



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular



ALINE VIANA BEDNASKI

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: HEMOLINFA DE ARTRÓPODES COM
ÊNFASE EM ARANHAS, ESCORPIÕES E INSETOS VENENOSOS**

CURITIBA

2013

ALINE VIANA BEDNASKI

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: HEMOLINFA DE ARTRÓPODES COM
ÊNFASE EM ARANHAS, ESCORPIÕES E INSETOS VENENOSOS**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Msc. Dilza Trevisan Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Andrea Senff Ribeiro

CURITIBA

2013




**PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU EM
BIOLOGIA CELULAR E TECIDUAL**



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que Aline Viana Bednaski concluiu o curso de especialização em Biologia Celular e Tecidual no ano de 2012, apresentando a monografia em o título "Revisão Bibliográfica: Hemolinfa de Artrópodes com ênfase em Aranhas, Escorpiões e Insetos Venenosos" tendo obtido a nota máxima.

Curitiba, 08 de outubro de 2013.


Prof Dr Marco Antônio Ferreira Randi
Coordenador do Curso

Marco Antonio Ferreira Randi
Coordenador do Curso de Especialização
Biologia Celular e Tecidual

RESUMO

Os artrópodes são os animais com maior diversidade de espécies e mais abundantes de todo reino animal. Obtiveram sucesso evolutivo, habitando os mais diversos habitats e mantendo características peculiares, incluindo manter substâncias como lipídios e água na hemolinfa, o que permite aos artrópodes sobreviverem a longos períodos sem ingestão de água e nutrientes. A hemolinfa é o fluido intracorpóreo, se assemelha ao sangue dos vertebrados, mas com algumas diferenças e particularidades. É composta de células (hemócitos), altas concentrações de aminoácidos e fosfatos orgânicos, concentrações variadas de açúcares, vitaminas, ácidos orgânicos (ácidos graxos), diacilglicerol, triacilglicerol, hormônios, íons inorgânicos e outros compostos importantes para processos homeostáticos. Entender como os artrópodes mantêm a hemóstase mesmo em ambientes aparentemente inóspitos, abre um leque de possibilidades. Além disso, há poucos trabalhos que investigam a bioquímica da hemolinfa dos artrópodes, e pouco se conhece da fisiologia desses animais. Aliando as informações sobre a hemolinfa dos mais diversos artrópodes em uma revisão, ficará mais fácil identificar quais são os pontos falhos quando se trata desse assunto, e quais são os pontos mais solicitados, norteando novas pesquisas científicas. Conhecer novas proteínas, processos e mecanismos podem levar ao desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos. Com o exposto, o objetivo deste trabalho é reunir em uma revisão bibliográfica informações da literatura científica sobre a composição bioquímica e celular e as funções biológicas de hemolinfas de aranhas, escorpiões e insetos venenosos.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1- Transporte interno da aranha;

FIGURA 2- Tipos celulares na hemolinfa de carrapato da espécie *Rhipicephaleus sanguineus*;

FIGURA 3- Oenocitóide presente na hemolinfa de carrapato da espécie *Rhipicephaleus sanguineus*;

FIGURA 4- Perfil proteico de diversas espécies de aranha;

FIGURA 5- Estrutura tridimensional da hemocianina de artrópodes;

FIGURA 6- Mecanismos de defesa inata dos artrópodes;

FIGURA 7- Processo de melanização dos artrópodes.

TABELA 1- Metodologias para obtenção e estudo da hemolinfa de diversos artrópodes.

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	07
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. OBJETIVO.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
5. DISCUSSÃO.....	16
5-1. Funções gerais da hemolinfa.....	17
5-2. Metodologias para obtenção da hemolinfa e separação de seus componentes.....	19
5-3. Componentes celulares da hemolinfa.....	24
5-4. Composição proteica da hemolinfa.....	27
5-5. Lipoproteínas e composição lipídica da hemolinfa.....	32
5-6. Moléculas antimicrobianas.....	33
5-7. Resposta imunológica.....	36
6. CONCLUSÕES.....	40
7. REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

No filo Arthropoda estão incluídos, aranhas, escorpiões, insetos, centopéias, lacraias, caranguejos e camarões. Na realidade, a maioria dos animais conhecidos e descritos no mundo pertence ao filo dos artrópodes, o qual abriga cerca de um milhão de espécies (RUPPERT *et al.*, 2005). Sendo assim, constitui a maior representação de fauna do mundo, com grande sucesso evolutivo na diversidade de espécies. Esse filo tornou-se uma fonte poderosa e inesgotável de material para biologia molecular e bioquímica e muito conhecimento científico tem sido gerado a partir de estudos nestas áreas (VILCINSKAS e WEDDE, 2002; ZACHARIAH *et al.*, 2007).

Os artrópodes podem ser encontrados em todos os ambientes: aquático, terrestre e aéreo. Esses animais apresentam a maior taxa de sucesso na colonização de habitats devido sua enorme diversidade adaptativa (RUPPERT *et al.*, 2005).

As características dos artrópodes são: possuir exoesqueleto quitinoso, apresentar processo de ecdise, ter apêndices articulados e ausência de cílios locomotores, dentre outras (RUPPERT *et al.*, 2005; GULLAN e CRANSTON 2008). A morfologia externa varia dependendo da classe dos artrópodes, os insetos apresentam cabeça, tórax e abdômen; já os aracnídeos possuem cefalotórax (fusão da cabeça e tórax) e abdômen. (RUPPERT *et al.*, 2005; GULLAN e CRANSTON 2008).

O sistema de transporte interno dos artrópodes (figura 1) é um sistema hemal constituído de coração, artérias, seios, hemolinfa e hemocele. Os tecidos são banhados pela hemolinfa que funciona como um sistema de transporte de nutrientes, resíduos, hormônios e, às vezes, gases. Na ausência de celoma, a hemocele é a cavidade funcional dos artrópodes. (RUPPERT *et al.*, 2005).

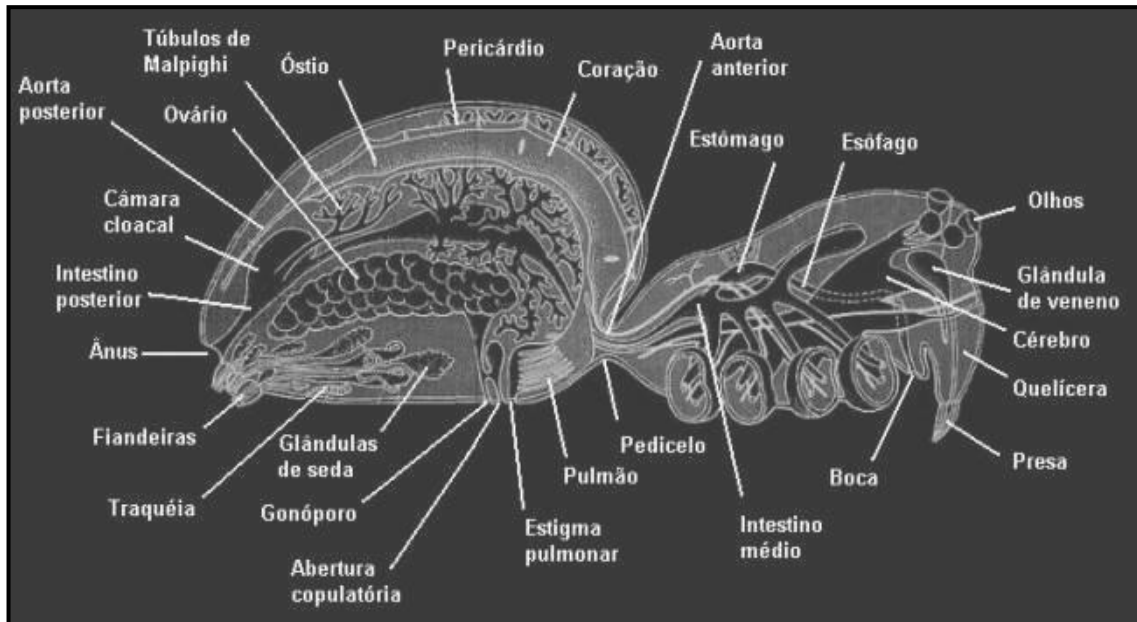


Figura 1- Desenho esquemático do sistema de transporte interno de aranha (Artrópode da classe Arachnida). Fonte: <http://araneae.hdfree.com.br/anatomiainterna.html>.

Todas as trocas químicas entre os tecidos dos artrópodes são mediadas pela hemolinfa, a qual é um líquido incolor ou levemente pigmentado, em cores que variam entre amarelo, verde e azul (GULLAN e CRANSTON, 2008; JALAL *et al.*, 2010). A hemolinfa circula nos vasos do sistema hemal, é composta de células (hemócitos) e altas concentrações de aminoácidos. Outros componentes estão presentes em concentrações variadas, como açúcares e carboidratos, sendo a trealose o principal carboidrato encontrado na hemolinfa dos insetos (MAYACK E NAUG, 2010). Encontram-se também vitaminas, ácidos orgânicos (ácidos graxos), diacilglicerol, triacilglicerol, hormônios, íons inorgânicos e outros compostos importantes para processos homeostáticos (GULLAN e CRANSTON, 2008; JALAL *et al.*, 2010). A hemolinfa pode eventualmente transportar gases associados aos pigmentos, mas insetos e aracnídeos possuem um sistema de trocas gasosas traqueal, no qual as trocas ocorrem diretamente com o tecido (CUNNINGHAM *et al.*, 1994; RUPPERT *et al.*, 2005; GULLAN e CRANSTON, 2008). Além disso, a hemolinfa também é uma reserva de água importante para esses animais (ZACHARIAH e MITCHELL, 2009). A circulação da hemolinfa se dá por sistemas de bombas musculares que a movimentam por compartimentos separados por septos fibromusculares ou membranas (GULLAN e CRANSTON, 2008).

Considerando as inúmeras funções e a importância da hemolinfa nesses animais, neste trabalho de revisão da literatura abordaremos somente a hemolinfa de artrópodes venenosos das classes Arachnidae e Insecta.

Os artrópodes predadores matam e consomem várias presas durante seu ciclo de vida. Segundo estimativas, cerca de 25% dos insetos são predadores ou parasitas. Entre as estratégias de caça dos insetos e aracnídeos, são observadas três importantes: sentar e esperar, fazer armadilhas e busca ativa, sendo que cada uma destas requer um investimento de tempo e gasto de energia distinto (GULLAN e CRANSTON, 2008). Na busca ativa, os insetos e aracnídeos precisam detectar e capturar a presa ou prendê-la antes de se alimentar. Diferentes estratégias de captura foram surgindo ao longo da evolução, de acordo com o estilo de vida do inseto predador, como possuir espículas nas pernas, o desenvolvimento de peças bocais e a produção de veneno (RUPPERT *et al.*, 2005; GULLAN e CRANSTON 2008).

O veneno dos artrópodes é produzido por glândulas que muitas vezes possuem ligação com as quelíceras, os aparelhos inoculadores, presentes nas aranhas (RUPPERT, 2005; PALUDO, 2008). Porém, há a possibilidade do veneno ser produzido por um epitélio e estar presente não no indivíduo adulto, mas sim em sua fase larval. Nestes casos não há aparelho inoculador, mas cerdas que armazenam veneno proteico (VEIGA, 2005). Quando a cerda é rompida, por exemplo, pelo contato acidental com humanos, o veneno é liberado e pode causar desde sintomas locais até manifestações sistêmicas graves. Os acidentes com a lagarta *Lonomia obliqua*, vulgarmente conhecida como taturana, ocorrem dessa forma (DONATO *et al.*, 1998; ZANNIN *et al.*, 2003; GRECO *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2010).

Por definição são considerados artrópodes venenosos aqueles que possuem um aparelho inoculador, bem como a glândula produtora de veneno e injetam toxinas e/ou saliva proteolítica nas presas. Como exceção tem-se as lagartas do gênero *Lonomia*, nas quais o veneno está localizado nas cerdas. Após a inoculação/liberação do veneno, a presa é primeiramente liquefeita pela ação de enzimas e, em seguida, o material da presa digerido é sugado através do aparelho bucal do animal predador (RUPPERT *et al.*, 2005; GULLAN e CRANSTON 2008; PALUDO, 2008). Alguns estudos sugerem que componentes do veneno podem participar na pré-digestão da presa, entretanto

essa questão ainda não está totalmente esclarecida (RASH e HUDGSON, 2002; PALUDO, 2008).

