



Universidade de Brasília-UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Pós-graduação em Biologia Animal
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Laboratório de Espectrometria de Massa - LEM



**Prospecção de peptídeos antimicrobianos da
secreção cutânea de anfíbios do gênero
*Phyllomedusa***

Saulo Martins de Sá Mandel

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal como requisito
parcial para a obtenção do título
de mestre em Biologia Animal

Orientador: Osmino Rodrigues Pires Jr.

Brasília

2008



Universidade de Brasília - UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Pós-graduação em Biologia Animal

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Laboratório de Espectrometria de Massa - LEM



Prospecção de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*

Saulo Martins de Sá Mandel

Orientador: Osmino Rodrigues Pires Jr

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação
em Biologia Animal como
requisito parcial para a
obtenção do título de mestre
em Biologia Animal

Brasília
07/2008

À minha família, pilar da minha vida tanto no passado, presente e com certeza, no futuro.

Agradecimentos Gerais

À minha família mais uma vez, pelas noites em claro, pelas lágrimas aparadas, pelas brigas necessárias, pelo apoio acima de qualquer coisa e por mais um milhão de coisas sem as quais eu não estaria escrevendo esses agradecimentos e muito menos essa dissertação.

Ao Dr. Luciano Paulino da Silva, pela confiança, suporte, incentivo e pelas diversas conversas que muitas vezes me ajudaram a refletir e entender melhor essa etapa da minha vida.

Ao Dr. Osmindo Pires Rodrigues Pires Júnior, pelo crédito e disposição em fazer o melhor para tornar essa dissertação algo que fosse possível.

À Nathália, minha irmã de mestrado, pelos momentos de companhia, de apuros, pelas risadas e até mesmos puxões de orelha que sempre serão lembrados com muito carinho.

Ao Guilherme (Guil), amigo único, sempre disposto a escutar meus boletes e a dizer a verdade. Amigo, seus conselhos e companheirismo com certeza foram essenciais na minha formação tanto profissional como pessoal.

À Tati, que apesar das panis sempre estava disposta a ajudar e a me acompanhar nas mais diversas maratonas desses 2 anos.

À Dra. Maura Vianna (chefinha), por todos os momentos em que eu estava ficando louco e ela sempre tinha uma palavra amiga pra me acalmar. Por todos os chocolates e cafezinhos compartilhados e por toda experiência a mim passada.

Ao Dr. Marcelo Bemquerer (comandante), pelo apoio em várias fases desse trabalho e por sempre me lembrar de limpar a balança.

Ao Dr. Carlos Bloch Júnior, pelas várias conversas sinceras que sempre nos deixam com mais perguntas do que respostas.

À Bia, pelos cálculos intermináveis que só ela conseguia me explicar e pela irreverência e tranquilidade mesmo nas horas mais difíceis.

Aos amigos do LEM Karlinha, Jorge, Flávio (baiano), Lindomar (beautiful), Karlinha, Jorge, Sophia, Vlad, Zé, Renato (profeta), Carol, Mariana, Isabela, Yuri, Cíntia, Rebecca, Éder, Felipe, Gabriel, Ingrid e Daniel (sifu) pela ajuda profissional e pelos momentos de descontração.

Aos amigos da Cia de Dança Alex Gomes, Eduardo (duds), Vitor (otário), Esther, Débora (debs), Thaís, Daniela (dani caipirinha), Clédson, Juliana, Alessandra e Alex, que estiveram comigo durante esses 2 anos me apoiando e me proporcionando vários momentos divertidíssimos.

Aos amigos Xandoca, Japa, Guio, Guiga, Juliana (shishinha), Mirella e Batata. Amigos que apesar de nem sempre presentes, mas muito importantes desde a época que eu nem fazia idéia do que um biólogo fazia.

Aos amigos Duda, Roberto, Bia e Thaís (salsa), pelas inúmeras farras e conversas que muitas vezes me ajudaram a refletir melhor sobre minhas decisões.

Agradecimentos Instrucionais

Ào Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do qual fiz parte durante esse mestrado.

À EMBRAPA-CENARGEN pelas instalações utilizadas durante a realização desse projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa.

ÍNDICE

ÍNDICE GERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIações	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
TABELA DE AMINOácIDOS	vi
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRáFICA	6
1. Sistema de defesa química de anfíbios	7
2. Peptídeos antimicrobianos	9
2.1 <i>Peptídeos antimicrobianos da família Hylidae</i>	9
2.1.1 <i>Dermaseptinas</i>	10
2.1.2 <i>Filoseptinas</i>	13
2.1.3 <i>Dermatoxinas, Hiposinas, Plasticinas e Filoxinas</i>	14
3. Modo de ação de peptídeos antimicrobianos	16
JUSTIFICATIVA	21
OBJETIVOS	24
MATERIAL E MÉTODOS	26
1. Secreções da pele de anfíbios	27
2. Purificação de peptídeos	27
3. Seqüenciamento de novo	27
4. Degradação de EDMAN e seqüenciamento automático	28
5. Síntese de Peptídeos	28
6. Atividade Antimicrobiana	29
7. Atividade Hemolítica	30
RESULTADOS	31
1. Purificação dos peptídeos	32
2. Seqüenciamento de peptídeos e alinhamento	35
3. Prospecção de potenciais peptídeos antimicrobianos	48
4. Atividade biológica	50
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRáFICAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Modelo geral do precursor de peptídeos antimicrobianos de anfíbios.	8
FIGURA 2. Alinhamento de precursores de dermaseptinas.	11
FIGURA 3. Principais famílias de peptídeos antimicrobianos encontrados em phyllomedusídeos	15
FIGURA 4. Modelo de mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos.	19
FIGURA 5. Cromatogramas dos extratos totais.	32
FIGURA 6. Gráfico de caixa da distribuição de moléculas baseadas na razão m/z.	33
FIGURA 7. Gráfico de caixa da distribuição de moléculas de acordo com tempo de retenção.	34
FIGURA 8. Distribuição de íons detectados em relação ao tempo de retenção obtido em HPLC de fase reversa	34
FIGURA 9. Purificação da PSburm 08 (PS 08).	38
FIGURA 10. Seqüenciamento <i>de novo</i> da PSburm 08 (PS 08).	39
FIGURA 11. Purificação da PS 08 sintético.	40
FIGURA 12. Purificação da DStomo 01.	41
FIGURA 13. Seqüenciamento <i>de novo</i> da DStomo 01	42
FIGURA 14. Purificação da DSburm 10 (DD L).	43
FIGURA 15. Seqüenciamento <i>de novo</i> da DSburm 10 (DD L).	44
FIGURA 16. Espectros de MALDI TOF/MS e MALDI TOF MS/MS de análogos de dermaseptinas.	47
FIGURA 17. Comparação da quantidade de peptídeos depositados em banco de dados e peptídeos identificados no presente trabalho.	49
FIGURA 18. Bioensaios contra <i>X. citri</i> .	51
FIGURA 19. Bioensaios contra <i>E.coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> .	52

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Peptídeos cuja estrutura primária foi obtida a partir de degradação de Edman	37
TABELA 2. Peptídeo cuja estrutura primária foi obtida a partir de cDNA	37
TABELA 3. Análogos de dermaseptinas encontradas em <i>P. burmeisteri</i> , <i>P. rohdei</i> e <i>P. tomopterna</i> .	45
TABELA 4. Análogos de filoseptinas e dermatoxinas encontradas em <i>P. burmeisteri</i> , <i>P. rohdei</i> e <i>P. tomopterna</i> .	46
TABELA 5. Atividade antimicrobiana dos peptídeos testados.	53
TABELA 6. Atividade hemolítica da PS 08 e Hiposina 6.	53

ABREVIACOES

ACN: Acetonitrila

Da: Dalton

DD: Dermadistinctina

DS: Dermaseptina

DT: Dermatoxina

DMF: Dimetilformamida

ESI Q-TOF: Electrospray Ionization Quadrupole-Time of Flight

MIC: Concentração Mínima Inibitória

MALDI TOF/TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/Time of Flight

MALDI TOF/MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/Mass Spectrometry

RP-HPLC: Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography

PAM: Peptídeo Antimicrobiano

pI: Ponto Isoelétrico

PPSQ 23: Protein Peptide Sequencer (SHIMADZU)

PS: Filoseptina

TFA: Trifluoroacetic Acid/cido Trifluoroacético

RESUMO

A secreção cutânea de anfíbios é uma rica fonte de diversas moléculas bioativas. Um importante grupo de tais moléculas são os peptídeos antimicrobianos. Anuros da subfamília Phyllomedusinae (Hylidae-Amphibia) expressam diversos componentes pertencentes a este grupo. O presente estudo descreve a purificação e determinação da estrutura primária de vários análogos pertencentes às famílias de peptídeos antimicrobianos encontradas em anfíbios do gênero *Phyllomedusa*.

O extrato total dos anfíbios *Phyllomedusa burmeisteri*, *Phyllomedusa rohdei* e *Phyllomedusa tomopterna* mostrou-se uma complexa mistura de peptídeos. Dentre estes, 40 moléculas pertencentes (homologia) a quatro famílias de peptídeos antimicrobianos (dermaseptinas, filoseptinas, hiposinas e dermatoxinas) foram identificados e caracterizados quanto à sua estrutura primária. Os peptídeos foram purificados por meio de um sistema RP-HPLC, seqüenciados e analisados por meio de espectrometria de massa MALDI TOF/TOF e ESI Q-TOF. Degradação de Edman foi utilizada para confirmação da estrutura primária de três peptídeos (Filoseptina 08, DStomo01 e DD L). Adicionalmente, um análogo de hiposina, denominado hiposina 6, foi identificado.

PS 08 e hiposina 6 foram sintetizados e testados contra uma bactéria patogênica de plantas (*Xanthomonas citrii*) e contra bactérias patogênicas de humanos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*). Como comparação, duas dermaseptinas identificadas em *Phyllomedusa tarsius*, DRT 12 e DRT 15, foram purificadas e testadas contra *Xanthomonas citrii* e contra os patógenos humanos, respectivamente.

O presente trabalho contribui para o aumento do conhecimento da biodiversidade relativa a esse grupo de moléculas, adicionando um relevante número de novos análogos à miríade de peptídeos antimicrobianos já conhecidos na subfamília Phyllomedusinae.

ABSTRACT

Amphibian skin secretion is considered a rich source of bioactive molecules. One important group of such molecules is the antimicrobial peptides group. Frogs from the Phyllomedusinae subfamily (Hylidae-Amphibia) possess several components of this group. The present work describes the purification and primary structure determination of several analogs which belong to antimicrobial peptides families found in amphibians of the genus *Phyllomedusa* (Hylidae-Amphibia).

The crude extract obtained from the amphibians *Phyllomedusa burmeisteri*, *Phyllomedusa rohdei* and *Phyllomedusa tomopterna* was demonstrated to be a complex mixture of peptides. Among them, 40 molecules belonging to four families of antimicrobial peptides (dermaseptins, phylloseptins, hyposins and dermatoxins) were identified and their primary structures were obtained. The peptides were purified in a RP-HPLC system and sequenced and analyzed by MALDI TOF/TOF and ESI Q-TOF mass spectrometry. Three peptides had their primary structure confirmed by Edman degradation (Phylloseptin 08, DStomo01 and DD L). A hyposin analog, named hyposin 6, was also identified.

PS 08 and hyposin 6 were synthesized and tested against a plant pathogen (*Xanthomonas citrii*) and against human pathogens (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*). As a comparison, DRT 12 and DRT 15, two dermaseptins previously identified in *Phyllomedusa tarsius* secretion, were purified in a RP-HPLC system and tested against *Xanthomonas citrii* and the human pathogens, respectively.

