, K.; Iwanaga, S.; Niwa, M.; Takao, T.; Shimonishi, Y. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. J. Biochem. (Tokyo), 106:663-668, 1989.
- Miranda, A.; Koerber, S.C.; Gulyas, J.; Lahrerich, S.L.; Craig, A.G.; Corrigan, A.; Rivier, C.; Vale, W.; Rivier, J. J. Conformationally Restricted Competitive Antagonists of Human/Rat Corticotropin-Releasing Factor. Med. Chem., 37:1450-1459, 1994
- Nakamura, T.; Furunaka, H.; Miyata, T.; Tokunaga, F.; Muta, T.; Iwanaga, S.; Niwa, M.; Takao, T.; Shimonishi, Y. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure. J. Biol. Chem. 263:16709-16713, 1988.
- Oren, Z.; Shai, Y. Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. Biopolymers 47: 451-463, 1998.
- Parizotto, E.A.; De Lucca, P.C.; Jungmann, L.; Kemper, E.L.; Silva, A.C.; Leite, A. Plantas como biorreatores. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 17: 12-17, 2000.
- Rozek A.; Friedrich, C.L.; Hancock, R.E. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. Biochemistry 39:15765-15774, 2000.
- Silva Jr, P.I. Sistema imune em arácnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da USP para obtenção do título de doutor em Ciências, 2000.
- Silva Jr, P.I.; Daffre, S.; Bulet . 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. 275: 33464-33470, 2000.
- Tamamura, H.; Kuroda, M.; Masuda, M.; Otaka, A.; Funakoshi, S.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Waki, M.; Matsumoto, A. & Lancelin, J. M. A comparative study of the solution structures of tachyplesin I and a novel anti-HIV synthetic peptide, T22 ([Tyr5,12, Lys7]-polyphemusins II), determined by nuclear magnetic resonance. Biochim. Biophys. Acta 1163: 209-216, 1993.
- Trabi, M.; Schirra, H.J.; Craik, D.J.T. Three-dimensional structure of RTD-1, a cyclic antimicrobial defensin from Rhesus macaque leukocytes. Biochemistry, 2001: 4211-4221, 2001.