O veneno dos artrópodes é uma mistura complexa de proteínas de baixa massa molecular com ou sem atividade catalítica (hemolítica, proteolítica, colinesterásica, fosfolipásica) e associadas à pequenas quantidades de aminoácidos (CUPO *et al.*, 2003; GREMSKI *et al.*, 2010; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011). O veneno tem função de proteção e alimentação para os animais que o possuem. Considerando a cadeia alimentar dos artrópodes venenosos, a grande maioria das presas são outros indivíduos do mesmo filo, sendo assim, é esperado que o veneno contenha toxinas com ação inseticida. As proteínas dos venenos dos artrópodes podem apresentar as mais diversas ações nos mamíferos. Estas toxinas podem atuar em sítios específicos dos canais de sódio, produzindo despolarização das terminações nervosas pós-ganglionares dos sistemas simpático, parassimpático e da medula da supra-renal, desencadeando liberação de adrenalina, noradrenalina e acetilcolina, ocasionando diferentes sintomas nas vítimas (CUPO *et al.*, 2003).

Dentre os milhares de artrópodes existentes, os venenosos estão alocados nas classes: Insecta, Arachnida (ordens Scorpiones e Araneae) e Chilopoda. Alguns outros táxons de artrópodes, que não pertencem a nenhuma das classes acima citadas, apresentam animais venenosos em fase larval, como é o exemplo da *Lonomia obliqua* (Lepidoptera). Quando o homem entra em contato com as cerdas desta lagarta, o veneno age sobre o organismo (GRECO *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2010).

A classe Insecta possui indivíduos que variam de tamanho (0,2 mm a 30 cm) e aparência, como exemplo de insetos venenosos têm as abelhas. Os adultos da classe Insecta em geral apresentam ocelos e olhos compostos, peças bucais expostas, tórax evidente, pernas torácicas com mais de cinco artículos e abdômen segmentado. Nos insetos, as trocas gasosas ocorrem predominantemente por traquéias com espiráculos presentes tanto no tórax quanto no abdômen. Uma característica importante que diferencia a classe Insecta da classe Arachnida é que os indivíduos da classe Insecta podem ser alados e possuem três pares de pernas, enquanto os indivíduos da classe Arachnida não são alados e possuem quatro pares de pernas. Tradicionalmente, existem 30 ordens de insetos (GULLAN e CRANSTON, 2008).

A classe Arachnida é composta por 14 ordens dentre elas, as ordens Scorpiones (escorpiões) e Araneae (aranhas) são as que possuem representantes produtores de veneno (RUPPERT *et al.*, 2005). Os aracnídeos são popularmente conhecidos devido aos acidentes de envenenamento que acometem humanos e outros mamíferos (CUPO *et al.*, 2003; AMORIM *et al.*, 2003; RUPPERT *et al.*, 2005).

A ordem Scorpiones é representada por escorpiões, esses artrópodes possuem hábitos noturnos e são encontrados na maioria dos ambientes terrestres, incluindo florestas, pastagens e ambientes desérticos. Algumas espécies de escorpião podem se associar à vegetação e são encontradas próximas ou mesmo dentro das habitações de humanos (RUPPERT *et al.*, 2005).

Araneae é uma ordem ímpar na classe Arachnida, pois seus representantes são os únicos que produzem seda e constroem teias, como exemplo dessa ordem há a aranha marrom, gênero *Loxosceles* (Mello-leitão, 1964). As aranhas realizam as trocas gasosas por meio de pulmões foliáceos e/ou traquéias, além de muitos indivíduos possuírem glândulas de veneno e apresentarem dimorfismo sexual. Algumas espécies são canibais, como por exemplo, a “viúva-negra” *Latrodectus mactans* (DIAS e BRAZIL, 1999; GILBERT, 1997; RUPPERT *et al.*, 2005).

Outra Classe dos artrópodes que possui representantes venenosos é a Chilopoda, onde estão incluídas as lacraias e centopéias. As características principais desses animais são: possuir no mínimo 12 pares de patas, variando de acordo com o tamanho do animal, e serem predadores velozes, que inoculam seu veneno por meio de garras dianteiras. Outra característica relevante é possuir pernas no último segmento em formato de pinças, que não tem função locomotora, mas destinam-se à percepção do ambiente (RUPPERT *et al.*, 2005).

Um aspecto interessante dos artrópodes é fato de estarem em contato com os mais diversificados microorganismos. Muito embora não apresentem um sistema de resposta imune adaptativa, esses animais lidam com invasores de forma curiosa e eficiente, liberando na hemolinfa peptídeos que combatem os invasores.

A curiosidade da comunidade científica em entender melhor a fisiologia desses pequenos animais, bem como entender as relações de transporte

fisiológico interno com a produção de veneno é justificada. Os artrópodes são os animais mais abundantes do planeta Terra, com maior número de espécies conhecidas, dominam cadeias e teias alimentares e trazem ao homem diversos problemas de saúde pública e de ordem econômica (GULLAN e CRANSTON 2008).

Em dias atuais, onde cada vez mais a informação é a grande motivadora da ciência e geradora das novas ideias e novas perguntas, fica evidente a importância de se compreender os processos fisiológicos que regem a vida de animais tão interessantes como os artrópodes produtores de veneno.

2. JUSTIFICATIVA

A motivação para elaboração deste trabalho de revisão de literatura apresenta-se sob diferentes aspectos do conhecimento:

A ausência de revisões bibliográficas na literatura que abordem hemolinfa de forma geral;

A compilação de dados da literatura irá permitir uma melhor compreensão dos processos fisiológicos, por meio do conhecimento da composição bioquímica e papel funcional da hemolinfa de aranhas, escorpiões e insetos.

A reunião de dados da literatura relacionada a hemolinfas de artrópodes venenosos permitirá novos estudos, uma vez que, indicará quais processos e/ou caracterizações de hemolinfas são pouco conhecidos ou pouco estudados.

O conhecimento a cerca da hemolinfa de animais venenosos apresenta ainda maior relevância quando consideramos o problema de saúde pública causado pelo envenenamento, como é o caso de Curitiba e Região metropolitana no Paraná que é considerada área endêmica para acidentes com a aranha marrom da espécie *Loxosceles intermedia* (SILVA *et al.*, 2004).

3. OBJETIVO

Reunir em uma revisão bibliográfica informações da literatura científica sobre a composição bioquímica e celular e as funções biológicas de hemolinfas de aranhas, escorpiões e insetos venenosos. As diferentes metodologias utilizadas para manipulação e estudo da hemolinfa também serão discutidas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A revisão de literatura foi do tipo exploratório descritiva, realizada com o auxílio das seguintes bases de dados: Pubmed; Lilacs; Medline; Scielo; Science Direct, Google, além do acervo da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. As palavras chaves utilizadas na busca foram: hemolinfa (titulo), hemolinfa+escorpião (titulo e resumo), hemolinfa+ aranha (titulo e resumo) hemolinfa+himenoptera (titulo e resumo) e hemolinfa+ chilopoda (titulo e resumo). As palavras chaves foram colocadas em inglês e em português.

As referencias bibliográficas foram selecionadas de acordo com publicações em português e inglês e totalizaram 62 referencias bibliográficas. A partir dessas referências, foram selecionados os artigos que apresentavam resultados de investigação bioquímica e biológica de hemolinfa somente de insetos e aracnídeos venenosos. Durante a seleção não houve restrição temporal de publicação, devido ao fato de existir um número restrito de trabalhos relacionados ao tema, e também porque alguns artigos antigos trazem informações importantes que não são encontradas em estudos mais recentes, como por exemplo, o artigo de 1994 de Cunningham e colaboradores.

5. DISCUSSÃO

Muitos estudos que investigam os componentes da hemolinfa de artrópodes venenosos buscam aplicações médicas, farmacêuticas e/ou biotecnológicas desses compostos. Já foram identificadas diversas moléculas interessantes, como por exemplo, peptídeos com atividade antimicrobiana (FUKUZAWA, 2007). Na hemolinfa de aranhas da espécie *Cheiracanthium mildei* e de escorpiões da espécie *Uroctonus mordaxi* foram identificados fluoróforos, que são pequenas moléculas que podem servir como forma de comunicação entre artrópodes dessas espécies (REED *et al.*, 2008). Em consequência dessa busca por moléculas com aplicações biotecnológicas, foram descobertos diversos componentes de hemolinfas, e alguns desses levantaram questionamentos sobre a origem biológica dessas moléculas. Por exemplo, a origem de vitamina D3 na hemolinfa de aranhas da espécie *Theraphosa blondi* é incerta, discute-se que ela possa ser sintetizada devido à exposição à radiação ultravioleta, ou ainda, que ela seja obtida através da alimentação das aranhas (ZACHARIAH *et al.*, 2009).

Raros artigos investigam a hemolinfa de indivíduos do gênero *Scolopendra* sp. popularmente conhecidos como lacraias, muito embora esses animais tenham importância médica. Acidentes com lacraias não são incomuns. Um dos aspectos mais discutidos sobre a hemolinfa das lacraias é a sua composição bioquímica. Foi visto que a proteína hemocianina, que é uma proteína pigmentar complexada com cobre, e que facilita o transporte de oxigênio na hemolinfa dos mais diversos artrópodes, é conservada em espécies do subfilo Myriapoda, ao qual está incluída a lacraia (JAENICKE *et al.*, 1999).

A hemolinfa dos escorpiões é estudada desde o século passado, com o intuito tanto de encontrar peptídeos com aplicação médica (EHRET-SABATIER *et al.*, 1996), quanto de relacionar os componentes da hemolinfa com moléculas do veneno desses animais (ZHU *et al.*, 2000).

De maneira geral, em hemolinfas de insetos e aracnídeos venenosos são descritos vários tipos de peptídeos (lineares, com pontes dissulfeto ou em alfa-hélice) que apresentam diversas funções. Analisando somente as sequências aminoacídicas desses peptídeos é muito difícil prever ou sugerir quais funções cada peptídeo pode exercer na hemolinfa. Saidemberg e colaboradores (2011)

utilizaram peptídeos presentes na hemolinfa e no veneno de Heminoptera para propor um modelo matemático com intuito de prever e discriminar funções desses peptídeos classificando-os como peptídeos antibióticos ou quimiotáticos, sem a necessidade de testá-los um a um, facilitando a descoberta de peptídeos para os mais diversos interesses. Contudo, somente o avanço da ciência e do conhecimento nesta área poderão validar este modelo matemático.

5-1. Funções gerais da hemolinfa

A hemolinfa é o único tecido fluido extracelular no corpo dos artrópodes, portanto, é a maior reserva de água e metabólitos desses animais. A quantidade e composição da hemolinfa variam conforme a espécie, momento fisiológico e a idade do animal. Pode corresponder de 15 a 75% do volume total do corpo dos insetos e em aranhas geralmente perfaz cerca de 20% do seu volume corpóreo (ARAÚJO, 2009; TRABALON *et al.*, 2010).

Em contato com o ar a hemolinfa tem grande tendência de se tornar escura, devido à ação da enzima tirosinase frente aos diferentes pigmentos que conferem cor à hemolinfa (ARAÚJO, 2009).

A hemolinfa de aracnídeos e insetos exerce muitas funções importantes ao longo da vida desses animais. Pelo fato dos artrópodes possuírem um sistema traqueal, onde os gases de respiração entram em contato direto com os tecidos, a hemolinfa é pouco relevante para a respiração. Embora seja essencial para o animal, pois participa de vários outros processos homeostáticos (RUPPERT e BARNES, 1996), como o transporte de hormônios e enzimas para todo o corpo do animal, transporte de elementos nutritivos do sistema digestivo para os demais órgãos e transporte de resíduos do metabolismo para excreção. Além disso, participa da defesa do animal e armazenamento de água e lipídeos, bem como de outras funções exemplificadas na sequência (ARAÚJO, 2009). Ainda, a distribuição diferencial da pressão da hemolinfa pode facilitar os processos de eclosão e de ecdise (trocas periódicas do exoesqueleto quitinoso para crescimento do animal) (ARAÚJO, 2009; RUPPERT *et al.*, 2005).

Há relatos da relevância da hemolinfa de aracnídeos na locomoção, na captura de presas e em situações de fuga (WEIHMAN *et al.*, 2010). Os

aracnídeos não possuem músculos extensos e a pressão da hemolinfa auxiliaria nos movimentos (RUPPERT *et al.*, 2005).