Finally, this work contributes to the increase of knowledge concerning the biodiversity of these molecules as a group, adding a relevant number of analogs to the range of peptides already known.

AMINOÁCIDO	CÓDIGO (3LETRAS, 1 LETRA)	MASSA MONOISOTÓPICA	FÓRMULA AMINOÁCIDO	AMINOÁCIDO	CÓDIGO (3LETRAS, 1 LETRA)	MASSA MONOISOTÓPICA	FÓRMULA AMINOÁCIDO
Ácido aspártico	Asp, D	MW: 115.02		Isoleucina	Ile, I	MW: 113.08	
Alanina	Ala, A	MW: 71.03		Leucina	Leu, L	MW: 113.08	
Arginina	Arg, R	MW: 156.10		Lisina	Lys, K	MW: 128.09	
Asparagina	Asn, N	MW: 114.04		Prolina	Pro, P	MW: 97.05	
Cisteína	Cys, C	MW: 103.00		Serina	Ser, S	MW: 87.03	
Fenilalanina	Phe, F	MW: 147.06		Tirosina	Tyr, Y	MW: 163.06	
Glicina	Gly, G	MW: 57.02		Treonina	Thr, T	MW: 101.04	
Glutamina	Gln, Q	MW: 128.05		Triptofano	Trp, W	MW: 186.07	
Ácido Glutâmico	Glu, E	MW: 129.04		Valina	Val, V	MW: 99.06	
Histidina	His, H	MW: 137.05		Metionina	Met, M	MW: 131.04	

Introdução

Os anfíbios constituem um grupo taxonômico formado por salamandras, cecílias e anuros. Estes animais possuem como característica marcante um modo de vida dividido entre o ambiente aquático e o terrestre em pelo menos uma fase do desenvolvimento (Pough *et al.*, 1999). Sua dependência do ambiente aquático está relacionada com desenvolvimento de uma pele altamente sensível que é essencial à sua respiração cutânea, é altamente vulnerável a agressões do ambiente, tanto bióticas (ex: microrganismos e predadores) como abióticas (ex: resistência a dessecação) (Stebbins e Cohen, 1995). Essa pressão culminou no desenvolvimento de um sistema de defesa inato baseado na expressão, produção, acúmulo e secreção de moléculas bioativas por glândulas localizadas na derme destes animais. A secreção cutânea de anuros contém uma ampla gama de classes de biomoléculas, como alcalóides, amins biogênicas, proteínas e peptídeos (Lazarus e Attila, 1993; Brand *et al.*, 2002; Pukala *et al.*, 2006).

Os peptídeos bioativos secretados a partir das glândulas cutâneas de anfíbios vêm sendo estudados há mais de 30 anos, principalmente em anuros, e são considerados um dos principais fatores responsáveis pelo sucesso evolutivo desse grupo (Lazarus e Attila, 1993). Considerando a variedade estrutural e funcional desses peptídeos, a pele de anfíbios, especialmente anuros, é considerada uma rica fonte de peptídeos com potencial para servir como modelos para a produção de novos fármacos (Negri *et al.*, 1992; Lazarus *et al.*, 1999; Gebhard *et al.*, 2004; Prates *et al.*, 2004; Brand *et al.*, 2006b).

Atualmente, existem dezenas de famílias de peptídeos conhecidas, as quais são agrupadas principalmente de acordo com sua estrutura primária e/ou espectro de atividade biológica. Dentre a gama de atividades já descritas podem ser citados hipotensores e vasodilatadores (Brand *et al.*, 2006b), analgésicos (Negri *et al.*, 1992), inibidores de proteases (Gebhard *et al.*, 2004), neuropeptídeos (Lazarus *et al.*, 1999) e peptídeos antimicrobianos (PAMs) (Zaslóff, 1987; Prates *et al.*, 2004; Conlon *et al.*, 2006). Muitos destes peptídeos são encontrados em altas concentrações em anfíbios e seu

estudo contribui para a identificação e a determinação de atividade de análogos encontrados em mamíferos (Erspamer, 1994).

O desenvolvimento de técnicas como a espectrometria de massa e métodos cromatográficos juntamente com a evolução das mesmas possibilitou que um grande número de moléculas fosse identificado e caracterizado quanto sua estrutura primária. Várias espécies pertencentes ao mais diversos gêneros e famílias de anfíbios já foram estudadas e mesmo peptídeos encontrados em baixas concentrações podem ser caracterizados devido ao nível de resolução dessas metodologias (Brand *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2005; Conlon *et al.*, 2007).

A subfamília Phyllomedusinae de anfíbios, pertencente à família Hylidae possui peptídeos representantes de muitos destes grupos de moléculas (Erspamer *et al.*, 1985; Gebhard *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006). Entre elas se destacam as dermaseptinas e as filoseptinas, duas famílias de PAMs que até o momento só foram encontradas nesse grupo de anfíbios (Brand *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2005; Brand *et al.*, 2006a; Chen *et al.*, 2006).

A produção de PAMs como parte de um sistema imune inato, tal como visto em anfíbios, constitui um mecanismo essencial e presente tanto entre vertebrados como em invertebrados (Krugliak *et al.*, 2000). Esse mecanismo complementa o sistema imune adaptativo mediado por células específicas e constitui a primeira linha de defesa contra a proliferação desordenada de microrganismos (Bevins e Zasloff, 1990; Vanhoye *et al.*, 2003). A maioria destes peptídeos é de natureza anfifílica, com regiões hidrofílicas com resíduos polares positivamente carregados e regiões hidrofóbicas; além de possuir carga global positiva (Leite *et al.*, 2005).

A primeira dermaseptina foi descrita em 1991 e recebeu esse nome devido à sua origem, a derme (“derma”) do anfíbio *P. sauvagei*, e sua atividade biológica contra fungos patogênicos, além de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (“septina”) (Mor *et al.*,

1991). Posteriormente, outras dermaseptinas demonstraram atividade também contra protozoários e vírus (Krugliak *et al.*, 2000; Lorin *et al.*, 2005). Como a maioria dos PAMs, são moléculas alifáticas e tendem a assumir conformações anfífilas em α -hélice quando em meio helicogênico, mostrando uma separação bem definida entre domínios hidrofóbicos e hidrofílicos (Mor *et al.*, 1991; Leite *et al.*, 2007). Este tipo de conformação parece estar intimamente ligado à sua atividade antimicrobiana (Mor *et al.*, 1994).

Acredita-se que algumas moléculas da família das dermaseptinas, tal qual a adenoregulina, possam apresentar outras atividades biológicas além da atividade antimicrobiana (Daly *et al.*, 1992). Assim como as dermaseptinas, a adenoregulina possui atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias, possuindo também uma ação potencializadora da ligação para receptores de adenosina A1 (Mor e Nicolas, 1994; Daly *et al.*, 1992).

As filoseptinas constituem outra família de peptídeos antimicrobianos somente encontrados, até o momento, na secreção cutânea de anfíbios dos gêneros *Phyllomedusa* e *Hylomantis* (Leite *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Conlon *et al.*, 2007). Estas possuem em geral 19-20 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária e assim como as dermaseptinas parecem assumir conformações anfífilas em meios helicogênicos (Leite *et al.*, 2005). Peptídeos desta família possuem ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, assim como contra protozoários (Leite *et al.*, 2005). Apesar de sua ação efetiva contra microrganismos, a maior parte desses peptídeos não demonstrou atividade hemolítica significativa contra eritrócitos humanos (Leite *et al.*, 2005; Conceição *et al.*, 2006; Conlon *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação de dermaseptinas e filoseptinas parece estar direcionado principalmente à membrana plasmática, causando perturbações que acabam por promover inibição de crescimento ou morte celular de microrganismos (Epanand e Vogel, 1999; Leite *et al.*, 2005; Brand *et al.*, 2006a). A interação de PAMs com membranas

lipídicas ocorre por vias que não utilizam receptores específicos, mesmo que alguns poucos pareçam utilizar certos receptores uma vez que são ativos em concentrações nanomolares (Shai, 2002). É notável a capacidade da maioria destas moléculas de distinguir entre células de mamíferos e células procarióticas, e essa propriedade parece estar ligada diretamente à composição da membrana celular destes tipos celulares, como por exemplo, a composição lipídica das mesmas e a presença de esteróides (Yeaman e Yount, 2003). Além disso, propriedades físico-químicas dos peptídeos também influenciam na sua potência e seletividade por certos tipos de membranas.

Existem três modelos de mecanismos pelos quais essas moléculas provocam perturbações nas membranas. O modelo barril “barrel-stave”, no qual poros em forma de barril são formados pela agregação de peptídeos na membrana, e o modelo carpete (modo de ação atribuído às dermaseptinas) pelo qual os peptídeos se ligam a motivos carregados negativamente na membrana celular do alvo causando desintegração da mesma quando uma determinada concentração crítica é atingida (Shai, 2002). Um terceiro mecanismo vem sendo proposto para melhor explicar a ação de PAMs, com base na formação de micelas compostas por peptídeos e fosfolipídios retirados da membrana celular que acaba por causar permeabilização e destruição da mesma (Bechinger e Lohner, 2006). Este mecanismo é chamado de detergente. (Bechinger e Lohner, 2006).

É importante ressaltar que em cada espécie de *Phyllomedusa* já estudada, são encontrados vários análogos dessas famílias de PAMs, o que provavelmente confere a capacidade de defesa contra uma ampla gama de patógenos (Mor *et al.*, 1994; Leite *et al.*, 2005). Essa variedade pode também estar relacionada a um possível modo de ação desses peptídeos baseado no sinergismo de diferentes componentes de uma ou diferentes famílias de moléculas com o objetivo de potencializar ou tornar seletiva a atividade antimicrobiana (Mor *et al.*, 1994).

Revisão Bibliográfica

1.Sistema de defesa química de anfíbios

Anfíbios, especialmente os anuros, são uma fonte de inúmeras moléculas bioativas. Várias destas são análogas às moléculas encontradas tanto em mamíferos como em répteis. Juntamente com estes análogos, que provavelmente possuem uma função de defesa contra predadores naturais, peptídeos com atividade antimicrobiana são ricos em abundância e variabilidade.

Antibióticos naturais são encontrados em organismos de diversos reinos, como o animal e o vegetal, e são produzidos e estocados em tecidos que são constantemente atacados por patógenos naturais (Bechinger e Lohner, 2006). Sua produção é constitutiva, porém pode ser estimulada por eventuais infecções como é o caso da cecropina, um PAM encontrado em mariposas (Bechinger e Lohner, 2006). Estas moléculas são em sua maioria de natureza peptídica, e constituem um sistema de defesa inato que funciona como uma primeira barreira contra a invasão de microrganismos patogênicos e complementa o sistema imune adaptativo mediado por células altamente específicas, funcionando assim como um sistema secundário de defesa de rápida ação (Shai, 1999).

Existe uma grande variação com relação às características estruturais de PAMs, sendo a maioria composta de L-aminoácidos mas sua estrutura varia entre α -hélices e folhas β (com a presença de cisteínas) (Shai, 1999). Na presença de D-aminoácidos podem também formar β -hélices, estrutura essa que provoca o aparecimento de núcleos hidrofóbicos no interior das hélices (Shai, 1999). Além disso, dentro das diversas famílias que compõem esse grupo de moléculas, existe uma grande heterogeneidade na estrutura primária, o que pode estar relacionado a um longo processo de adaptação que acabou por tornar estes anfíbios resistentes aos constantes ataques de patógenos naturais.