Outra importante função descrita para hemolinfa de artrópodes é a proteção que pode ser separada em três eventos distintos: (a) após ferimentos físicos onde componentes da hemolinfa promovem a coagulação e vedação do ferimento, evitando a perda desse fluido e evitando a entrada de bactérias; (b) combate de microorganismos invasores, parasitas ou outras substâncias estranhas, pois caso ocorra o contato com contaminantes e/ou microorganismos invasores inicia-se a resposta imunológica, a qual tem pouca semelhança com a resposta imunológica dos vertebrados, mas é muito eficiente; (c) combate a predação, isso porque, a hemolinfa de alguns artrópodes podem conter substâncias malcheirosas ou repugnantes a predadores (GULLAN e CRANSTON, 2008).

Os estudos de hemolinfa acrescentam informações importantes sobre a biologia e fisiologia do animal. É descrito, para aranhas da espécie *Brachypelma albopilosa*, que em épocas de acasalamento e dependendo da fase da vida do artrópode ocorrem alterações na composição lipídica circulante na hemolinfa e tais mudanças podem influenciar no comportamento de predação, inibindo-o ou estimulando-o de acordo com a disponibilidade de nutrientes circulantes na hemolinfa (TRABALON, 2011).

Acredita-se que um dos fatores que levaram os artrópodes ao sucesso evolutivo é a capacidade de armazenamento de água e lipídios na hemolinfa. Essa propriedade da hemolinfa impede o dessecamento do animal em tempos de seca, além de ser uma fonte de energia de fácil armazenamento. Os lipídios circulantes associados às proteínas na hemolinfa e os lipídios da própria membrana dos hemócitos podem constituir fonte de energia por meio de processos biológicos, quando necessário (ANGELO *et al.*, 2010).

Além da participação em diferentes processos fisiológicos, é sabido que a hemolinfa de alguns artrópodes podem apresentar função tóxica quando em contato com outros organismos. Akhunov e colaboradores (2001) constataram que a hemolinfa de aranhas da espécie *Latrodectus tredecimguttatus* é tóxica para mamíferos, levando a morte de camundongos após a administração de apenas 10 µg de hemolinfa. Outro estudo mostra que a hemolinfa de *Lonomia achelous* apresenta uma inesperada atividade fibrinolítica, sendo esta atividade responsável pelo restabelecimento do fluxo sanguíneo no interior dos vasos

após uma injúria vascular por meio da dissolução do coágulo formado (AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 2000).

5-2. Metodologias para obtenção da hemolinfa e separação de seus componentes

Diferentes metodologias são aplicadas para coleta, manipulação e separação dos componentes da hemolinfa. A escolha de uma determinada metodologia depende dos objetivos de cada estudo. Na tabela 1 estão reunidas algumas metodologias descritas para os diferentes objetivos em estudos de hemolinfas de insetos e aracnídeos venenosos. A coleta da hemolinfa na maioria das vezes é letal para o animal, principalmente para aracnídeos e insetos pequenos (RIMOLDI *et al.*, 1998). Para invertebrados em geral, é recomendado que a coleta de amostras da hemolinfa não exceda 1 mL a cada 100 g de peso corpóreo para que o animal sobreviva ao procedimento. Especificamente para tarântulas, já foi demonstrado que elas sobrevivem a coleta de até 2 mL de hemolinfa por 100 g do animal (ZACHARIAH *et al.*, 2007). Em todos os estudos analisados de aracnídeos e insetos venenosos, os animais são anestesiados previamente a coleta. Trabalhos mais antigos sobre hemolinfa relatam que a coleta deve ser feita anestesiando os artrópodes, seja com baixas temperaturas -20°C por poucos minutos (RIMOLDI *et al.*, 1989) seja com gás dióxido de carbono por 1 ou 2 minutos (CARREL, 1990; TILLINGHAST e TOWNLEY, 2008). Trabalhos mais atuais recomendam que a anestesia dos artrópodes seja feita a 4°C por uma hora (TRABALON *et al.*, 2010), com éter (ZACHARIAH *et al.*, 2007; YİĞİT e BENLİ, 2008) ou até mesmo com álcool (JALAL *et al.*, 2010). No trabalho de Zachariah e colaboradores (2007) é utilizado o isoflurane 5% para anestésiar aranhas (*Theraphosa blondi* e *Grammostola rosea*) com o objetivo de estudar a bioquímica da hemolinfa, nesse caso as aranhas puderam ser recuperadas após a coleta da hemolinfa com oxigênio 100%.

As formas de obtenção da hemolinfa são de um modo geral manuais, utilizando seringa e agulha ou seccionando as pernas e coletando a hemolinfa com o auxílio de uma micropipeta, sempre na presença de anticoagulantes (SILVA JUNIOR, 2000; YİĞİT e BENLİ, 2008; JALAL *et al.*, 2010; TRABALON *et al.*, 2010). Existem quatro maneiras principais de se coletar hemolinfa em

espécimes adultos: secção das pernas do animal, punção do vaso dorsal, punção da articulação coxa-trocanter e punção perdicárdica (Tabela 1). Em casos de coleta de hemolinfa de larvas, a metodologia mais simples e mais difundida é inserir um capilar de vidro no segundo segmento abdominal, sendo que desta forma pode ocorrer a contaminação com fezes. Com intuito de evitar essa contaminação, uma alternativa é realizar uma pequena incisão em região mais anterior da larva e coletar a hemolinfa com um capilar de vidro (CHAN *et al.*, 2006;). Os principais anticoagulantes utilizados são N-acetil-L-cisteína e heparina, ambos na molaridade de 5 mM (RIMOLDI *et al.*, 1989; ZACHARIAH *et al.*, 2007) ou tampão citrato de sódio pH 4,6 contendo NaCl 0,45 M; glicose 0,1 M; citrato trissódico 30 mM; ácido cítrico 26 mM; EDTA 10 mM (SILVA JUNIOR, 2000; FUKUZAWA *et al.*, 2008 e TRABALON *et al.*, 2010). Dependendo do objetivo do estudo, a hemolinfa não pode ser coletada com coquetéis de inibição que contenham quelantes como anticoagulantes, com proteínas que inibam a ação de proteases ou inibam a oxidação, e nesses casos uma boa alternativa é a coleta em solução salina (0,3 M de NaCl, 0,025 M de KCl, 1,44 mM de CaCl₂, 0,047 mM de NaHCO₃ em 100 ml de água destilada) (YİĞİT e BENLİ, 2008).

Independente da metodologia de coleta escolhida, a hemolinfa pode ser coletada separadamente de machos e fêmeas quando há o objetivo do pesquisador em ver as diferenças entre os gêneros e pontuá-las. Isso ocorre também quando se investiga determinadas substâncias da hemolinfa relacionadas com a nutrição do animal, seu estado de hidratação ou épocas do ano, bem como acasalamento e reprodução. Como exemplos, há o trabalho de Zachariah e colaboradores (2007), que buscou estabelecer valores de referência dos componentes bioquímicos da hemolinfa de duas espécies de tarântulas (*Grammostola rosea* e *Theraphosa blondi*). Esse estudo investigou também a existência de diferenças na hemolinfa de machos e fêmeas da espécie *T. blondi*. Para tanto, os autores coletaram separadamente hemolinfa das duas espécies de aranhas, e de machos e de fêmeas da espécie *T. blondi*.

Essa forma de coleta possibilitou a avaliação comparativa de diversos parâmetros como peso corporal, concentração de íons (cálcio, sódio e potássio), osmolaridade e quantidade de proteína total. Jalal e colaboradores (2010) também realizaram coleta de hemolinfa de várias espécies de aranhas (*Myrmarachne maratha*, *M. orientales*, *M. bengalensis*, *M. laetus*, *M. japonica*,

Phidippus workmani, *Thyene imperialis*, *Plexippus paykulli*, *Phintella sp.*, *P. castriesiana*, *Pelegrina verecunda*, *Cheiracanthium mildei*, *Elaver sp.*, *Stegodyphus sarasinorum* *Heteropoda kandiana*, *Olios lutescens*, *O. flavidus* and *O. giganteus*) e analisaram concentrações de íons, existência de atividade caseinolítica e gelatinolítica, levando-se em consideração o sexo das aranhas.

Para se estudar a hemolinfa de uma forma geral, ou seja, todos os seus componentes, hemócitos, proteínas e lipídeos, não há discriminação dos indivíduos, mas é importante que a hemolinfa seja coletada de espécimes que estejam em faixas etárias próximas. Indivíduos juvenis possuem hormônios circulantes diferentes daqueles observados em animais adultos (TRABALON *et al.*, 2010). Além disso, deve-se sempre lembrar que é importante conter na amostra de hemolinfa uma representação significativa da população dos artrópodes em estudo, não apenas indivíduos isolados. O recomendado é fazer um “pool” de hemolinfa com diversidade biológica relevante, como realizado por Chan e colaboradores (2006), onde analisam as diferentes proteínas na hemolinfa de abelha (*Apis mellifera*), e comparam entre as classes hierárquicas.

Alguns estudos com hemolinfa requerem que haja separação das células e do plasma (hemolinfa livre de células), a qual pode ser realizada por centrifugação após a coleta da hemolinfa (Tabela 1). Em geral, as centrifugações são realizadas por 10 min a 4°C variando as rotações entre 10.000 rpm, 800g (RIMOLDI *et al.*, 1989; TRABALON *et al.* 2010; CHAN *et al.*, 2006; FUKUZAWA, 2007 e SILVA JUNIOR, 2000). Após a centrifugação, os hemócitos formam um delicado “pellet” e o plasma pode ser estocado a -30°C para análises futuras. O plasma é geralmente utilizado para estudos dos componentes proteicos da hemolinfa.

Objeto de estudo	Espécie estudada	Analgesia	Metodologias de coleta de hemolinfa	Metodologias para obtenção do plasma (hemolinfa livre de hemócitos)	Referência
Lipoproteínas da hemolinfa	Barbeiro <i>Triatoma infestans</i>	Resfriamento	Secção das pernas e centrifugação 120g por 1min a 4°C	Centrifugação 10.000g por 10min a 4°C	RIMOLDI <i>et al.</i> , 1989
Proteínas da hemolinfa	Abelha <i>Apis Mellifera</i>	Não mencionado	Punção do vaso dorsal em adultos e pequena incisão em larvas e coleta com capilar de vidro	Centrifugação 16.100g por 10min a 4°C	CHAN <i>et al.</i> , 2006
Peptídeos antimicrobianos	Aranha <i>Acanthoscurria gomesiana</i>	Resfriamento	Punção do vaso dorsal	Centrifugação 800g por 10min	FUKUZAWA, 2007
Hemocianina	Centopéias <i>Spirostreptus sp.</i> e <i>Telodeinopus aoutii</i>	Não mencionado	Punção do dorso segmentar com seringa	Centrifugação 10.000g por 10min	JAENICKE <i>et al.</i> , 1999
Peptídeos antimicrobianos	Aranha <i>Acanthoscurria gomesiana</i>	Resfriamento	Punção do vaso dorsal	Centrifugação 800g por 10min	SILVA JUNIOR, 2000
Peptídeos com ação antiviral	Lagarta <i>Lonomia obliqua</i>	Não mencionado	Não mencionado	Centrifugação 1000g por 10min	GRECO <i>et al.</i> , 2009
Proteínas da hemolinfa	Aranha <i>Brachypelma albopilosa</i>	Resfriamento 4°C por 1 hora	Coleta com agulha no pericárdio	Centrifugação 10.000 rpm por 10min a 4°C	TRABALON <i>et al.</i> , 2010
Peptídeos antimicrobianos	Opilião <i>Acutisoma longipes</i>	Não mencionado	Punção da articulação coxa-trocanter	Centrifugação 800g por 10min a 4°C	SAYEGH, 2011

Tabela 1- Metodologias aplicadas a obtenção e ao estudo de hemolinfas de diversos artrópodes.

As frações lipídicas presentes nas hemolinfas são identificadas e separadas pelas mais diversas formas de cromatografias, como a HPTLC - (High-performance thin-layer chromatography) cromatografia de camada delgada, entre outras (CUNNINGHAM *et al.*, 1994; LAINO *et al.*, 2009; TRABALON, 2011). Utilizando-se tais métodos cromatográficos foram identificados ácidos graxos, fostatidiletaloamina, fostatidilcolina e triacilglicerol em hemolinfa da tarântula da família Theraphosidae (CUNNINGHAM *et al.*, 1994).

Para estudos de hemolinfa de escorpiões e centopeias as metodologias de coleta de hemolinfa não se alteram muito. Como visto em Ehret-Sabatier e colaboradores (1996) a hemolinfa é coletada do cefalotórax e centrifugada por 800 g em 30 min e armazenadas em freezer -30°C. Já no estudo de Jaenicke e colaboradores (1999) a hemolinfa é retirada do dorso segmentar com seringa e agulha de indivíduos da família Spirostreptidae, na presença de anticoagulante contendo 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂. Para obtenção de uma hemolinfa livre de células foi necessário centrifugar o coletado a 10.000 g por 10 min, e estocado a 4°C ou -20°C.

Foi relatado que para se estudar as cascatas de coagulação presentes na hemolinfa de abelhas – *Apis mellifera*, a hemolinfa foi coletada com micropipeta a partir de fissura feita no cefalotórax, porém a hemolinfa recebeu como anticoagulante apenas EDTA em PBS, sem adição de inibidores de proteases, além disso, durante a coleta a hemolinfa foi sempre mantida em gelo (CHAN *et al.*, 2006).

Para estudar peptídeos presentes na hemolinfa de *Lonomia obliqua*, as cerdas foram cortadas, e a hemolinfa foi coletada em larvas de sexto instar, clarificada por centrifugação. O sobrenadante foi termicamente tratado a 60°C por 30min, em seguida foi filtrado através de uma membrana de 0,2 µm e estocado a 4°C, do peptídeo de interesse foi obtido por gel filtração (GRECO *et al.*, 2009).

Para detecção dos íons K⁺, Ca²⁺ e Na⁺ na hemolinfa é empregada a técnica de fotometria de chama, e para detectar Cl⁻ é realizado uma titulação com nitrato de prata (JALAL *et al.*, 2010). Em aranhas e escorpiões, as concentrações de íons, principalmente Mg²⁺, Na⁺, Ca²⁺, K⁺ e Cl⁻, são distintas e espécie dependente, acarretando alterações na osmolaridade e pH dessas hemolinfas (JALAL *et al.*, 2010).

5-3. Componentes Celulares da Hemolinfa

As células presentes na hemolinfa são denominadas de hemócitos, os quais são nucleados e possuem quatro funções básicas: fagocitose, coagulação da hemolinfa, armazenamento e distribuição de nutrientes (LAN e CRANSTON, 2008). Há três tipos comuns de hemócitos que a maioria dos invertebrados apresenta: pró-hemócitos, plasmatócitos e os granulócitos (figura 2) (LAVINE e STRAND, 2002; FUKUZAWA, 2007). Os pró-hemócitos são as menores células dos artrópodes, com núcleo central e contendo pouca quantidade de citoplasma que é fortemente eosinófilo com finas granulações (Figura 2- A e B). Os plasmatócitos são células polimórficas, de tamanho variável, com citoplasma basófilo onde pode haver granulações ou vacúolos, de núcleo oval fortemente eosinófilo (Figura 2- C, D, E e F) . E os granulócitos são células arredondadas com núcleo eosinófilo de tamanho variável e central, contem citoplasma acidófilo e com granulações (Figura 2- G, H, I e J) (CARNEIRO e DAEMON, 1996).

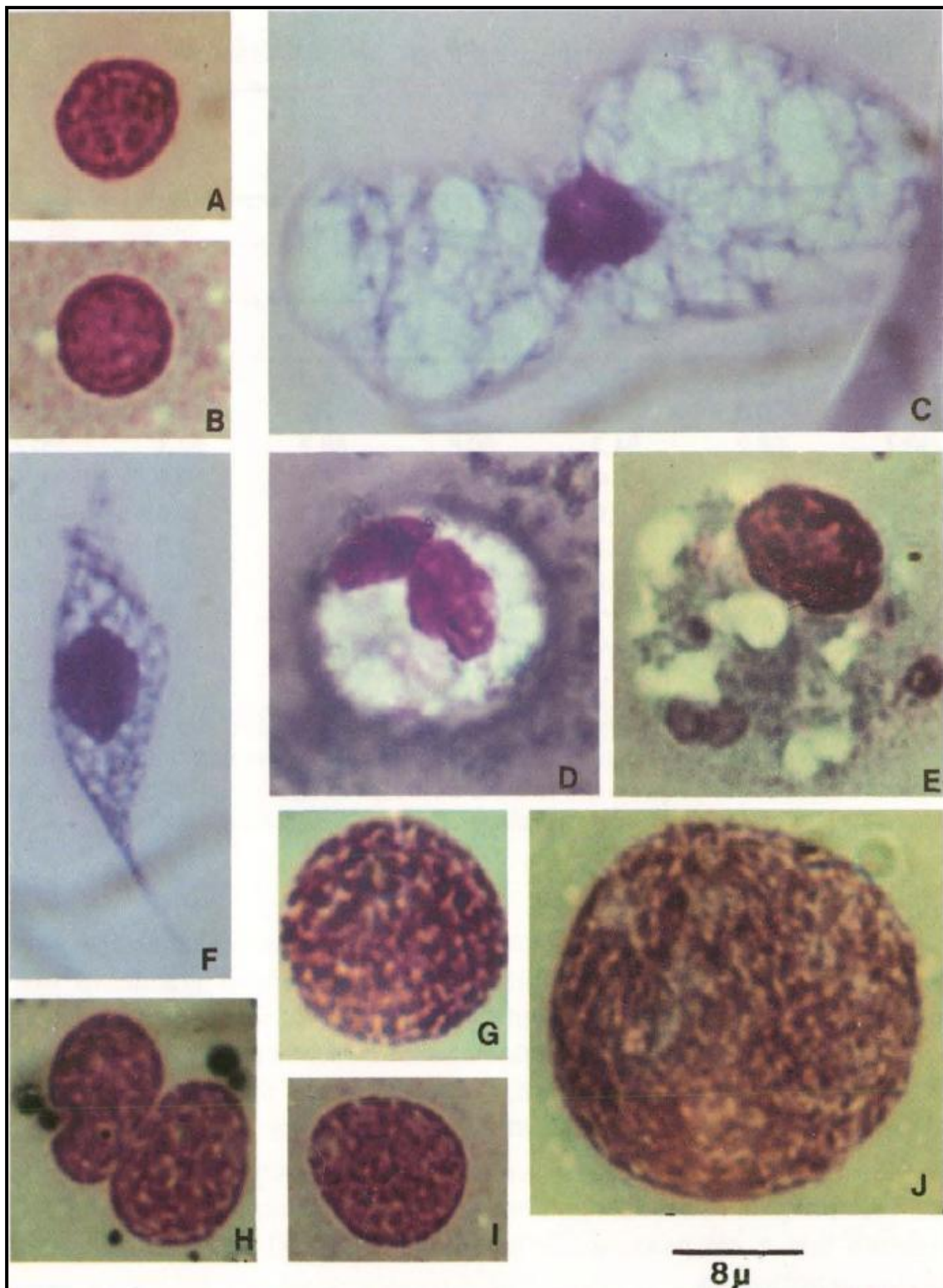


Figura 2- Tipos celulares presentes na hemolinfa de *Rhipicephalus sanguineus* (Familia:Ixodoidea, Classe: Arachnida). A, B: pro-hemócito; C, D, E, F: plasmatócito; G, H, I, J: granulócito. Os hemócitos foram fixados em metanol por três minutos e corado por Giemsa por 30 minutos. Adaptado de CARNEIRO e DAEMON (1996).

O papel principal dos hemócitos nos artrópodes na defesa imune é reconhecer os microorganismos invasores, realizar a fagocitose, citotoxicidade

e promover melanização, encapsulação e nodulação, que são processos da defesa imune inata onde o microorganismo invasor é isolado por proteínas de melanina de coagulação (melanização) ou por camadas de hemócitos que se fixam aos tecidos sendo encapsulados formando os nódulos (encapsulação e nodulação) (GILLESPIE e KANOST, 1997). Diferentemente do que ocorre nos vertebrados, onde os eritrócitos são responsáveis principalmente pelo transporte de oxigênio (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

É descrito que os hemócitos do tipo oenocitóides (figura 3) presentes em diversos artrópodes são células que possuem em seu citoplasma as proteínas pró-fenoloxidades, precursores de enzimas responsáveis pela melanização, isolamento do organismo invasor (LAVINE e STRAND, 2002).

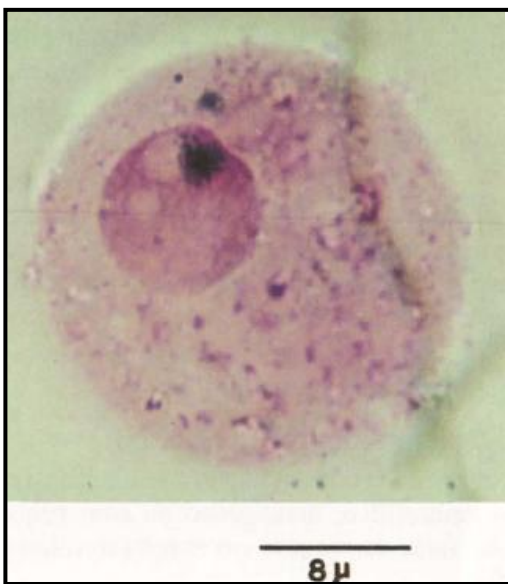


Figura 3- Oenocitóide da hemolinfa de *Rhipicephalus sanguineus* (Familia:Ixodoidea, Classe: Arachnida). Fixado em metanol por três minutos e corado por Giemsa por 30 minutos. Adaptado de CARNEIRO e DAEMON (1996).

Os hemócitos são constantemente produzidos, embora sua taxa de produção possa ser alterada de acordo com as influencias de diversos fatores ambientais (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

Os estudos sobre morfologia dos hemócitos são antigos, e como a tecnologia atual permite análises específicas de tais células, nos trabalhos recentes são utilizadas as metodologias de marcação específica (imunomarcações com observações em microscopia confocal), pois somente os dados de morfologia não fornecem informações suficientes sobre estas células. Como no caso de Fukuzawa e colaboradores (2008) que utilizam técnicas de imunofluorescência para observar a co-localização de dois peptídeos antimicrobianos em hemócitos. Além disso, atualmente a identificação de hemócitos pode ser realizada por meio da utilização de

anticorpos específicos, isto foi possível com o desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas (LAVINE e STRAND, 2002).

Os hemócitos de aracnídeos podem ter as mais diversas origens, dependendo da espécie do animal, alguns se encontram indiferenciados na hemocele, outros são originados de células que se desprendem do coração e alguns tem origem em órgãos linfóides e na glândula neural (FUKUZAWA, 2007). Estudos de Lavine e Strand (2002) afirmam que os hemócitos são originados durante a embriogênese, provenientes da mesoderme do dorso ou da cabeça do inseto. O pico da produção de hemócitos ocorre durante a fase larval e de ninfa em insetos, após esses períodos a produção de novos hemócitos se dá pela divisão de células hematopoiéticas da mesoderme ou dos hemócitos da circulação (LAVINE e STRAND, 2002).

Os artrópodes apresentam ainda os nefrócitos que são células localizadas na hemocele e atuam como glândulas sem ducto que filtram a hemolinfa, retirando certas substâncias e metabolizando-as para excreção. E os enócitos que podem estar na hemocele, no corpo gorduroso (reserva lipídica) ou na epiderme, aparentemente apresentam função de síntese de lipídios (hidrocarbonetos), embora isto ainda não tenha sido totalmente esclarecido (GULLAN e CRANSTON, 2008).

5-4. Composição proteica da hemolinfa

Existem poucos estudos a respeito da composição proteica de hemolinfas de artrópodes, a maioria dos trabalhos estuda proteínas específicas e não realiza uma caracterização ampla do conteúdo proteico (TRABALON *et al.*, 2010).

A análise do perfil proteico de hemolinfa de tarântulas, espécie *Lactrodectus tredecimguttatus*, mostra que existem proteínas de 8kDa a 300 kDa. Portanto, a hemolinfa destas aranhas é composta tanto de proteínas com baixa massa molecular quanto com alta massa molecular (Figura 4), característica similar ao perfil proteico observado nos seus venenos (JALAL *et al.*, 2010).