Os anfíbios da ordem anura provavelmente constituem a mais rica fonte de moléculas bioativas dentre os vertebrados, sendo boa parte destes, PAMs. Estes são encontrados em diversas famílias, sendo que espécies pertencentes às famílias Ranidae e Hylidae se destacam em quantidade e diversidade de moléculas. Apesar das diferenças qualitativas existentes entre esses peptídeos (estrutura primária, hidrofobicidade, momento hidrofóbico, carga residual, modificações pós-traducionais) acredita-se que todos são derivados de um ancestral comum de aproximadamente 150 milhões de anos (Vanhoye *et al.*, 2003). As semelhanças encontradas na estrutura gênica de tais peptídeos corroboram tal hipótese, tendo em vista que as regiões de peptídeo sinal e peça acídica são altamente conservadas nos genes das mais diversas famílias de PAMs enquanto a região gênica codificadora do peptídeo maduro é hipervariável (Amiche *et al.*, 1999; Vanhoye *et al.*, 2003) (Figura 1). Esta variabilidade de peptídeos ativos identificados na secreção de anfíbios parece estar relacionada com a diversidade de patógenos com os quais estes animais mantêm contato. Membros da mesma família de peptídeos são muitas vezes ativos contra microrganismos diferentes, reforçando a idéia de que este contato exerceu uma pressão seletiva que atuou na diferenciação desse grupo de moléculas e adaptação desses organismos (Mor *et al.*, 1994; Bechinger e Lohner, 2006).

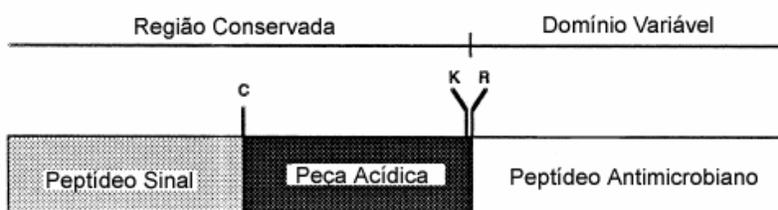


Figura 1. Modelo geral do precursor de peptídeos antimicrobianos de anfíbios.

Modificado de Amiche *et al.*, 1999.

Antimicrobianos produzidos por anuros, tanto por glândulas da pele como por glândulas internas vêm sendo extensivamente estudados nos últimos anos. O resultado desse esforço para identificação de novas moléculas resultou na prospecção de um grande número de peptídeos biologicamente ativos contra uma variedade de microrganismos, sendo estes bactérias gram-positivas, gram-negativas, protozoários, fungos e até mesmo vírus.

2. Peptídeos antimicrobianos

Várias famílias de PAMs já foram descritas nos últimos 30 anos. Quanto aos anfíbios, mais de 600 moléculas já foram identificadas como possíveis antimicrobianos, sendo que, dentro desse grupo, várias foram caracterizadas quanto ao seu espectro de ação (www.uniprot.org/uniprot). De acordo com a similaridade de estrutura primária essas moléculas foram agrupadas em diversas famílias.

2.1 Peptídeos antimicrobianos da família Hylidae

A família Hylidae se destaca entre os anfíbios por ser uma rica fonte de PAMs. Dentro desta família, a subfamília Phyllomedusinae é o taxon mais estudado. Mais de 80 PAMs já foram descritos em apenas quatro gêneros pertencentes a essa subfamília: *Agalychnis*, *Hylomantis*, *Pachymedusa* e *Phyllomedusa* (Amiche *et al.*, 2008).

Apesar da variedade encontrada com relação à estrutura primária e espectro de ação, os PAMs de anfíbios da subfamília Phyllomedusinae são agrupados, por similaridade, em seis principais famílias de moléculas: dermaseptinas, filoseptinas, plasticininas, dermatoxinas, filoxinas e hiposinas (Amiche *et al.*, 2008).

2.1.1 Dermaseptinas

Dermaseptinas são peptídeos cuja estrutura primária varia entre 21 e 34 aminoácidos, apresentando cationicidade e um resíduo de triptofano comumente conservado na posição 3 (Brand *et al.*, 2006a; Thompson *et al.*, 2007a) (Figura 3). Estes peptídeos são produzidos principalmente por anfíbios do gênero *Phyllomedusa*, mas também foram encontrados membros dessa família em anfíbios dos gêneros *Agalychnis* e *Pachymedusa*, os quais também fazem parte da subfamília Phyllomedusinae (Wechselberger, 1998; Lequin *et al.*, 2006).

Com relação à sua estrutura gênica, dermaseptinas apresentam motivos gênicos conservados, que contrastam com a grande variabilidade vista nos peptídeos maduros. Todos os precursores possuem a mesma estrutura, constantemente encontrada em precursores de PAMs de anfíbios (Vanhoye *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2007) (Figura 2).

As dermaseptinas apresentam atividade antimicrobiana contra uma gama de microrganismos. Vários estudos vêm demonstrando a importância dessas moléculas no controle de patógenos, como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, protozoários, fungos e leveduras (Brand *et al.*, 2002; 2005; Mor *et al.*, 1991; 1994; Leite *et al.*, 2007). Foi demonstrada também atividade inibitória para várias cepas de vírus HIV-1, aumentando ainda mais o espectro de ação desse grupo (Lorin *et al.*, 2005). Além de participar do sistema inato de defesa, essas moléculas parecem ser estimuladoras do sistema imune celular e específico, causando entre outros efeitos, degranulação de leucócitos polinucleados (Ammar *et al.*, 1998).

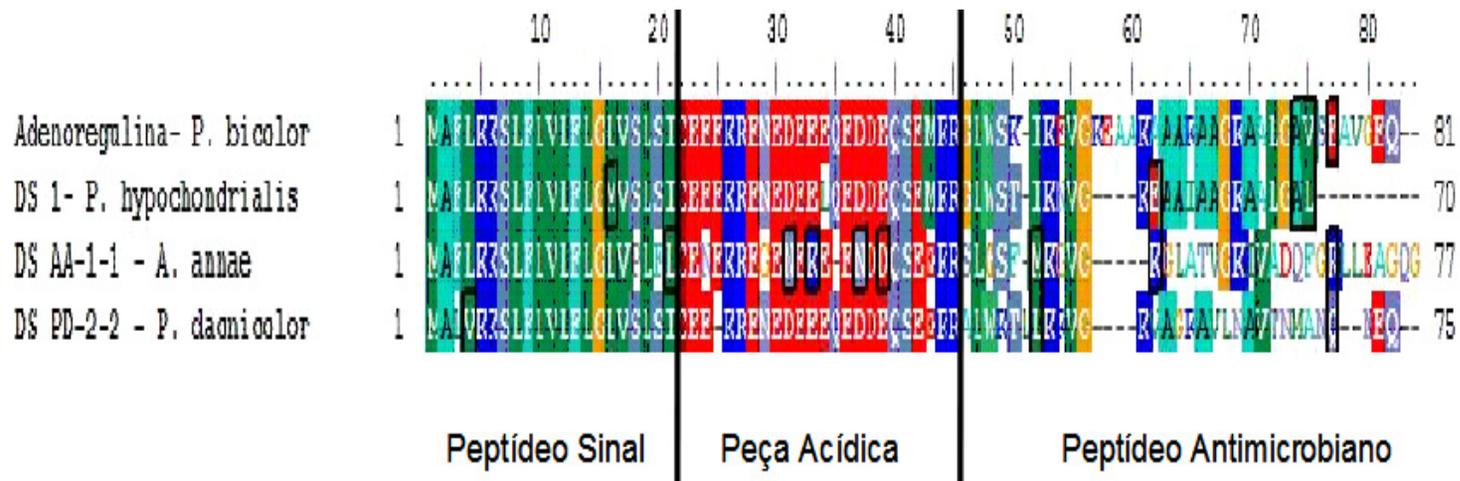


Figura 2. Alinhamento de precursores de dermaseptinas. Vermelho. Resíduos carregados negativamente. **Azul.** Resíduos carregados positivamente. **Verde escuro e claro.** Resíduos hidrofóbicos. Retângulos marcam substituições conservativas.

Apesar do amplo espectro de ação demonstrado por essas moléculas, a maioria das dermaseptinas não é tóxica para células de mamíferos. Diversos estudos confirmam esse fato, utilizando como modelos, células sanguíneas, do sistema imune e até mesmo células do tecido epitelial (Brand *et al.*, 2002; Lorin *et al.*, 2005). No caso de dermaseptinas não-seletivas, como é o caso da DS 4 (encontrada em *P. sauvagei*), a utilização de moléculas truncadas ou com determinadas substituições que visam aumentar a cationicidade e diminuir a hidrofobicidade parecem diminuir a citotoxicidade dessas dermaseptinas (Kustanovich *et al.*, 2002). Tais modificações podem além de aumentar a seletividade, aumentar também a potência antimicrobiana de tais derivados em comparação com as moléculas naturais (Krugliack *et al.*, 2000; Lorin *et al.*, 2005).

Também foi demonstrada atividade espermicida para DS 4 e derivados, o que leva a um novo campo de produção de contraceptivos com base nessas moléculas (Zairi *et al.*, 2007). Juntamente com essa atividade, a ação comprovada dessas mesmas moléculas contra patógenos causadores de doenças sexualmente transmissíveis (DST) como *N. gonorrhoeae*, causadora da gonorréia e *C. albicans*, um dos fungos patogênicos mais encontrados no trato vaginal humano, reforça a possibilidade de utilização de dermaseptinas como instrumentos para o controle da natalidade, prevenção e até mesmo controle de doenças (Zairi *et al.*, 2008).

Como outros PAMs, as dermaseptinas possuem a tendência de formar α -hélice em meio apolar como conseqüência há formação de domínios bem definidos separando resíduos polares de apolares, essa separação, que confere a essas moléculas um caráter anfifílico (Leite *et al.*, 2005). Apesar de ser uma característica comum entre PAMs, a anfifilicidade, não é essencial para a atividade antimicrobiana, como foi demonstrado para a dermaseptina S9 (Lequin *et al.*, 2006). Esta molécula, cuja estrutura primária foi determinada a partir de uma biblioteca de cDNA obtida de *P. sauvagei*, apresentou características próprias e bem diferenciada de outras dermaseptinas identificadas. Seu

núcleo hidrofóbico, três resíduos de triptofano localizados em seu interior e um C-terminal carregado positivamente fazem dessa dermaseptina uma molécula singular na família (Lequin *et al.*, 2006). DS 9 apresenta um alto grau de agregação, assim como DS 4, mas ao contrário da mesma não provoca lise de eritrócitos em baixas concentrações, o que indica que agregação e seletividade podem não estar diretamente relacionados (Lequin *et al.*, 2006).

2.1.2. Filoseptinas

As filoseptinas constituem um grupo recentemente descrito de PAMs encontrados até agora somente em espécies dos gêneros *Phyllomedusa* e *Hylomantis*. Sua estrutura primária é mais curta quando comparada com as dermaseptinas, apresentando não mais do que 20 resíduos de aminoácidos (Leite *et al.*, 2005; Conceição *et al.*, 2006; Conlon *et al.*, 2007) (Figura 3).

Esta família é marcada por possuir uma estrutura primária mais conservada do que as dermaseptinas. Com relação a sua estrutura secundária, como outras famílias de antimicrobianos, também tendem a formar hélices em meio hidrofóbico, apesar da presença de uma prolina conservada na posição 6 que compromete sua linearidade (Thompson *et al.*, 2007a). Todos os componentes intactos dessa família apresentam o C-terminal amidado, característica que parece estar ligada à sua potência antimicrobiana (Leite *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2007a).

Precusores dessa família de peptídeos demonstram-se altamente conservados, sendo a região codificadora do peptídeo maduro a mais variável (Chen *et al.*, 2006) A similaridade existente entre os precusores de filoseptinas e dermaseptinas indicam um ancestral comum para as duas famílias de peptídeos (Thompson *et al.*, 2007a).