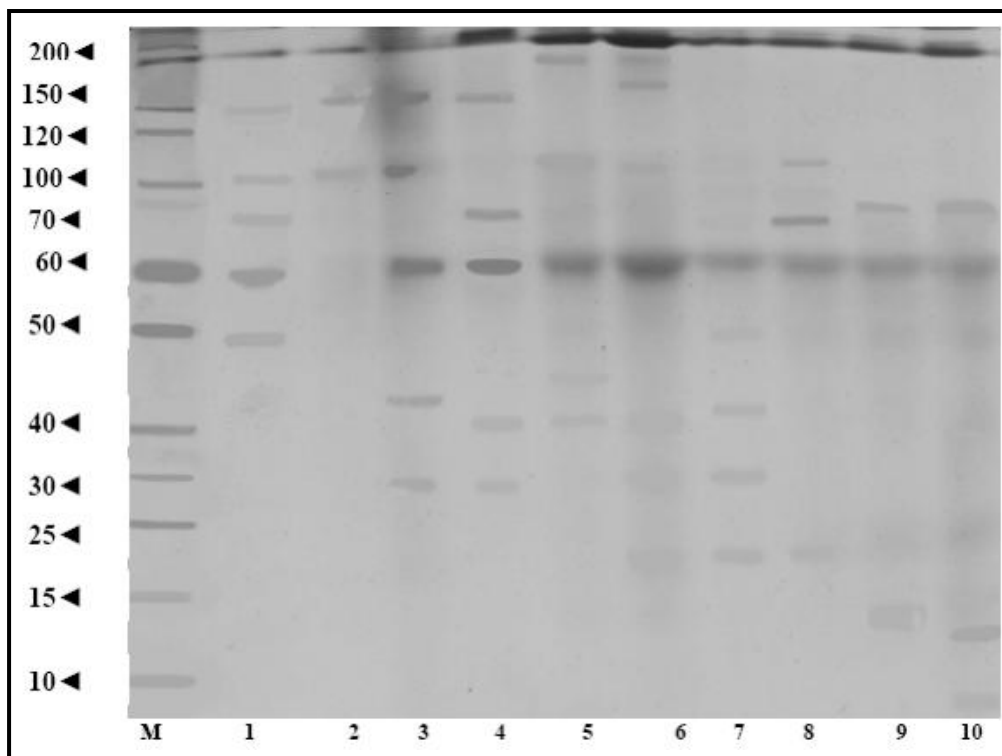


Figura 4- Perfil proteico da hemolina de diversas espécies de aranhas (SDS-PAGE 10%). M= Marcador de massa molecular (kDa), 1= *Thyne imperialis* 2= *Pelegrina verecunda*, 3= *Stegodyphus sarasinorum*, 4= *Phidipus workmani*, 5= *Cheiracanthium mildei* 6= *Phintella castriesiana*, 7= *Plexippus Paykulli*, 8= *Phentella sp.*, 9= *Elaver sp.*, 10= *Heteropoda kandiana*. Adaptado de JALAL *et al.*, 2010.

A composição protéica da hemolinfa inclui proteínas que atuam em diferentes funções fisiológicas: na armazenagem (hexamerinas), no transporte de lipídios (lipoforinas ou lipoproteínas), no transporte de oxigênio (hemocianinas), em complexos com ferro (ferritinas) e hormônios de modo geral (CHAN *et al.*, 2006; GULLAN e CRANSTON, 2008; TRABALON *et al.*, 2010). Estudos que quantificaram proteínas totais da hemolinfa de aranhas mostram uma grande variabilidade nesse parâmetro. Em hemolinfa de aranhas da espécie *Theraphosa blondi* foi descrito 0.8 a 6.5 g/dl de proteínas totais e para a espécie *Grammostola rosea* foi descrito 3.2 a 7.3 g/dl de proteínas totais (ZACHARIAH *et al.*, 2007). Embora essas espécies sejam da mesma família (Theraphosidae) possuem quantidades de proteínas totais em suas hemolinfas bem diferentes. Isso pode ser explicado devido a diferenças de idade, de época de acasalamento, ou ainda, hidratação dos animais utilizados no estudo (ZACHARIAH *et al.*, 2007). Por outro lado, quando foram comparadas a concentração proteica total da hemolinfa de indivíduos da mesma espécie, mesmo sexo, mas de idade distintas (jovens e adultos) não foram observadas diferenças significativas. Trabalon e colaboradores (2010) observaram isso em aranhas fêmeas da espécie *Brachypelma albopilosa* mostrando que a

concentração proteica entre aranhas fêmeas juvenis varia de 54,9 - 65 g/L e em adultas de 61,6 - 74,8 g/L.

Há diferenças na quantidade total de proteínas, nos níveis hierárquicos de insetos sociais. Nas abelhas, a hemolinfa de larvas e adultos de abelhas trabalhadoras contém quantidade de hexamerinas maior do que a observada na abelha rainha. Por outro lado, a vitelogenina, que é uma proteína de armazenamento de lipídios, de proteínas e pelo transporte de nutrientes em fêmeas, é abundante na rainha e insignificante no zangão (CHAN *et al.*, 2006).

As proteínas mais abundantes na hemolinfa dos artrópodes são as hemocianinas, proteínas transportadoras de oxigênio. Até o presente momento não foram identificadas hemocianinas dentro de células, estas ocorrem como grandes moléculas extracelulares (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006). Em artrópodes, 80-86% das proteínas totais da hemolinfa são hemocianinas (RUPPERT e BARNES, 1996). Estudos de hemolinfa de duas espécies de aranhas migalomorfas (*Eurypelma californicum* e *E. helluo*) mostraram que as hemocianinas representam 80-82% das proteínas totais, já para duas espécies de aranhas araneomorfas (*Nephila inaurata* e *Cupiennus salei*) elas podem variar de 70-95% dentre todas as proteínas que compõem a hemolinfa (TRABALON *et al.*, 2010).

A hemocianina de artrópodes possui subunidades proteicas com massa molecular de 70-75 kDa por cadeia polipeptídica, as quais são organizadas em hexâmeros, podendo estar estruturadas em hexâmeros simples (1 x 6mers) ou múltiplos (2x6mers, 4x6mers, 6x6mers e 8x6mers) (Figura 5) (CERENIUS e SODERHALL, 2004; DECKER *et al.*, 2007; JALAL *et al.*, 2010). Já foram identificadas cadeias de hemocianinas com maior massa molecular (100 kDa, 110-140kDa e 200-210 kDa) e com menor (30-60kDa e 35-65 kDa). Os autores sugerem que essa identificação de cadeias de hemocianinas com massas moleculares menores ou maiores do que 70-75 kDa possa refletir modificações pós-traducionais, modificações químicas e/ou proteólise. Outra hipótese, é que possam ser dímeros (110-140 kDa) e trímeros (200-210 kDa), os quais não foram desfeitos por falha nas reações de redução antecedentes à corrida eletroforética. Há descrição de cadeias de hemocianina que permanecem unidas mesmo após tratamentos com agentes redutores e detergentes como o dodecil sulfato de sódio (SDS) (TRABALON *et al.*, 2010). Nesse mesmo trabalho, após a separação proteica da hemolinfa de aranhas *Brachypelma*

albopilosa, realizada em SDS-PAGE unidimensional, foram identificadas 22 bandas. O mesmo material quando analisado em gel bidimensional permitiu a identificação de 10 spots distintos. O sequenciamento dessas proteínas revelou sete subunidades distintas de hemocianina (cadeias a, b, c, d, e, f e g) e actina (TRABALON *et al.*, 2010). A grande quantidade de hemocianina identificada nessa espécie de aranha é comum para os demais artrópodes, corroborando que a hemocianina é o componente proteico mais abundante em hemolinhas (TRABALON *et al.*, 2010; DECKER *et al.*, 2007, RUPPERT *et al.*, 2005). Já a identificação de actina como componente de hemolinha foi descrita somente em *Drosophila melanogaster*. Sugere-se que a actina possa ser um contaminante, devido à lise de células durante a coleta do material, mas não se pode excluir uma possível secreção fisiológica dessa molécula. As funções fisiológicas de actina circulante ainda não são caracterizadas, mas acredita-se que poderia estar envolvida na resposta imune e/ou nos eventos de coagulação interagindo com componentes da cascata de coagulação (TRABALON *et al.*, 2010).

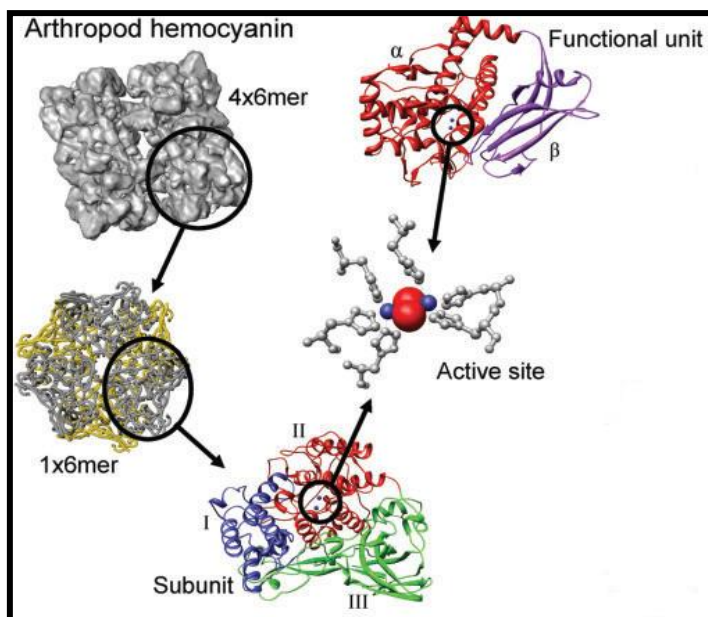


Figura 5- Estrutura tridimensional de hemocianina de artrópodes. Note apenas um sítio ativo e uma unidade funcional. Adaptado de Decker *et al.*, 2007.

Diferentes trabalhos que estudam as hemocianinas de artrópodes apontam para participação desta proteína em diferentes eventos fisiológicos dos animais. Cunningham e Pollero (1996) ao analisar o plasma de *Polybetes pythagoricus* afirmam que a hemocianina é um pigmento respiratório, e que está envolvida também no transporte de lipídeos. Os autores identificaram hemocianina em complexos de HDL (High-Density Lipoprotein - lipoproteína de alta densidade) e de LDL (Low-Density Lipoprotein- lipoproteína de baixa

densidade). Portanto, esse pigmento respiratório pode carregar uma quantidade significativa de lipídios no plasma da hemolinfa dessa aranha. Outros trabalhos mostram que a hemocianina do plasma de artrópodes quelicerados (aranhas e escorpiões) pode exibir atividade de fenoloxidase e catalisar a síntese de melanina. Isso porque, em quelicerados, falta uma fenoloxidase específica que catalisa a oxidação de fenóis a quinonas, constituindo o primeiro passo para a produção da melanina, que é importante para os artrópodes, pois exerce participação no processo de melanização na defesa inata (DECKER *et al.*, 2007; CERENIUS e SODERHALL, 2004; FUKUZAWA, 2007). Um estudo recente mostrou que a hemocianina também pode ser utilizada como um componente estrutural na construção da cutícula, especialmente na tarântula *Eurypelma californicum* (TRABALON *et al.*, 2010). Estudos de composição bioquímica com a hemolinfa de escorpiões relatam que a hemocianina é funcionalmente semelhante às hemoglobinas e é uma das proteínas mais complexas e sofisticadas dos artrópodes (MOUSLI *et al.*, 1998).

Os requisitos estruturais necessários para as hemocianinas atuarem eficientemente no transporte de oxigênio e metabolizando componentes fenólicos ainda estão sob investigação (CERENIUS e SODERHALL, 2004). As hemocianinas podem participar na ativação da pró-fenoloxidase, que após clivagem por tripsina e quimiotripsina, desencadeia o processo de melanização (CERENIUS e SODERHALL, 2004; DECKER *et al.*, 2007; FUKUZAWA, 2007).

A composição de aminoácidos livres em hemolinfas de aranhas é pouco estudada, mas é descrito que a glutamina é o aminoácido mais abundante, sendo outros aminoácidos, como a glicina, taurina, prolina, histidina e alanina bastante comuns (TILINGHAST e TOWNLEY, 2008).

Maranga *et al.*, (2003) realizou suplementação de células Sf-9 (células de *Spodoptera frugiperda*) com hemolinfa de *Lonomia obliqua* e mostrou que a hemolinfa desse artrópode é um elemento que dá longevidade e promove crescimento das células Sf-9. Sendo assim, Souza e colaboradores (2005) identificou elementos anti-apoptóticos na hemolinfa de *Lonomia obliqua* e purificou a fração proteica que é responsável pelo efeito através de cromatografia de gel filtração.

5-5. Lipoproteínas e composição lipídica da hemolinfa

O corpo gorduroso dos insetos armazena e metaboliza lipídios de vital importância para esses artrópodes, os quais suprem necessidades metabólicas, tais como metamorfose, manutenção das membranas, energia para sistemas fisiológicos e reprodução. Em aracnídeos não existem uma estrutura análoga ao corpo gorduroso dos insetos. Porém, baseando-se em evidências histológicas e ultraestruturais acredita-se que um local especializado do intestino seja o órgão responsável por armazenar e metabolizar lipídeos nos aracnídeos. Há pouca informação e pouco se sabe sobre a química da hemolinfa dos aracnídeos do ponto de vista lipídico (LAINO *et al.*, 2009; TRABALON, 2011).

Em artrópodes os lipídios não circulam livremente pela hemolinfa, pois apresentam caráter hidrofóbico, sendo assim, associam-se essencialmente a proteínas hidrossolúveis conhecidas como lipoforinas (lipoproteínas), onde os lipídeos são carregados principalmente na forma de diacilglicerol (CUNNINGHAM *et al.*, 2000; LAINO *et al.*, 2009). Cunningham e Pollero (1996) encontraram associados às proteínas na hemolinfa das aranhas da espécie *Polybetes pythagoricus* lipídios de diversas classes. Foi encontrado fosfolipídios, como a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina em maior proporção, em quantidade um pouco menor os ácidos graxos livres e triacilgliceróis e com pouca ocorrência na hemolinfa diacilgliceróis e colesterol. Sendo que, os fosfolipídeos representam mais da metade do conteúdo lipídico do plasma, com predominância da fosfatidilcolina. Para a espécie *P. pythagoricus*, a lipoproteína de densidade muito alta (VHDL) é responsável pelo transporte de 47% do total de lipídeos do plasma enquanto a fração de lipoproteína de alta densidade é responsável pelo transporte de somente 23%.

Cunnighan e colaboradores (2007) fizeram uma revisão de literatura comparando as características de lipoproteínas em três espécies de aranhas: *Eurypelma californicum*, *Polybetes pythagoricus* e *Latrodectus mirabilis*. Resultando nas seguintes observações: *P. pythagoricus* e *L. mirabilis* contém HDL que variam em massa total e composição lipídica, além disso, viram que *P. pythagoricus* e *E. californicum* possuem na hemolinfa uma lipoproteína VHDL. Concluíram então, que a composição das lipoproteínas e a composição

lipídica pode variar de acordo com a espécie da aranha, embora estejam inclusas na mesma classe. Outro ponto interessante é que Cunnighan e colaboradores (2007) relatam a possibilidade da hemocianina além de ser um pigmento respiratório, poder ter uma função de apolipoproteína, baseando-se nas características da própria molécula e sua afinidade com fosfolipídios.

Outro trabalho que aborda o assunto de lipoproteínas é de Shenk e colaboradores (2009), onde conseguem purificar e caracterizar uma lipoproteína da hemolinfa de escorpião *Pandinus imperator*. As lipoproteínas foram separadas submetendo a hemolinfa a um gradiente de densidade e em seguida passou por uma ultracentrifugação durante 3 horas à 417.000 g, e 4º C. A lipoproteína identificada é uma HDL com diâmetro de aproximadamente 15 nm. A massa molecular foi identificada em 500 kDa e o teor lipídico obteve 70% de lipídios neutros e 30% de fosfolipídios, dentre estes foi identificado fosfatidilserina, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. E a análise de carboidratos sugere a presença de apenas um sítio de N-glicosilação alta manose.

E Tralalon e colaboradores (2011) ao avaliar o proteoma combinado a análises de espectrometria de massa de hemolinfa da aranha *Brachypelma albopilosa*, afirma ter hemocianina com sete subunidades diferentes e possíveis modificações pós-traducionais. Além disso, identificou lipoproteínas dos tipos HDL e VHDL em quantidade diferentes em sub-adultos e adultos, supondo que a fase de ecdise pode realmente alterar na composição da hemolinfa.

5-6. Moléculas antimicrobianas

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) presentes na hemolinfa de artrópodes são foco de muitos estudos. Muitas moléculas com atividades contra os mais diversos tipos de microorganismos já foram identificadas. Isto porque, os artrópodes são encontrados principalmente no ambiente terrestre e possivelmente entram em contato com as mais diversificadas formas de bactérias, fungos, protozoários e vírus. Uma grande diversidade de moléculas foi adquirida evolutivamente para combater a infecção ou infestação dos vários microorganismos existentes (FUKUZAWA *et al.*, 2008; YİĞİT e BENLİ, 2008).

Os SCAMPs (Small Cationic Antimicrobial Peptides) ou AMPs são peptídeos encontrados na hemolinfa de diversos artrópodes. A primeira identificação de peptídeos com ação antimicrobiana foi realizada em *Hyalophora cecropia* (borboleta), porém; já foram encontradas sequências similares deste peptídeo em veneno de escorpião (ZHU e TYTGAT, 2004).

O principal mecanismo de ação dos AMPs é o aumento da permeabilidade da membrana plasmática do microorganismo. Esses peptídeos carregam uma carga positiva que é atraída por componentes negativos membrana plasmática do invasor. A interação entre estas moléculas causa formação de poros na membrana e leva à destruição do agressor (KUHN-NENTWIG, 2003; SILVA JUNIOR, 2000).

Peptídeos antimicrobianos isolados da hemolinfa de artrópodes venenosos possuem estruturas primárias bastante diferentes dos peptídeos citolíticos identificados em seus venenos (KUHN-NENTWIG, 2003). Entretanto, é comum a todos esses peptídeos apresentarem estrutura anfipática e desorganizarem a estrutura das membranas biológicas. Em hemolinfas, os peptídeos são encontrados em concentrações de poucos micromolares e, em venenos, em altas concentrações. Quanto à estrutura, os AMPs podem pertencer a quatro famílias: α -hélices, peptídeos lineares sem cisteínas, ricos em prolina e glicina, ricos em cisteína e os cíclicos, como é o caso das defensinas de insetos. Porém, os AMPs encontrados em hemolinfa de artrópodes venenosos são representantes de apenas três dessas famílias: peptídeos ricos em cisteínas, ricos em prolina e ricos em glicina (KUHN-NENTWIG, 2003).

A grande variedade de AMPs e de peptídeos citolíticos encontrados na hemolinfa e no veneno dos artrópodes conferem proteção imunológica ao animal. Os componentes destas secreções muitas vezes atuam de forma sinérgica, tornando o veneno ainda mais potente. Um exemplo é o veneno da abelha *Apis mellifera*, que possui o peptídeo meliina, molécula citolítica que facilita a atividade das fosfolipases A2 presentes no veneno desta espécie (KUHN-NENTWIG, 2003).

A maioria dos estudos relacionados à hemolinfa, especificamente em insetos e aracnídeos, abrange principalmente o tema dos AMPs, hemolinfa e lectinas. Essas moléculas fazem parte da imunidade inata e possuem um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. Em

alguns quelicerados, os AMPS ficam armazenados principalmente em grânulos no interior dos hemócitos e são liberados por exocitose após a detecção de entrada de algum microorganismo. Em insetos, além do armazenamento em hemócitos, a transcrição de peptídeos distintos pode ser estimulada dependendo do caráter imonugênico do microorganismo invasor e, então, secretados na hemolinfa em questão de horas (GRASSO, 1976; ZHU *et al.*, 2000; SZOLAJSKA *et al.*, 2004; FUKUZAWA *et al.*, 2008; SILVA JUNIOR, 2000; YİĞİT e BENLİ, 2008; KUHN-NENTWIG, 2003). A expressão constitutiva dos AMPS é encontrada não só em hemócitos, mas também nas glândulas salivares e no intestino médio (KUHN-NENTWIG, 2003).

Em 2003, cerca de trinta peptídeos isolados da hemolinfa de artrópodes venenosos já tinham sido descritos (KUHN-NENTWIG, 2003). Esses peptídeos podem desempenhar as mais diversas atividades biológicas nos artrópodes, não possuem somente atividades antimicrobianas. Podem atuar também como neurotransmissores, toxinas e hormônios. Além disso, os AMPs são moléculas que tem um amplo espectro de interação com fosfolipídios de membranas plasmáticas, com organelas membranosas e proteínas citosólicas, mediando as mais diversas vias de sinalização (SAIDEMBERG *et al.*, 2011).

A espécie de aranha *Acanthoscurria gomesiana* possui dois peptídeos antimicrobianos, denominados gomesina e acanthoscurrina, com ação comprovada no combate a *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* e fungos filamentosos. Outros dois peptídeos, denominados mygalomorphina e theraphosinina, foram descritos, mas ainda não foram testados (SILVA JUNIOR, 2000; FUKUZAWA, 2007). Yiğit e Benli (2008) afirmam que há AMPs na hemolinfa de *Agelena labyrinthica* (Araneae: Agelenidae) que é uma aranha venenosa encontrada na Turquia e esses peptídeos são efetivos no combate de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Greco e colaboradores (2009) avaliaram na hemolinfa de *Lonomia obliqua* a presença de uma molécula com atividade antiviral. Perceberam que havia vários autores pesquisando a existência e funcionalidade destes antivirais na hemolinfa de diversos insetos não venenosos. Por exemplo, na lagarta do tabaco (*Heliothis virescens*) foi encontrada uma molécula com atividade antiviral sobre vírus de vertebrados, como o vírus do Herpes tipo 1 e 2 (GRECO *et al.*, 2009). A hemolinfa da *L. obliqua* foi avaliada quanto a

atividade antiviral, analisando a viabilidade celular de células VERO e MDCK infectadas com vírus da influenza (H1N1), Polio (Sabin 1) e Sarampo (Edmonston). Observou-se que os grupos tratados com hemolinfa apresentaram maior taxa de viabilidade celular do que o grupo controle. Estas observações sugerem um mecanismo intracelular de ação e que a proteína antiviral pode atuar como um agente constitutivo que afeta a resposta imune inata (GRECO *et al.*, 2009).

Recentemente, diversos peptídeos com ação antimicrobiana originários de veneno e hemolinfa de artrópodes venenosos, como escorpiões e aranhas, foram isolados. Como exemplo, o gomesin, que foi o primeiro peptídeo antimicrobiano isolado de células da hemolinfa de aranhas (YİĞİT e BENLİ, 2008).

Os estudos com hemolinfa dos mais diversos artrópodes realizados até o presente momento demonstram e evidenciam a importância de se compreender e pesquisar esse material. A hemolinfa desses animais apresenta muitas moléculas com alto potencial para aplicações biotecnológicas.