Assim como as dermaseptinas, as filoseptinas também possuem um amplo espectro de ação, incluindo bactérias Gram-negativas e positivas, assim como protozoários (*T. cruzi*) (Leite *et al.*, 2005; Conceição *et al.*, 2006; Conlon *et al.*, 2007 Thompson *et al.*, 2007a). Estas moléculas também não apresentam atividade hemolítica relevante (Leite *et al.*, 2005; Conceição *et al.*, 2006; Conlon *et al.*, 2007)

2.1.3. Dermatoxinas, Hiposinas, Plasticinas e Filoxinas

Dermatoxinas (Amiche *et al.*, 2000), hiposinas (Thompson *et al.*, 2007b), plasticinas (El Amri *et al.*, 2007) e filoxinas (Pierre *et al.*, 2000) constituem outras famílias de PAMs de anfíbios da subfamília Phyllomedusinae e que apesar de não demonstrar similaridades significativas em sua estrutura primária apresentam altos níveis de conservação de estrutura gênica entre si e com dermaseptinas e filoseptinas (Chen *et al.*, 2005) (Figura 3). Peptídeos pertencentes a essas famílias foram em sua maioria identificados a partir da clonagem de moléculas de cDNA, apresentando características variáveis de hidrofobicidade, cationicidade, tamanho da cadeia e espectro de ação (Pierre *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005; El Amri e Nicolas; 2008; Thompson *et al.*, 2007b).

Dentre esses grupos de moléculas, apenas as hiposinas ainda não tiveram atividade microbida testada, sendo considerados PAMs apenas em função de suas características físico-químicas e estruturais similaridade (Thompson *et al.*, 2007b). As hiposinas representam as menores moléculas já encontradas com potencial antimicrobiano nesse grupo de anfíbios. As demais famílias apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e organismos desprovidos de parede celular (Pierre *et al.*, 2000; Amiche *et al.*, 2000; El Amri *et al.*, 2007; El Amri e Nicolas; 2008)

Filoxinas e dermatoxinas, assim como outros PAMs, apresentam uma distribuição anfifílica de seus resíduos quando dispostos em hélice assim como um comportamento helicoidal em meios hidrofóbicos (Pierre *et al.*, 2000; Amiche *et al.*, 2000). Quanto à sua atividade antimicrobiana, as filoxinas são letais para certas cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo mais ativa contra a bactéria *Corynebacterium glutamicum* (Pierre *et al.*, 2000). Dermatoxinas apresentam um espectro de ação parecido com as filoxinas, demonstrando mais eficácia no controle de bactérias Gram-positivas e micoplasmas (Amiche *et al.*, 2000). Análises de cDNA demonstraram que os precursores das filoxinas e dermatoxinas apresentam alta similaridade com precursores de outros PAMs presentes na subfamília *Phyllomedusinae*, como filoseptinas e dermaseptinas (Chen *et al.*, 2005).

Família	Nome	Sequência	Espécie	Referência
Dermaseptinas	Dermaseptina-4 (DS IV)	ALWMTLLKKVLKAAAKALNAVLVGANA	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	Mor <i>et al.</i> , 1991
	Dermaseptina-1 (DS I)	ALWKTMLKKLGTMLHAGKAALGAAADTISQGTQ	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	Mor & Nicolas, 1994
	Dermaseptina 01 (DS 01)	GLWSTIKQKQKEAAIAAKAAGQAALGAL	<i>Phyllomedusa oreades</i>	Brand <i>et al.</i> , 2002
	Dermadistintina K (DD K)	GLWSKIKAAAGKEAAKAAKAAAGKAALNAVSEAV	<i>Phyllomedusa distincta</i>	Batista <i>et al.</i> , 1999
	Dermaseptina-6 (DSHypo06)	GLWSTIKQKQKEAAIAAKAAGQAVLNSASEAL-NH2	<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	Brand <i>et al.</i> , 2006
	Dermaseptina AA-3-3 [Precursor]	GMFTNMLKIGIKLAGQAALGAVKTLAGEQ	<i>Agalychnis annae</i>	Wechselberger, 1998
	Dermaseptina PD-3-6 [Precursor]	GVVTDLLNTAGLLGNLVGSLSGGER	<i>Pachymedusa dactinolor</i>	Wechselberger, 1998
Filoseptinas	Filoseptina-1 (PS-1)	FLSLIPHAINAVSAIAKH-NH2	<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	Leite <i>et al.</i> , 2005
	Filoseptina-4 (PS-4)	FLSLIPHAINAVSALANHG-NH2	<i>Phyllomedusa oreades</i>	Leite <i>et al.</i> , 2005
	Filoseptina-7 [Precursor] (PS-7)	FLSLIPHAINAVSAIAKH-NH2	<i>Phyllomedusa h. azurea</i>	Chen <i>et al.</i> , 2006
Dermatoxinas	Dermatoxina [Precursor] (DRT)	SLGSFLKGVGTTLASVGVVSDQFGKLLQAGQ	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	Amiche <i>et al.</i> , 2000
	Dermatoxina [Precursor] (drt-S)	ALGTLLKGVGSAVATVGMVADQFGKLLQA	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	Chen <i>et al.</i> , 2005
Hiposinas	Hiposina-1	LRPAVIRPKGK-NH2	<i>Phyllomedusa h. azurea</i>	Thompson, 2007b
	Hiposina-2	LRPAFIRPKGK-NH2	<i>Phyllomedusa h. azurea</i>	Thompson, 2007b
Plasticinas	Dermaseptina-like (PBN2)	GLVTSLIKAGKLLGGLFGSVTGGQS	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	Vanhoye <i>et al.</i> , 2003
	Dermaseptina-like (DRP-AC-1)	GLLSGILNTAGLLGNLIGLSLNGES	<i>Agalychnis callidryas</i>	Vanhoye <i>et al.</i> , 2003
Filoxinas	Filoxina [Precursor] (PLX)	GWMSKIASGIGTFLSGMQQ-NH2	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	Pierre <i>et al.</i> , 2000
	Filoxina [Precursor] (plx-S)	GWMSKIASGIGTFLSGVQQ-NH2	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	Chen <i>et al.</i> , 2005

Figura 3. Principais famílias de peptídeos antimicrobianos encontrados em phyllomedusídeos. Sequências terminadas em –NH2 indicam amidação C-terminal.

As plasticinas diferem em sua estrutura das outras famílias de PAMs encontrados em filomedusídeos principalmente quanto à sua caticionidade, que é menor comparada a outros PAMs (DRP-PBN2 apresenta a maior carga residual positiva desse grupo, +3) (El Amri e Nicolas, 2008). A atividade desse grupo de moléculas parece estar diretamente relacionada à sua caticionidade, desde que plasticinas sem carga residual positiva não apresentam atividade contra várias cepas de bactérias; em contrapartida, seus análogos catiônicos são ativos contra uma ampla gama de microrganismos incluindo *Escherichia coli* (El Amri *et al.*, 2007; El Amri e Nicolas. 2008).

Outra característica peculiar desse grupo de moléculas é a capacidade de adquirir conformações diferentes daquelas comumente encontradas em outros peptídeos já descritos. Além de α -hélice, plasticinas podem adquirir conformações β quando em contato com meios que mimetizam membranas (El Amri *et al.*, 2007).

Essa variedade observada internamente e entre as famílias de PAMs já descritas em filomedusídeos indica que além de sua ação microbicida, tais moléculas podem possuir outras funções biológicas em seus organismos de origem, assim como adenoregulina, um análogo de dermaseptina (Daly *et al.*, 1992; Ammar *et al.*, 1998; El Amri *et al.*, 2007). Restringindo-se apenas à sua ação antimicrobiana, a grande variação no espectro de ação dessas moléculas corrobora para a existência de modos de ação sinérgicos visando uma proteção maior contra uma ampla gama de patógenos naturais (Mor *et al.*, 1994)

3. Modo de ação de peptídeos antimicrobianos

O principal alvo de peptídeos antimicrobianos parece ser membranas plasmáticas, muitas dessas moléculas provocam morte celular a partir da lise da membrana e conseqüente alteração nas propriedades da mesma e do balanço osmótico celular.

Durante muito tempo, este pareceu o único modo pelo qual PAMs provocavam morte celular, apesar disso, novos estudos apontam para outros mecanismos cujos alvos são intracelulares (Park *et al.*, 1998; Morton *et al.*, 2007).

Vários estudos com microscopia de força atômica e microscopia eletrônica mostram o efeito lítico desses peptídeos em membranas (Bechinger e Lohner, 2006; Silva *et al.*, 2007). Perturbação de membranas, mesmo em casos quando o alvo é intracelular, deve ser um evento essencial para o processo de morte celular (Bechinger e Lohner, 2006).

A composição da membrana está diretamente relacionada com o modo como esses peptídeos interagem com a mesma, sendo que este parece ser o ponto principal da seletividade de antimicrobianos. A membrana plasmática de organismos procariontes e eucariontes difere em sua composição, tanto no conteúdo de fosfolipídios como na presença de outros componentes tais como esteróides (Yeaman e Yount, 2003). Este parece ser o principal motivo pelo qual a maioria dos PAMs até agora caracterizados conseguem discriminar células procarióticas e eucarióticas (Yeaman e Yount, 2003). A capacidade de agregação também parece estar relacionada com a seletividade uma vez que peptídeos que permanecem em estado monomérico parecem não ter atividade hemolítica (Bechinger e Lohner, 2006).

Muitos PAMs apresentam modo de ação variável dependendo das condições nas quais se encontram. Vários fatores precisam ser considerados na descrição de interações entre peptídeos e membranas, a relação peptídeo/lipídio, a composição da membrana, temperatura, hidratação e composição do tampão são essenciais para uma interpretação correta desse tipo de interação (Bechinger e Lohner, 2006).

O modo de ação desse grupo de moléculas é ainda bastante discutido. Com relação à estrutura primária, diversos estudos vêm demonstrando, principalmente com dermaseptinas, que a composição de aminoácidos e sua localização na seqüência

influenciam diretamente na potência e seletividade desses peptídeos. Deleções, inversões e substituições provocam alterações tanto nas concentrações necessárias para a atividade de um determinado peptídeo como na sua citotoxicidade (Krugliak et al., 2000).

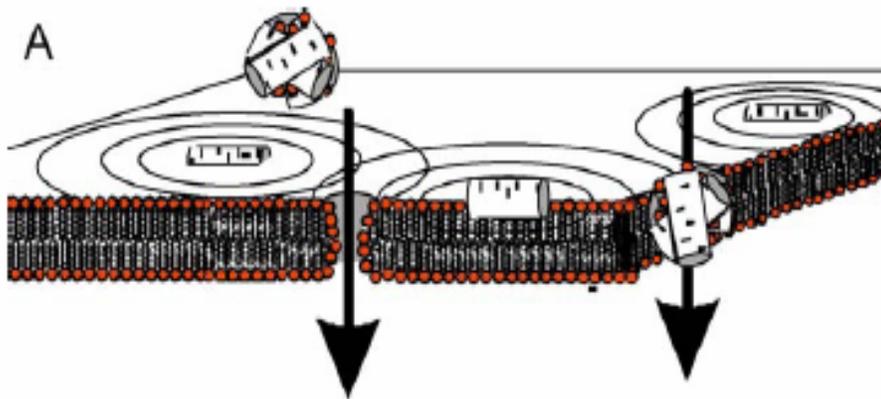
Existem alguns modelos que buscam descrever o modo de ação de PAMs considerando como alvo membranas plasmáticas. Um dos modelos é denominado de poro toroidal (Shai, 2002). Este descreve que PAMs podem atuar formando poros juntamente com lipídios presentes na membrana, onde estes últimos ajudam na estabilização dos poros uma vez que reduzem a repulsão eletrostática existente entre peptídeos positivamente carregados. A formação de poros é dirigida por interações hidrofóbicas, após o início desse processo, mais monômeros seriam recrutados, o que causaria o aumento do poro (Shai, 2002). Poucos poros são necessários para desestabilizar a membrana, fato que explica a atividade de vários PAMs em concentrações micromolares (Shai, 2002) (Figura 4).