5-7. Resposta imunológica

A imunidade inata é uma linha de defesa muito importante para os artrópodes, e sua ativação tem como consequência principal a produção induzida de peptídeos. A produção de peptídeos de forma constitutiva pelo hemócitos também ocorre (ZHU e TYTGAT, 2004). Os insetos não possuem a complexidade do sistema imune adaptativo, mas a resposta imune inata é diversificada com defesas eficazes, constituídas pela produção de peptídeos antimicrobianos, fagocitose, coagulação e opsonização (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006). Tal resposta pode ser dividida em duas linhas: a humoral e a celular. A resposta humoral é baseada na secreção de AMPs, reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, e pelos complexos enzimáticos que regulam as cascatas de coagulação e melanização da hemolinfa. Já a resposta celular está baseada no envolvimento dos diferentes tipos de hemócitos no combate ao patógeno, relacionados à fagocitose, formação de nódulos e o encapsulamento, e as reações citotóxicas que são ativadas (LAVINE e STRAND, 2002; IWANAGA e LEE, 2005; JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

A figura 6 mostra como ocorre o sistema de defesa inato dos artrópodes, após uma infecção na hemocele (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

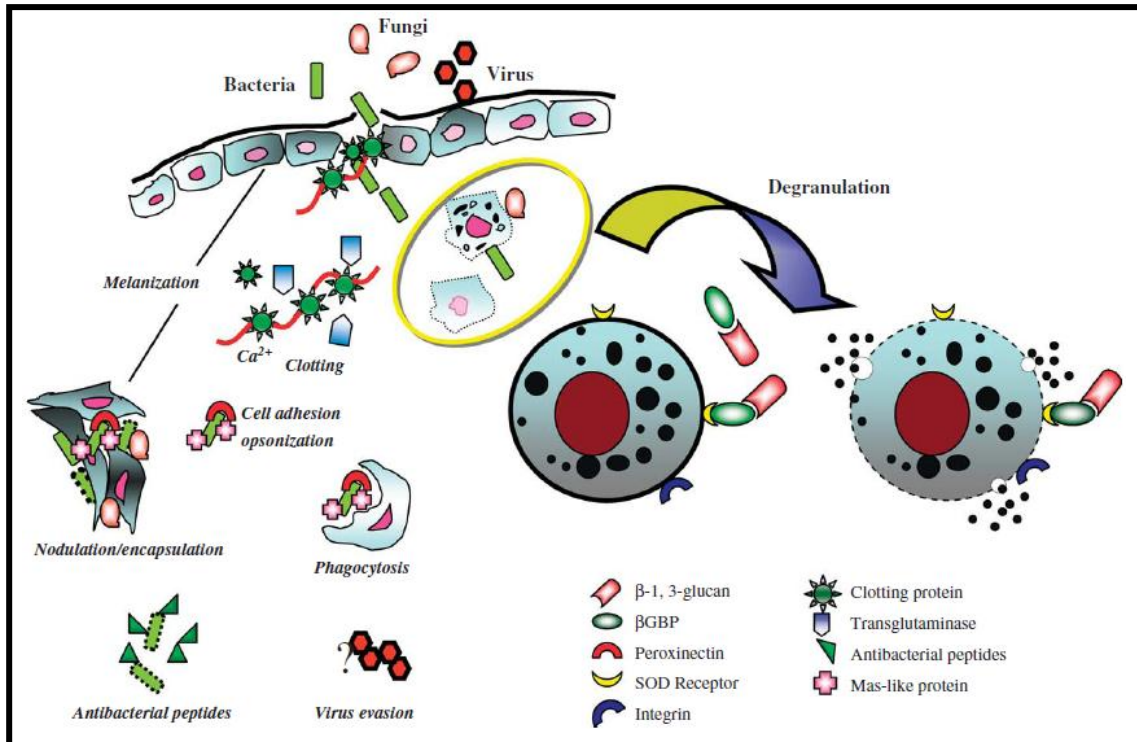


Figura 6- Mecanismo de defesa inata dos artrópodes. Adaptado de JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006.

Peroxinectina tem como função a adesão dos hemócitos aos patógenos e fica armazenada em vesículas nos hemócitos, as quais são liberadas quando há infecção por microorganismos. Esta proteína tem 75 kDa (mesma massa da hemocianina) e pode ser uma proteína indutora da degranulação dos hemócitos (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006). É muito comum ocorrer a melanização em invertebrados para o isolamento dos parasitas. Essa resposta é derivada da ativação da fenoloxidase (cataliza compostos fenólicos), enzima que é parte de um complexo sistema de proteases, proteínas de reconhecimento e inibidores de proteases. Estas moléculas constituem o conhecido sistema ativador de pró-fenoloxidase que é desencadeado por pequenas quantidades de lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e β -1, 3-glucanos, que são moléculas características da membrana de microorganismos (SILVA JUNIOR, 2000). Com a ativação da enzima fenoloxidase outras respostas imunes ocorrem, como a produção dos peptídeos antimicrobianos, citotóxicos, opsônicos ou promoção de atividades de encapsulamento (CERENIUS e SODERHALL, 2004).

A ativação da fenoloxidase é um processo muito bem regulado por uma série de eventos, sendo o inicial a clivagem da pro-fenoloxidase, por serino-proteases. Esta ativação das proteinases ocorre por elementos característicos da membrana de microorganismos, que ativam também elementos necessários para regulação do sistema. Porém, a cascata de serinoproteases, que são as principais enzimas do processo ainda não é muito bem conhecida (CERENIUS e SODERHALL, 2004). A figura 4 mostra de forma resumida como ocorre o processo de melanização em invertebrados, de Cerenius e Soderhall (2004).

A enzima pró-fenoloxidase é armazenada no citoplasma de seus hemocitos produtores, isso significa, que logo após a infecção por um microorganismo e o rompimento citoplasmático de apenas um hemócito, já é suficiente para a resposta inata ser desencadeada de forma imediata (CERENIUS e SODERHALL, 2004).

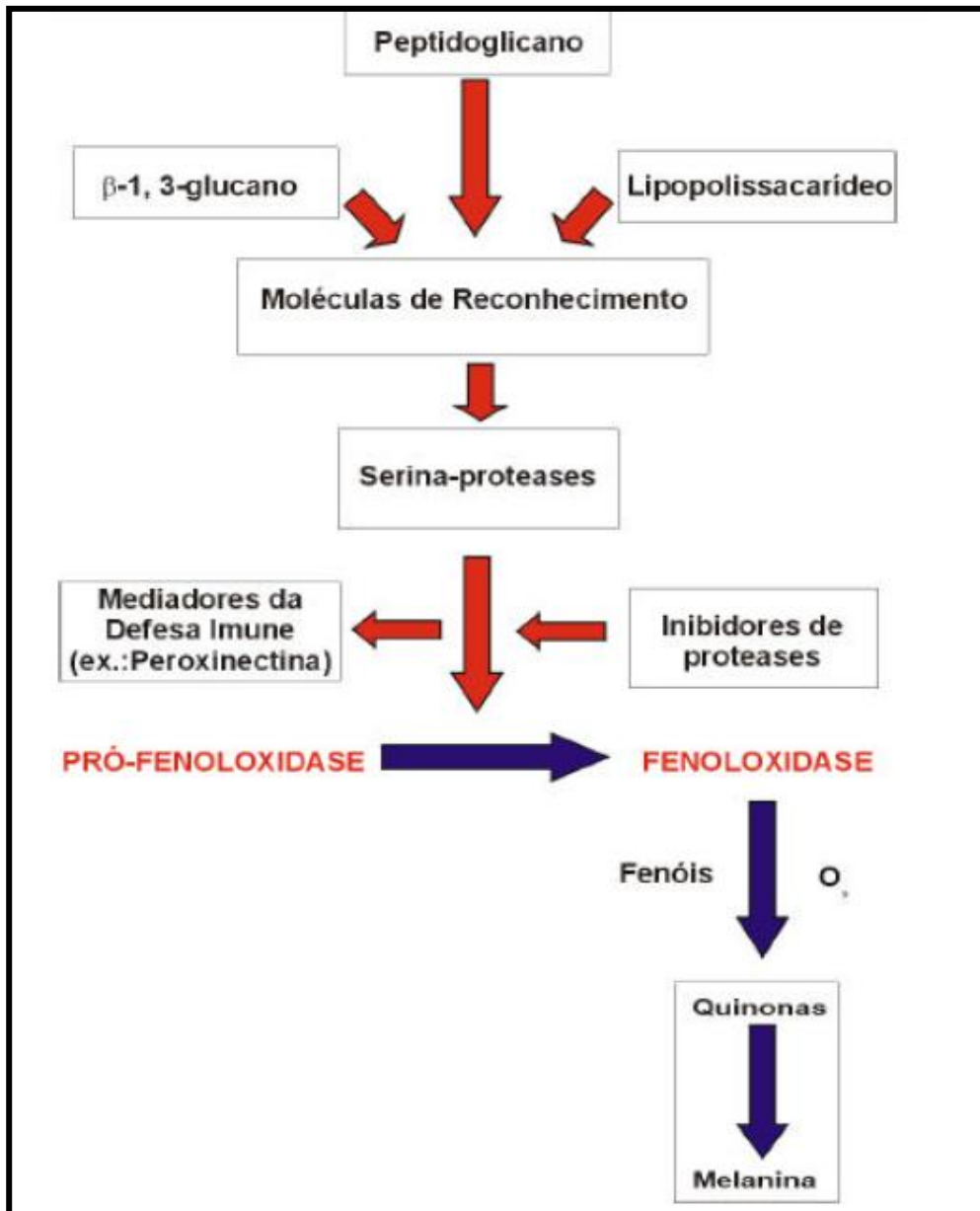


Figura 7- Processo de melanização em invertebrados. Adaptado de SILVA JUNIOR 2000.

A coagulação é um processo ativado por uma cascata de serino-proteases, semelhante àquela da pró-fenoloxidase, mas os componentes da reação de coagulação em insetos é muito pouco conhecido (SILVA JUNIOR, 2000).

6. CONCLUSÕES

A hemolinfa de artrópodes venenosos é composta por células, lipídeos, lipoproteínas e proteínas. Tais componentes participam de muitos processos fisiológicos importantes na resposta imune, como: melanização, opsonização e fagocitose.

O potencial biotecnológico da hemolinfa é grande e muitos estudos focam nos peptídeos antimicrobianos. Além disso, há um grande interesse em compreender os processos envolvidos com a resposta imune dos artrópodes, sendo assim, estão sendo produzidos vários artigos com esse enfoque.

A justificativa para o interesse na publicação de artigos com esses dois temas: peptídeos antimicrobianos e resposta imune, pode ser devido ao fato do Brasil ser um dos grandes produtores e exportadores de produtos vegetais. Portanto, gerar conhecimento com a perspectiva de produzir bioinseticidas dará subsídios para o desenvolvimento de produtos biodegradáveis e não tóxicos, o que resolve problemas que são comuns na agropecuária atualmente, como o uso de agrotóxicos, que além de ser prejudicial ao meio ambiente e ao consumo, necessitam de grande investimento tanto governamental quando do próprio produtor agrícola.

O estudo dos lipídios como componentes da hemolinfa é negligenciado, é sabido que os lipídios estão envolvidos em vários processos fisiológicos, principalmente no que se refere à sinalização, porém é uma área que está se expandindo e que necessita de mais estudos para compreensão dos componentes lipídicos e suas funções.

7. REFERENCIAS

AKHUNOV, A.A.; GOLUBENKO, Z.; ABDURASHIDOVA, N.A.; MUSTAKIMOVA, E.C.; IBRAGIMOV, F.A.; MACKESSY, S. Comparative biochemistry of the physiologically active components of venom, hemolymph, and eggs of the karakurt spider (*Latrodectus tredecimguttatus*). **Chemistry of Natural Compounds**. v. 37, n. 6, 2001.

AMORIM, A.M.; CARVALHO, F.M.; LIRA-DA-SILVA, R.M.; BRAZIL, T.K. Scorpion sting in an area of Nordeste de Amaralina, Salvador, Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, n.1, p. 51-56, 2003.

ANGELO, I.C.; GOLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; KLUCK, G.E.G.; FOLLY, E.; BITTENCOURT, V. R. E.P. Haemolymph Protein and Lipid Profile of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* Infected by Fungi. **Transboundary and Emerging Diseases**. v. 57, p. 79-83, 2010.

ARAÚJO, H.R.C. **Ultra-estrutura dos hemócitos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae)**. 2009. Dissertação apresentada ao Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências. p.86, 2009.

AROCHA-PIÑANGO, C.L.; MARVAL, E.; GUERRERO, B. *Lonomia* genus caterpillar toxins. **Biochemical aspects. Biochimie**. v.82, p.937-942, 2000.

BARTH, R. Estudo histológico sobre as glândulas de peçonhentas da “viúva-negra) *Latrodectus mactans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.60, n.2, p. 275- 292, 1962.

BAUMANN, T.; KUHN-NENTWIG, L.; SCHÜRCH, S.; LARGIADER, C.; SCHALLER, L.; NENTWIG, W. Antimicrobial peptides and other antimicrobially acting compounds in the hemolymph of the spider *Cupiennius salei*. In: **Congresso Brasileiro de Toxicologia**, Belo Horizonte-MG, p. 297, 2009.

CARREL, J.E. Water and hemolymph content in the wolf spider *Lycosa ceratiola* (Araneae, Lycosidae). **Journal Arachnology**. v.18, p.35- 40, 1990.

CHAN, Q.W.T.; HOWES, C.G.; FOSTER, L.J. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. **Molecular & Cellular Proteomics**. v. 5, p. 2252-2262, 2006.

CHAVES-MOREIRA D.; SOUZA, F.N.; FOGAÇA, R.T.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.112, n.9, p. 2529-2540, 2011.

CUNNINGHAM, M.; POLLERO, R.; GONZÁLEZ, A. Lipid circulation in spiders. transport of phospholipids, free acid and triacylglycerols as the major lipid classes by high- density lipoprotein fraction isolated from plasma of *Polybetes pythagoricus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.109B, n.2/3, p.333- 338, 1994.

CUNNINGHAM, M. e POLLERO, R. Characterization of Lipoprotein Fractions With High Content of Hemocyanin in the Hemolymphatic Plasma of *Polybetes pythagoricus*. **The Journal Of Experimental Zoology**. v.274, p.275-280, 1996.

CUNNINGHAM, M.; GONZÁLEZ, A; POLLERO, R. Characterization of Lipoproteins Isolated from the Hemolymph of the Spider *Latrodectus mirabilis* (Araneae, Theridiidae). **Journal of Arachnology**. v.28, n.1, p. 49-55, 2000.

CUPO,P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.H. Envenomation caused by poisonous animals: scorpions and spiders. **Simpósio: Urgências e Emergências Dermatológicas e Toxicológicas**, Capítulo V, Ribeirão Preto-SP. v.36, p. 490-497, 2003.

DANNHORN, D.R.; SEITZ, K.A. Hemocytes of *Leiobunum limbatum* and two other species of harvestmen (Arachida, Opiliones): Morphological, classification and functional aspects. **Journal of Morphology**. v. 193, p. 185-196, 1987.

DECKER, H.; HELLMANN, N.; JAENICKE, E.; LIEB, B.; MEISSNER, U. MARKL, J. Minireview: Recent progress in hemocyanin research. **Integrative and Comparative Biology**. v.47, n.4, p. 631–644, 2007.

DIAS, M.F.R.; BRAZIL, T.K. Comportamento e padrão alimentar de uma espécie de *Latrodectus mactans* (Araneae, Theridiidae) em cativeiro. **Revista Brasileira de Zoologia**. v.16, n.4, p. 991 - 996, 1999.

DONATO, J.L.; MORENO, R.A; HYSLOP, S.; ANTUNES, E.; LE BONNICE, B.F.; RENDU, F.; DE NUCCI, G. *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of factor X and prothrombin. **Thrombosis and haemostasis**. v.79, n.3, p.539-542, 1998.

EHRET-SABATIER, L.; LOEW, D.; GOYFFON, M.; FEHLBAUM, P.; HOFFMANN, J.A.; DORSSELAER, A.; BULET, P. Characterization of Novel Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Scorpion Blood. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 271, n. 47, p. 29537–29544, 1996.

FARLEY, R.D. The ultrastructure of hemocytoblastic organs in the desert scorpion, *Paruroctonus* sp. **Tissue Cell**. v. 16, n. 4, p.577-588, 1984.

FUKUZAWA, A.F. **Envolvimento dos hemócitos na resposta imune da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesina***. 2007. 87p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) pela Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP, 2007.

FUKUZAWA, A.H.; VELLUTINI, B.C.; LORENZINI, D.M.; JR SILVA, P.I.; MORTARA, R.A.; SILVA, J.M.C.; DAFFRE,S. The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Developmental and Comparative Immunology**. v. 32, p. 716-725, 2008.

GILBERT, S.F. RAUNIO, A.M. Embriology - **Constructing the organism**. Sinauer, Sunderland, 1997.

GILLESPIE J.P.; & KANOST M.R. Biological Mediators Of Insect Immunity. **Annual Review of Entomology**. v. 42, p. 611–43, 1997.

GRASSO, A. Preparation and properties of a neurotoxin purified from the venom of black widow spider (*Latrodectus mactans tredecimguttatus*). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure**. v.439, n. 2, p. 406-412, 1976.

GRECO, K.N.; MENDONÇA,R.M.Z.; MORAESA, R.H.P.; MANCINIB, D.A.P.; MENDONÇA, R.Z. Antiviral activity of the hemolymph of *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). **Antiviral Research**. v. 84, p. 84–90, 2009.

GREMSKI, L.H.; SILVEIRA, B.R.; CHAIM, O.M.; PROBST, M.C.; FERRER, V.P.; NOWATZKI,J. WEINSCHUTZ,H.C.; MADEIRA, H.M.; GREMSKI,W.; NADER,H.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular BioSystems**. v.6, n. 12, p. 2403–2416, 2010.

GULLAN, P.J. ; CRANSTON, P.S. **Os insetos, um resumo de entomologia**. Ed. Roca, São Paulo, 3° ed., 2008.

IWANAGA, S. & LEE, B.L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v.38, n.2, p. 128-150, 2005.

JAENICKE,E.; DECKER, H.; GEBAUER, W.; MARKL, W.R.; BURMESTER, T. Identification, Structure, and Properties of Hemocyanins from Diplopod Myriapoda. **The Journal Of Biological Chemistry**. v. 274, n. 41, ed. 8, pp. 29071–29074, 1999.

JALAL, F.; MUSHTAQ, S.; PARVEZ, S.; RANA, S.A.; SUHAIL, A. Partial characterization of hemolymph of different spider species of citrus orchards. **International Journal Of Agriculture & Biology**. v.12, p. 447–450, 2010.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, L.B.; SODERHALL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**. v.211, p.213–236, 2006.

KUHN-NENTWIG, L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.60, p. 2651-2668, 2003.

LAINO, A.; CUNNINGHAM, M. L.; GARCÍA, F.; HERAS, H. First insight into the lipid uptake, storage and mobilization in arachnids: Role of midgut diverticula and lipoproteins. **Journal of Insect Physiology**. v.55, p. 1118–1124, 2009.

LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.32, p.1295–1309, 2002.

MARANGA, L.; MENDONÇA, R. Z.; BENGALA, A.; PEIXOTO, C. C.; MORAES, R. H. P.; PEREIRA, C. A.; CARRONDO, M. J. T. Enhancement of Sf-9 cell growth and longevity through, supplementation of culture medium with hemolymph. **Biotechnology Progress**. v.19, p. 58-63, 2003.

MAYACK, C.; NAUG, D. Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. **Journal of Insect Physiology**. v.56, p.1572–1575, 2010.

MOUSLI, M.; GOYFFON, M.; BILLIALD, P. Production and characterization of a bivalent single chain Fv/alkaline phosphatase conjugate specific for the hemocyanin of the scorpion *Androctonus australis*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1425, p.348-360, 1998.

REED, S.M.; DO, M.T.; MASTA, S.E. Parallel factor analysis of spider fluorophores. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.93, p.149–154, 2008.

RIMOLDI, O.J.; SOULAGES, J.L.; GONZSILEZ, S.M.; PELUFFO, R.O.; BRENNER, R.R. Purification and properties of the very high density lipoprotein from the hemolymph of adult *Triatoma infestans*. **Journal of Lipid Research**. v.30, p. 857-864, 1989.

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. Ed. Roca, São Paulo, 6° ed., 1996.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados- Uma abordagem funcional evolutiva**. Ed. Roca, São Paulo, 7° ed., 2005.

SAIDEMBERGA, D.M.; BAPTISTA-SAIDEMBERGA, N.B.; PALMA, M.S. Chemometric analysis of Hymenoptera toxins and defensins: A model for predicting the biological activity of novel peptides from venoms and hemolymph. **Peptides**. v. 32, p. 1924–1933, 2011.

SAYEGH, R. S.R. **Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa de *Acutisoma longipes* (Gonyleptidae; Opiliones)**. 2011. Dissertação apresentada ao programa de Interunidades em Biotecnologia da USP, para obtenção de título de mestre em Biotecnologia. p. 153, 2011.

SHERMAN, R.G. Chelicerates. In: **Ratcliffe. Invertebrates blood cell: Arthropods to urochordates, invertebrates and vertebrates compared**. London. Academic Press, p. 355-383, 1981.

SILVA, P. H. ; SILVEIRA, R. B. ; APPEL, M. ; MANGILI, O. C. ; GREMSKI, W. ; VEIGA, S. S. . Brown spiders and Loxoscelism. **Toxicon**. v. 44, p. 693-709, 2004.

SILVA JUNIOR, P.I. **Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana***. 2000. p. 169. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) pela Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP, 2000.

SOUZA, A.P.B.; PEIXOTO, C.C.; MARANGA, L.; CARVALHAL, A.V.; MORAES, R.H.P.; MENDONÇA, R.M.Z.; PEREIRA, C.A; CARRONDO, M.J.T.; MENDONÇA, R.Z. Purification and characterization of an anti-apoptotic protein isolated from *Lonomia obliqua* hemolymph. **Biotechnology Progress**. v.21, p. 99-105, 2005.

SZOLAJSKA, E.; POZNANSKI, J.; FERBER, M.L.; MICHALIK, J.; GOUT, E.; FENDER, P.; BAILLY, I.; DUBLET, B.; CHROBOCZEK, J. Poneratoxin, a neurotoxin from ant venom. **European Journal of Biochemistry**. v. 217, p. 2127–2136, 2004.

TILLINGHAST, E.K.; TOWNLEY, M.A. Free amino acids in spider hemolymph. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. Part B 151, p. 286–295, 2008.

TRABALON, M.; CARAPITO, C.; VOINOT, F.; MARTRETTE, J.M.; DORSSELAER, A.V.; GILBERT, C.; BERTILE, F. Differences in *Brachypelma albopilosa* (Theraphosidae) hemolymph proteome between subadult and adult females. **The Journal of Experimental Zoology**. v.313A, p. 651–659, 2010

TRABALON, M. Agonistic interactions, cuticular and hemolymphatic lipid variations during the foraging period in spider females *Brachypelma albopilosa* (Theraphosidae). **Journal of Insect Physiology**. v. 57, n.6, p. 735-43, 2011.

VEIGA, A.B.G. **Caracterização molecular dos componentes do veneno de *Lonomia obliqua*: genes expressos e princípios ativos envolvidos nos distúrbios da coagulação e da fibrinólise.** 2005. 118p. Tese de doutorado (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2005.

VIEIRA, H. L. A.; PEREIRA, A.CP.; PEIXOTO, C.C.; MORAES, R.H.P.; ALVES, P.M.; MENDONÇA, R.Z. Improvement of recombinant protein production by an anti-apoptotic protein from hemolymph of *Lonomia obliqua*. **Cytotechnology**. v. 62, p. 547–555, 2010.

VILCINSKAS, A. & WEDDE, M. Insect Inhibitors of Metalloproteinases. **IUBMB Life**. v.54, p.339–343, 2002.

WEIHMANN, T.; KARNER, M.; FULL, R.J.; BLICKHAN, R. Jumping kinematics in the wandering spider *Cupiennius salei*. **Journal of Comparative Physiology A**. v.196, p.421–438, 2010.

YİĞİT, N. & BENLİ, M. The antibacterial activity of hemolymph of spider, *Agelena labyrinthica* (Araneae: Agelenidae). **Journal of Forestry Faculty**. v. 8, n. 2, p. 120-124, 2008.

ZACHARIAH, T.T.; MITCHELL, M.A.; GUICHARD, C.M.; SINGH, R.S. Hemolymph biochemistry reference ranges for wildcaught *Goliath birdeater* spiders (*Theraphosa blondi*) and *Chilean rose* spiders (*Grammostola rosea*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v.38, n.2, p.245–251, 2007.

ZACHARIAH, T.T.; MITCHELL, M.A. Vitamin D3 in the hemolymph of goliath birdeater spiders (*Theraphosa blondi*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v.40, n.2, p. 344-346, 2009.

ZANNIN, M; LOURENCO, D.M.; MOTTA, G.; DALLA COSTA, L.R.; GRANDO, M.; GAMBORGI, G.P.; NOGUTI, M.A.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. Blood coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in

Santa Catarina, Southern Brazil. **Thrombosis and haemostasis**. v. 89, n. 2, p. 355-364, 2003.

ZHU, S.; LI, W.; JIANG, D.; ZENG, X. Evidence for the Existence of Insect Defensin-Like Peptide in Scorpion Venom. **IUBMB Life**. v. 50, p. 57–61, 2000.

ZHU, S.; TYTGAT, J. The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.61, p. 1751–1763, 2004.