O modelo carpete é um modelo utilizado para explicar o modo de ação de várias famílias de peptídeos antimicrobianos, inclusive dermaseptinas (Shai, 2002). A permeabilização da membrana é iniciada com a ligação dos peptídeos, carregados positivamente, a motivos negativos presentes na camada fosfolipídica. A orientação dos peptídeos de modo que sua face hidrofóbica fique em contato com a parte lipídica e a face polar em contato com os grupos carregados dos fosfolipídios provoca uma curvatura na bicamada lipídica. Após uma determinada concentração peptídica ser atingida, acontece a permeabilização e desestabilização da membrana, durante este processo vários poros temporários atuam no colapso da mesma. Este modelo é utilizado principalmente para explicar o modo de ação de peptídeos não-hemolíticos, isto é, altamente seletivos (Shai, 2002) (Figura 4).

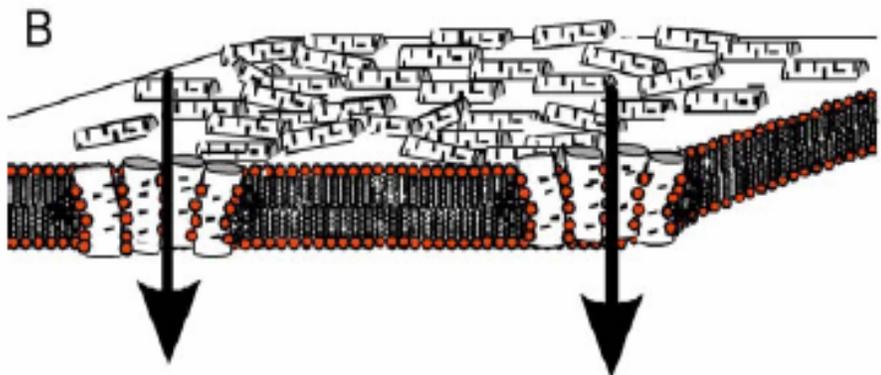
A ação detergente dessas moléculas hidrofóbicas provocou o surgimento de um novo modelo, o modelo “*detergent like*”. Nesse modelo, quando em solução aquosa,

peptídeos altamente hidrofóbicos formam micelas ou agregados que quando entram em contato com fosfolipídios de membranas arrancam pedaços dessa membrana resultando no aparecimento de estruturas semelhantes a poros, sendo esse efeito dependente da concentração de um determinado peptídeo (Bechinger e Lohner, 2006) (Figura 4).

Mecanismo Detergente (baixas concentrações peptídicas)



Mecanismo Carpete (altas concentrações peptídicas)



Mecanismo poro toroidal "Barrel-stave" (altas concentrações peptídicas)

Figura 4. Modelo de mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos.

Modificada de Bechinger e Lohner, 2006.

Apesar da ação membranolítica ser considerada a principal causa de morte celular, PAMs também podem desencadear processos de morte celular programada interagindo com alvos intracelulares (Park *et al.*, 1998; Morton *et al.*, 2007). DsS3(1-16), uma forma truncada da dermaseptina S3, se liga à moléculas de DNA causando danos e desencadeando processos que acabam por induzir morte celular programada em fungos *Saccharomyces cerevisiae* (Morton *et al.*, 2007). A buforina II também demonstrou se ligar a moléculas de DNA e RNA, provocando assim morte celular (Park *et al.*, 1998).

Vários fatores parecem interferir no modo como PAMs interagem com os vários tipos celulares. Hidrofobicidade, momento hidrofóbico, cationicidade, helicidade e modificações pós-traducionais modelam essa atividade juntamente com características específicas relacionadas às células eucariontes e procariontes como a composição da membrana plasmática e mecanismos de divisão celular.

Justificativa

A secreção cutânea de anfíbios é uma rica fonte de novas moléculas farmacologicamente ativas. Tais moléculas são importantes para o entendimento de como esse grupo evoluiu e como se adaptou as diferentes pressões seletivas existentes no meio onde se encontram.

Em virtude de sua função na realização de trocas gasosas, a pele dos anfíbios constitui uma barreira muito sensível contra estresse tanto abiótico quanto biótico. Portanto, a caracterização de moléculas presentes na secreção cutânea de tais animais ajuda a esclarecer como funciona o complexo mecanismo de defesa baseado na secreção de substâncias biologicamente ativas em anuros (Prates *et al.*, 2004). O entendimento desse mecanismo ajuda a compreender as relações entre anfíbios e seus predadores ou patógenos naturais e como essa relação possibilitou a diversificação das moléculas encontradas na secreção cutânea de diferentes espécies.

Sendo a secreção cutânea de anfíbios um mecanismo de defesa contra predadores e invasão por microrganismos, essa contém diversas moléculas que estão diretamente relacionadas a essa função. A ampla distribuição e o fato desse conjunto de moléculas possuírem um ancestral comum favorecem estudos que busquem resolver determinados problemas filogenéticos dentro do grupo de anfíbios utilizando como fonte de informações de moléculas produzidas por esses animais (Vanhoye *et al.*, 2003).

Considerando o grupo dos PAMs, estudos relacionados às famílias das dermaseptinas e das filoseptinas vêm demonstrando que tais moléculas possuem atividade contra uma ampla variedade de microrganismos como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e protozoários e algumas possuem efeito hemolítico desprezível (Erspamer, 1994; Leite *et al.*, 2005; Brand *et al.*, 2002; Brand *et al.*, 2006a). Com o surgimento de linhagens de microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais, cada vez mais se torna imperativa a descoberta de novas moléculas capazes de substituir de forma eficaz os antibióticos utilizados no mercado.

Estudos ao longo dos últimos 30 anos comprovam como é importante a manutenção da biodiversidade como uma fonte de novas moléculas farmacologicamente ativas (Erspamer *et al.*, 1985; Leite *et al.*, 2005; Negri *et al.*, 1992; Lazarus *et al.*, 1999; Gebhard *et al.*, 2004; Prates *et al.*, 2004; Brand *et al.*, 2006a; Brand *et al.*, 2006b). A descoberta de diferentes famílias de PAMs, tal como aconteceu com as magaininas, vem se mostrando cada vez mais importante para o desenvolvimento de modelos que possam originar novos e potentes fármacos.

Por fim, espécies do gênero *Phyllomedusa* são amplamente distribuídas em todo território nacional e em diversos países da América do Sul. O presente estudo pretende, portanto, ampliar o conjunto de informações sobre biodiversidade e adaptação das diversas espécies do gênero.

Objetivos

Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo a prospecção de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea de indivíduos adultos de *P. burmeisteri*, *P. rohdei* e *P. tomopterna*.

Objetivos Específicos

- 1) Isolar, purificar e identificar peptídeos com possível atividade antimicrobiana presentes nas secreções cutâneas de indivíduos adultos de *P. burmeisteri*, *P. rohdei* e *P. tomopterna*.
- 2) Comparar as estruturas primárias das moléculas identificadas com outras já depositadas em bancos de dados;
- 3) Testar a atividade biológica de alguns peptídeos encontrados com possível ação antimicrobiana.

Material e Métodos

1. Secreções da pele de anfíbios: espécimes adultos de *P. burmeisteri* (n=3) e *P. rohdei* (n=2) coletados no município de Ubatuba (SP) e *P. tomopterna* (n=10) e *P. tarsiis* (n=8), coletados no município de Manaus (AM) (Licença de coleta IBAMA processos números: 097/96-DIFAS e 0637/91A.C). A secreção cutânea de cada espécie foi obtida por meio da estimulação elétrica (5 V) das glândulas da pele e coletada em água destilada. O extrato obtido foi então filtrado, congelado e liofilizado.

2. Purificação de peptídeos: as amostras liofilizadas foram ressuspensas em uma solução de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e purificadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC). Após a realização de cromatografias semi-preparativas com a utilização de uma coluna 218TP510 (Vydac, C₁₈, 10x250 mm, 300 Å, Hesperia, USA), as frações contendo peptídeos de interesse foram posteriormente purificadas por meio de passos analíticos de HPLC, coluna 218TP54 (Vydac, C₁₈, 4 x 250 mm, 300 Å, Hesperia, USA) e SOURCE™ (Amersham, 5rpc st4.6/150 Pharmacia Biotech, AB), utilizando gradientes otimizados de acetonitrila. Os experimentos de RP-HPLC (Shimadzu, Japão) foram monitorados em comprimentos de onda (216 e 280 nm) e as frações manualmente coletadas e liofilizadas.

3. Seqüenciamento de novo: espectrometrias de massa MALDI TOF/TOF e ESI Q-TOF foram utilizadas para a inspeção de massas moleculares (MS) e identificação de seqüências de aminoácidos (MS/MS) de peptídeos nas amostras. Para MALDI TOF/TOF as frações foram dissolvidas em uma matriz saturada de ácido α -cyano 4-hidroxi-cinâmico em acetonitrila/água/3% ácido trifluoroacético (2,5/2/0,5). Para as análises foi utilizado um espectrômetro de massa MALDI TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Alemanha) operando no modo refletido positivo. Em alguns casos também foi utilizado um

espectrômetro de massa do tipo Q-TOF, modelo Ultima API (Waters-Micromass, Manchester, Reino Unido) com fonte de ionização *nanoelectrospray*. As amostras foram diluídas em uma solução 50% acetonitrila com 0,05% TFA. Os espectros foram adquiridos em modo W, sendo a energia de colisão em modo MS/MS variável. A análise de espectros obtidos com a utilização dos dois espectrômetros e posterior seqüenciamento *de novo* foi realizado por meio de interpretação manual. Buscas por similaridade foram realizadas por meio do programa Fasta3 sob o servidor Expasy (Expasy Molecular Biology server; <http://www.expasy.org>). Os alinhamentos foram feitos com o auxílio do programa ClustalW sob o mesmo servidor.

4. Degradação de EDMAN e seqüenciamento automático: Após a determinação das massas moleculares e do grau de pureza, alguns peptídeos de interesse foram seqüenciados automaticamente pelo método de degradação de Edman. A determinação da estrutura primária por meio do seqüenciamento automático do N-terminal de peptídeos foi realizada em um seqüenciador de aminoácidos PPSQ-23 (Shimadzu, Japão) conforme instruções do fabricante.

5. Síntese de Peptídeos: PS 08 e Hiposina 6 foram sintetizados utilizando a estratégia Fmoc/t-butila (9-fluorenilmetoxicarbonila) de síntese manual em suporte sólido (Chan e White, 2000). A resina Fmoc-PAL-PEG-PS, 0,21 mmol g⁻¹(NovaBiochem) foi utilizada com suporte sólido. O primeiro passo foi a desproteção do grupo Fmoc que protege o sítio reativo da resina. Como o grupo Fmoc é base-lábil, a desproteção foi realizada com uma solução de piperidina a 20% em dimetilformamida (DMF). As reações de acoplamento foram conduzidas por meio de ativação com 1,3-diisopropilcarbodimida (DIC)/ 1-hidroxibenzotriazola (HOBt) em DMF, incubando-os por 2 horas sob agitação. Estas duas etapas (desproteção e acoplamento) foram, então, repetidas sucessivamente

até a adição e posterior desproteção do último resíduo de aminoácido. Após cada etapa, a resina era lavada com DMF e MeOH, repetindo-se este procedimento alternadamente por três vezes. O teste de Kaiser (ninidrina) era utilizado para monitorar as reações de acoplamento e desproteção.

Após a síntese, a clivagem e a desproteção final foram conduzidas em uma solução de TFA:TIS:H₂O (95:2,5:2,5; v:v:v) durante 90 min. Feito isso, o peptídeo foi lavado seis vezes com éter diisopropílico gelado, o que, além da precipitação do peptídeo, é responsável pela retirada de excesso de grupamentos protetores e de seqüestradores de carbocátions. O peptídeo foi, então, extraído da resina por meio de lavagens com água e água:ACN (1:1, v:v), seguidas de filtração, em funil de placa porosa. Esse procedimento foi imediatamente seguido pela liofilização do material obtido. O peptídeo resultante desse processo foi purificado por cromatografia de fase reversa, caracterizado por espectrometria de massas MALDI TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Alemanha).

6. Atividade Antimicrobiana: As atividades antimicrobianas da filoseptina 8 e da hiposina 6 foram testadas contra as seguintes cepas de bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29313 compradas da American Type Culture Collection e contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrii*, obtida da coleção de bactérias fitopatogênicas do IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná, PR-Brasil). Adicionalmente, DRT 12 foi testada contra *X. citrii* e DRT 15 contra *E. coli* e *S. aureus*. As bactérias patogênicas humanas foram cultivadas em meio Mueller-Hinton, enquanto que *X. citrii* foi cultivada em meio de levedura enriquecido com glicerol. O inóculo inicial para todas as cepas foi 10⁵ UFC/mL. A maior concentração peptídica testada foi 256 µg/mL sendo diluída de forma seriada até 4 µg/mL em uma placa de 96 poços. Os experimentos foram realizados em triplicatas e a absorbância das células foi medida em 600 nm após incubação por 12 horas a 37°C. Já *X. citrii* foi incubada por 30

horas a 28 °C. A concentração mínima inibitória (MIC) de cada peptídeo foi determinada como a menor concentração peptídica capaz de inibir o crescimento bacteriano. Por fim, os MICs de antibióticos convencionais (ampicilina e cloranfenicol) foram determinados contra cepas patogênicas de humanos seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

7. Atividade Hemolítica: A atividade hemolítica da filospetina 8 e do análogo de hiposina foi determinada usando eritrócitos obtidos de sangue fresco humano O⁺. Os eritrócitos foram centrifugados (1550xg por 2 min) e lavados três vezes em tampão PBS 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. Após as células foram suspensas 10 vezes no mesmo tampão e incubadas com uma série de concentrações de cada peptídeo (256 µg/mL a 4 µg/mL) por 1 hora a 37°C. As placas então foram centrifugadas (1550xg por 2 min) e o sobrenadante retirado. A leitura do mesmo foi feita em 414 e 567 nm. O controle positivo foi feito com Triton X-100 e o negativo foi obtido submetendo o sangue apenas ao mesmo tratamento em PBS.

Resultados

1. Purificação dos peptídeos

Os fracionamentos dos extratos totais das secreções cutâneas de *P. rohdei*, *P. tomopterna* e *P. burmeisteri* permitiram a obtenção de diversas frações as quais contêm inúmeros peptídeos. Os perfis cromatográficos das espécies analisadas sob as mesmas condições demonstraram diferenças de componentes presentes nas frações das secreções desses anfíbios comprovando a diversidade molecular encontrada no gênero (Figura 5).

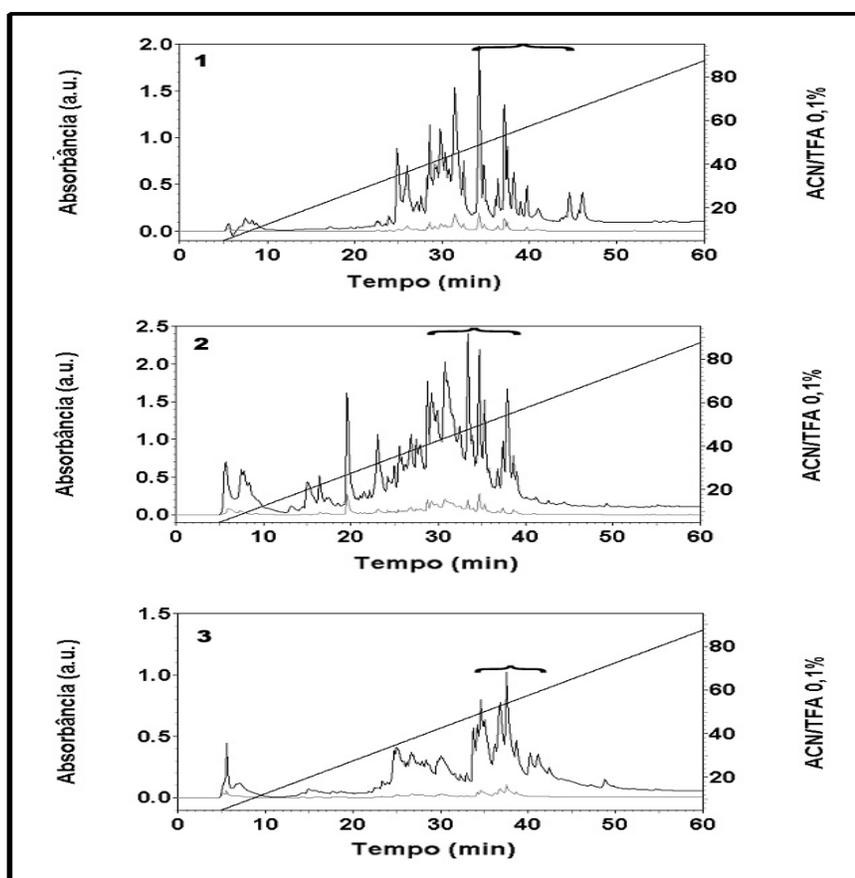


Figura. 5. Cromatogramas dos extratos totais. Obtidos por RP-HPLC de três espécies de *Phyllomedusa* utilizando um gradiente linear de acetonitrila em uma coluna semi-preparativa 218TP510 (Vydac, C₁₈, 10x250 mm, 300 Å, Hesperia, USA) (5-95%). A separação cromatográfica foi monitorada em 216nm (linha preta) e 280 (linha cinza). 1- *P. rohdei* 2- *P. tomopterna* 3- *P. burmeisteri*. Chave representa região onde eluíram moléculas de interesse.

Dermaseptinas e filoseptinas são peptídeos antimicrobianos eluídos normalmente entre concentrações de acetonitrila que variam de 40% a 70% (Leite *et al.*, 2005; Brand *et al.*, 2006). Os dados obtidos apontam para uma semelhança no que diz respeito ao tamanho médio dos peptídeos encontrados nesses extratos, isto é, na sua massa molecular (Figuras. 6 e 8). Por outro lado, quando se trata da comparação entre os tempos de retenção dos componentes moleculares em colunas da fase reversa (diretamente proporcional à concentração de acetonitrila) pode ser observada uma diferença significativa entre as espécies estudadas, principalmente entre *P. tomopterna* (Amazônica) e as outras duas espécies (presentes na região de Mata Atlântica). Esses dados refletem diferenças entre as hidrofobicidades existentes entre os peptídeos detectados nas espécies, consequência direta da estrutura primária desses peptídeos (Figuras. 7 e 8).

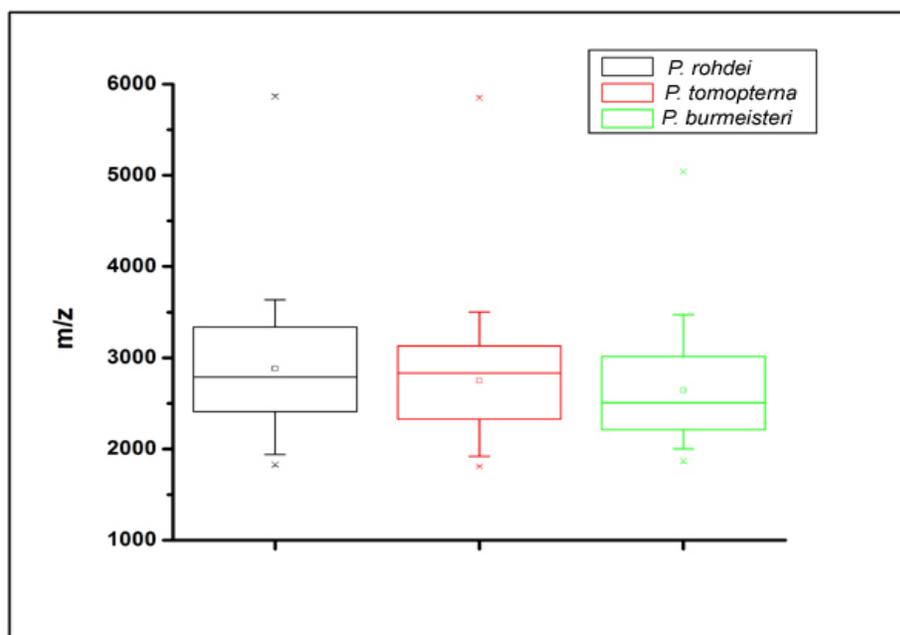


Figura. 6. Gráfico de caixa da distribuição de moléculas baseadas na razão m/z. Dados obtidos a partir de análise utilizando espectrômetro de massa MALDI TOF/TOF. O intervalo utilizado foi de 1800 m/z a 6000 m/z. As marcações (x) indicam os pontos máximos e mínimos encontrados nessa faixa de íons. Dentro do retângulo a linha representa a mediana e o quadrado o valor médio dos íons detectados para cada espécie. O espaço acima dessa mediana representa a faixa na qual estão contidos 75% dos íons e abaixo dessa linha aqueles contidos nos 25% restantes.

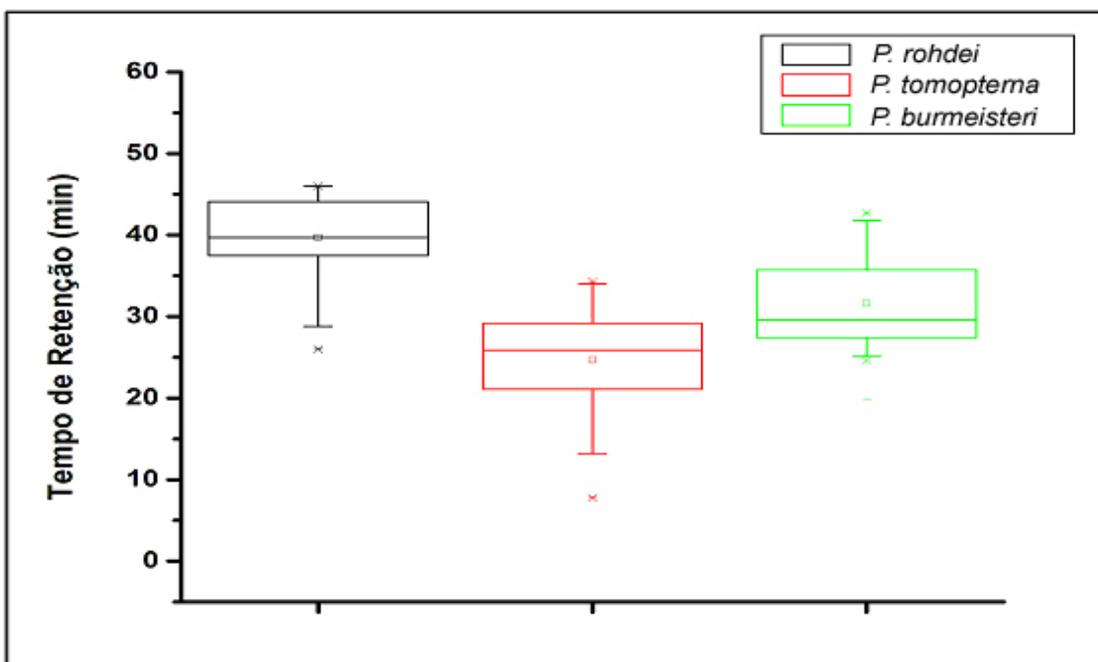


Figura. 7. Gráfico de caixa da distribuição de moléculas de acordo com tempo de retenção. Componentes moleculares foram detectados por HPLC no intervalo de 1800 m/z a 6000 m/z. As marcações (x) indicam os pontos máximos e mínimos encontrados nessa faixa de íons. Dentro do retângulo a linha representa a mediana e o quadrado o valor médio dos íons detectados para cada espécie. O espaço acima dessa mediana representa a faixa na qual estão contidos 75% dos íons e abaixo dessa linha os contidos nos 25% restantes.

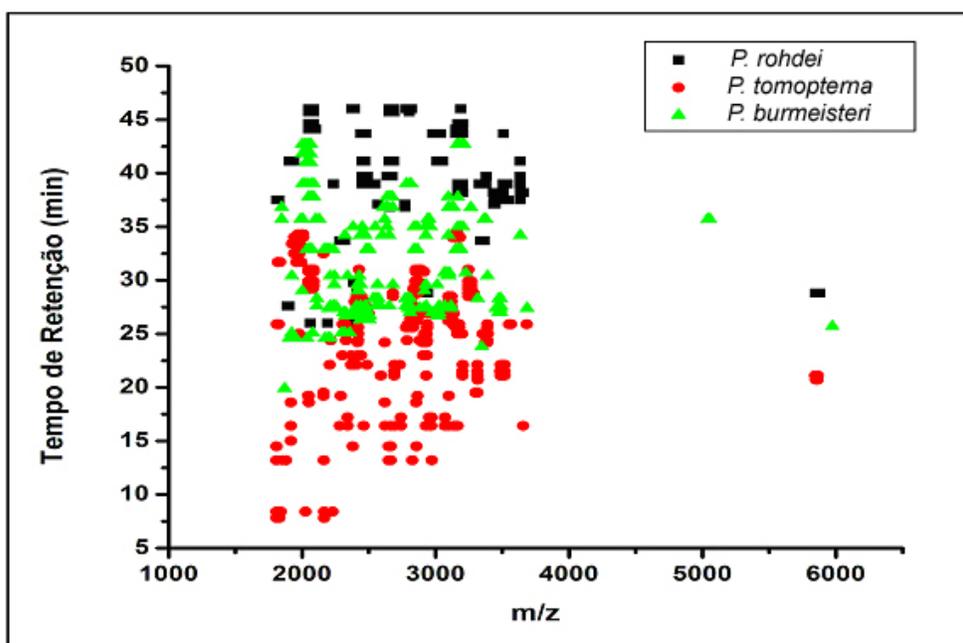


Figura. 8. Distribuição de íons detectados em relação ao tempo de retenção obtido em HPLC de fase reversa. Intervalo utilizado de 1800 m/z a 6000 m/z.

Etapas posteriores de purificação do extrato total de *P. burmeisteri*, *P. rohdei* e *P. tomopterna* com a utilização de colunas analíticas acopladas a um sistema RP-HPLC permitiram o isolamento de moléculas com perfil de hidrofobicidade e razão m/z entre o intervalo de massa no qual se encontram as dermaseptinas e filoseptinas já identificadas (Figuras. 6 a 8). Vários análogos pertencentes à família das dermaseptinas, filoseptinas, hiposinas e dermatoxinas foram identificados. Juntamente, foram encontradas novas moléculas no extrato de *P. tomopterna* que mostram significativa similaridade com a família das filoseptinas. Também foram encontradas várias moléculas já descritas anteriormente em outras espécies de filomedusídeos

DRT12 e DRT15, dermaseptinas já caracterizadas por Prates e colaboradores, 1999, também foram purificadas a partir do extrato total de *P. tarsius*, com o objetivo de comparar a atividade de tais moléculas com peptídeos identificados nas outras espécies.

2. Seqüenciamento de peptídeos e alinhamento

Os íons precursores de possíveis filoseptinas e dermaseptinas foram então fragmentados (MALDI TOF/TOF MS/MS) como descrito no material e métodos para interpretação de suas estruturas primárias por meio de seqüenciamento *de novo* (Figuras. 10, 13 e 15).

As moléculas encontradas apresentaram em sua estrutura de 19 a 33 resíduos de aminoácidos contendo resíduos hidrofóbicos e positivamente carregados assim como um ponto isoelétrico alto, sendo essas características importantes para uma possível atividade antimicrobiana (Tabelas 1 e 2). A partir da obtenção de estruturas primárias foi feita uma busca por similaridades utilizando o programa Fasta3. As moléculas identificadas mostraram alta similaridade e identidade com filoseptinas e dermaseptinas já descritas em outros hilídeos do mesmo gênero.

A partir do alinhamento com os análogos de dermaseptinas encontradas em outros phyllomedusídeos e as encontradas nas espécies estudadas é possível identificar que a região C-terminal desses peptídeos é altamente conservada mesmo considerando a variação de tamanho (24-33 resíduos de aminoácidos) entre os peptídeos alinhados. Ao contrário do N-terminal (altamente variável nessa família de peptídeos) que parece estar ligado à atividade antimicrobiana das dermaseptinas, a característica conservada do C-terminal não está ligada ao espectro de ação dessas moléculas (Mor *et al*, 1994) (Tabelas 1 e 3). É interessante ressaltar que vários análogos encontrados em diferentes espécies possuem massas moleculares similares apesar de possuírem estruturas primárias bem diversas (Figura 16- C-E).

As filoseptinas, por sua vez, apresentaram maior variação no C-terminal, mantendo resíduos de aminoácidos altamente conservados na região N-terminal, sendo que entre essas moléculas é observada uma identidade maior de resíduos quando comparado ao grupo das dermaseptinas.

Os peptídeos identificados nesse trabalho apresentam uma grande quantidade de resíduos isóbaros (K/Q e I/L). Para evitar tais ambigüidades foi utilizada degradação de Edman, que permitiu esta diferenciação (Tabela 1) (Figuras 9-15). Nos casos em que não foi possível a utilização dessa metodologia, principalmente em virtude das baixas concentrações de determinadas moléculas no extrato total das espécies estudadas, resíduos isóbaros foram apenas sugeridos com base em informações de homologia após consulta em bancos de dados de estruturas gênicas e proteômicas, e ainda carecem de confirmação.

Tabela 1. Peptídeos cuja estrutura primária foi obtida a partir de degradação de Edman. Presença da amidação C- terminal é determinada pela diferença entre as massas experimentais e teóricas. Tempo de retenção obtido em sistema HPLC utilizando uma coluna Vydac C18 semi-preparativa em um gradiente linear de 5 a 95%

Peptídeo	Seqüência	Massa	Massa	PI	Tempo de Retenção
		Experimental	Teórica		
PS 08	FLSLIPHAINAVSALAKHF-NH2	2048.53	2049.16	12.10	37.9
Dstomo01	ALWKDLLKNVGIAAGKAVLNKVTDMVNQ	3009.54	3009.69	9.20	35.3
DD L	ALWKTLKKNVGKAAGKAALNAVTDMMVNQ-NH2	2924.81	2925.63	9.50	34.6

O análogo de hiposina identificado em *P. rohdei* teve sua seqüência deduzida a partir de cDNA (dados não apresentados) após identificação por meio de espectrometria de massa. Essa molécula apresentou altos índices de similaridade e identidade com outras hiposinas já descritas (81% de identidade com hiposina 3, de *P. azurea*) sendo denominada hiposina 6 (Tabela 2).

Tabela 2. Peptídeo cuja estrutura primária foi obtida a partir de cDNA. Presença da amidação C- terminal é determinada pela diferença entre as massas experimentais e teóricas. **PI.** Ponto isoelétrico teórico.

Peptídeo	Seqüência	Massa	Massa Teórica	PI
		Experimental		
Hiposina 6	FRPAILVRTKKGKGL-NH2	1555.13	1555.97	9.90

As tabelas 3 e 4 apresentam os demais análogos de dermaseptinas e filoseptinas encontrados na secreção de *P. burmeisteri*, *P. rohdei* e *P. tomopterna*. A determinação de amidação, uma modificação pós-traducional comum em PAMs, foi feita a partir da diferença entre as massas teórica e experimental (1 Da) e mediante avaliação dos espectros de MS/MS (Figura 16- A e B).

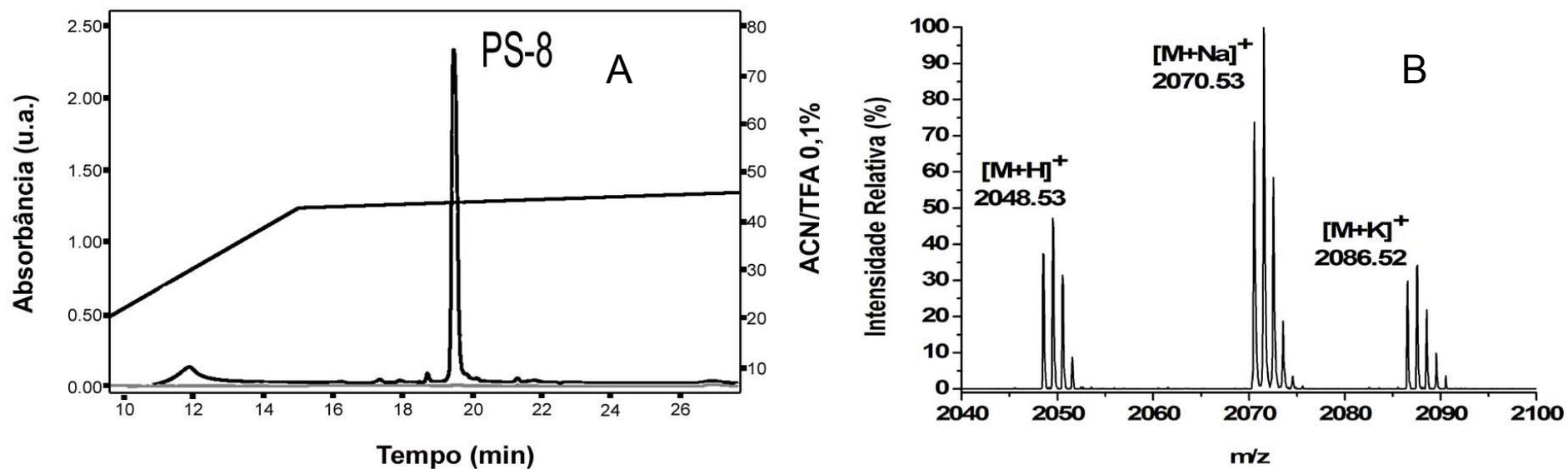


Figura 9. Purificação da PSburm 08 (PS 08). A. Etapa final de purificação da PSburm 08 (PS 08) em um sistema RP-HPLC utilizando coluna 218TP54 (Vydac, C₁₈, 4 x 250 mm, 300 Å, Hesperia, USA). Frações cromatográficas foram monitoradas em 216 (linha preta) e 280 (linha cinza) nm. B. Espectro de MALDI-TOF/MS mostrando a massa molecular da PSburm 08 (PS 08) e seus adutos de sódio e potássio.

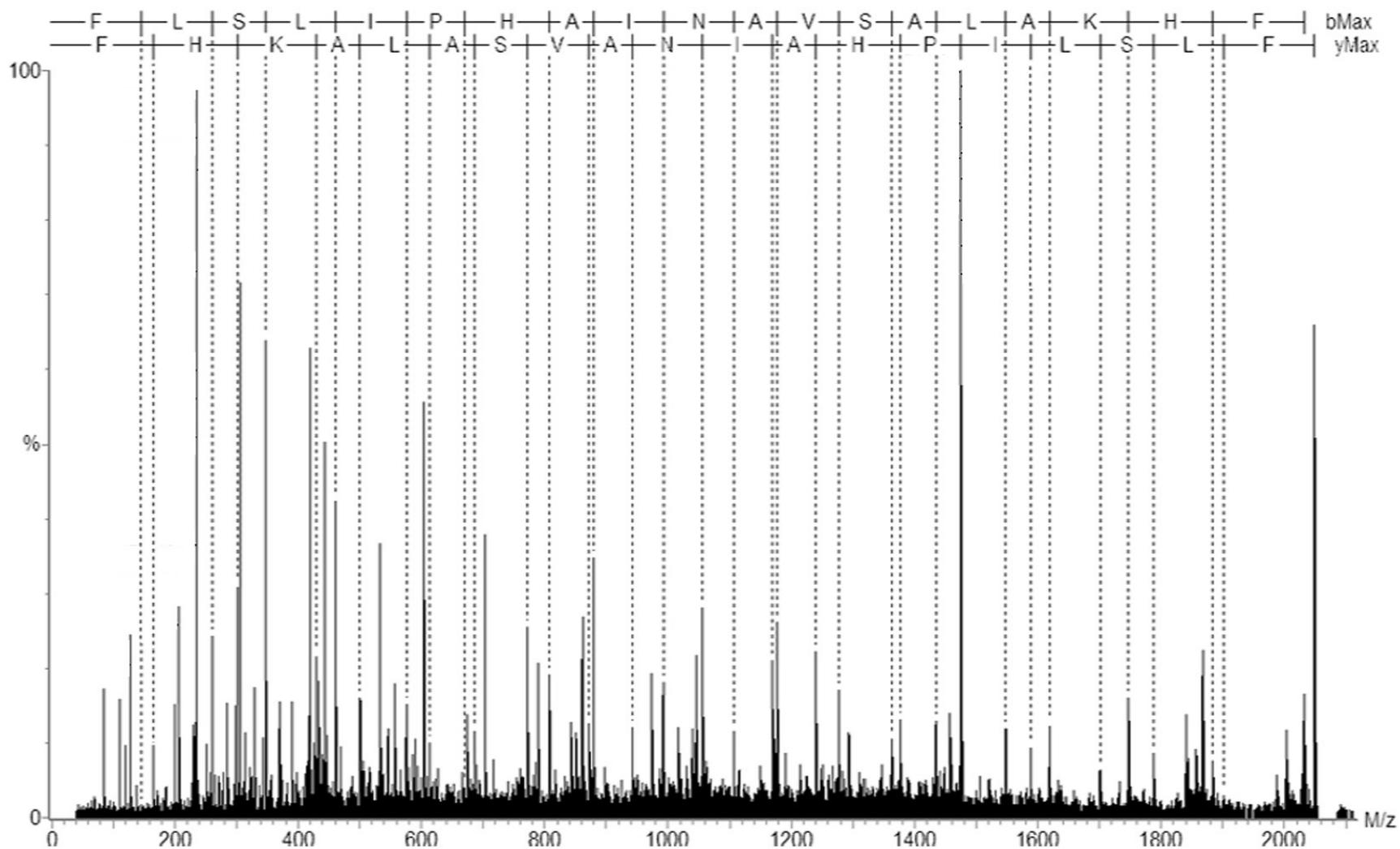


Figura 10. Seqüenciamento *de novo* da PSburn 08 (PS 08). Seqüenciamento de $[M+H]^+$ = 2048,53 em um espectrômetro de massa MALDI TOF/TOF. Séries y e b estão assinaladas no topo. Íons não assinalados constituem outras séries, fragmentos internos ou imônios.

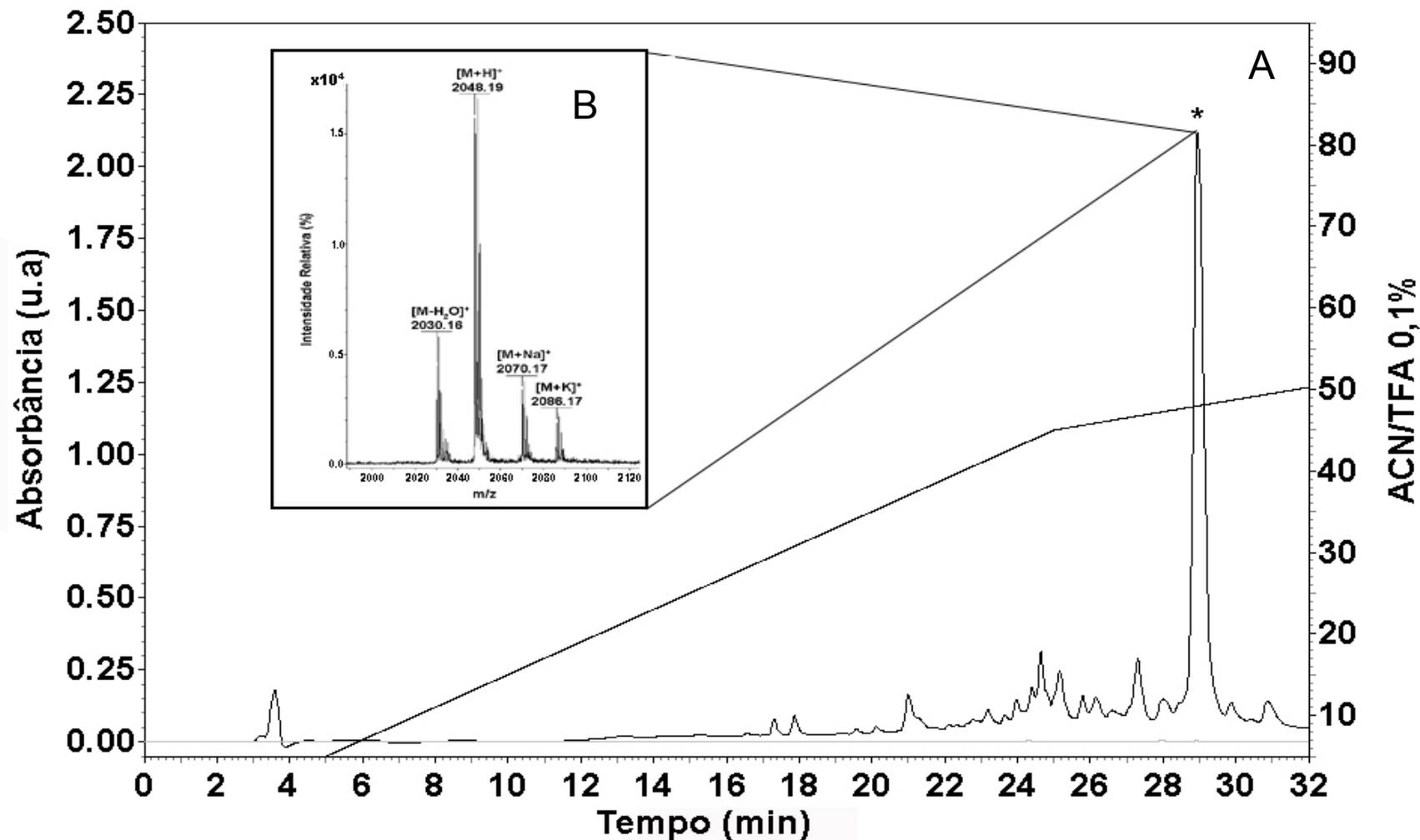


Figura 11. Purificação da PS 08 sintético. A. Purificação da PS 08 sintética em um sistema RP-HPLC utilizando coluna semi-preparativa 218TP510 (Vydac, C_{18} , 10x250 mm, 300 Å, Hesperia, USA). Frações cromatográficas foram monitoradas em 216 (linha preta) e 280 (linha cinza) nm. B. Espectro de MALDI-TOF/MS mostrando a massa molecular da PS 08 sintética e seus adutos de sódio e potássio. *. Fração contendo PS 08 sintética pura.

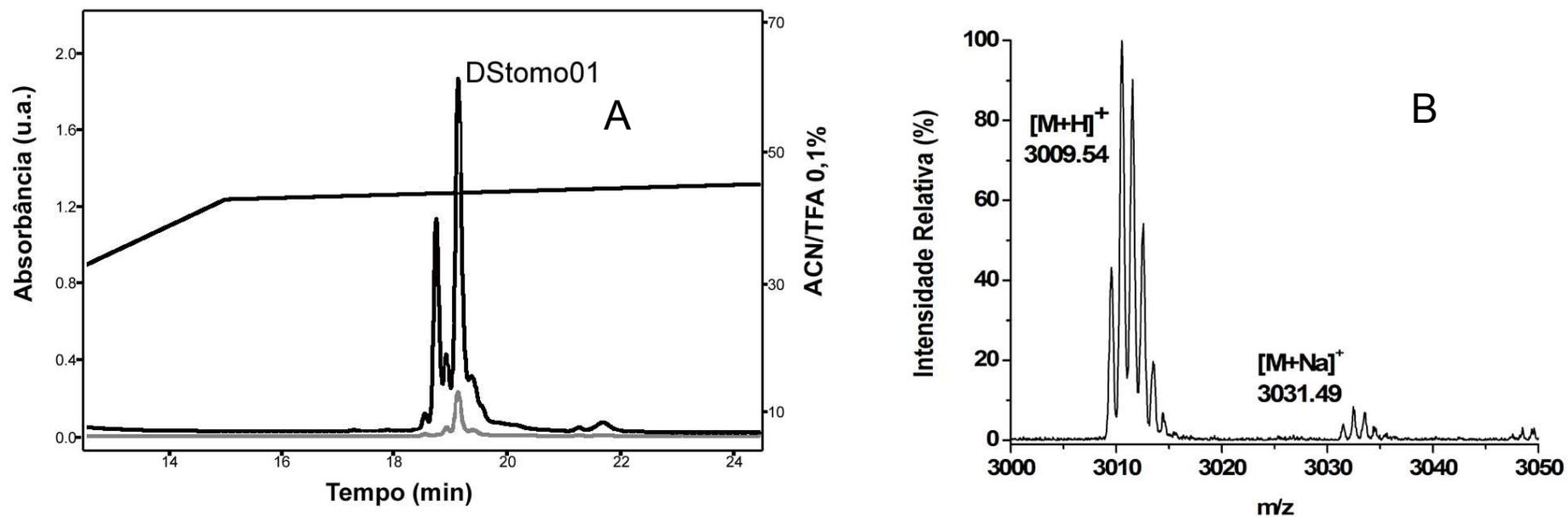


Figura 12. Purificação da DStomo 01. **A.** Etapa final de purificação da DStomo 01 em um sistema RP-HPLC utilizando coluna SOURCETM (Amersham, 5rpc st4.6/150 Pharmacia Biotech, AB). Frações cromatográficas foram monitoradas em 216 (linha preta) e 280 (linha cinza) nm. **B.** Espectro de MALDI-TOF/MS mostrando a massa molecular da DStomo 01 e seu aduto de sódio.

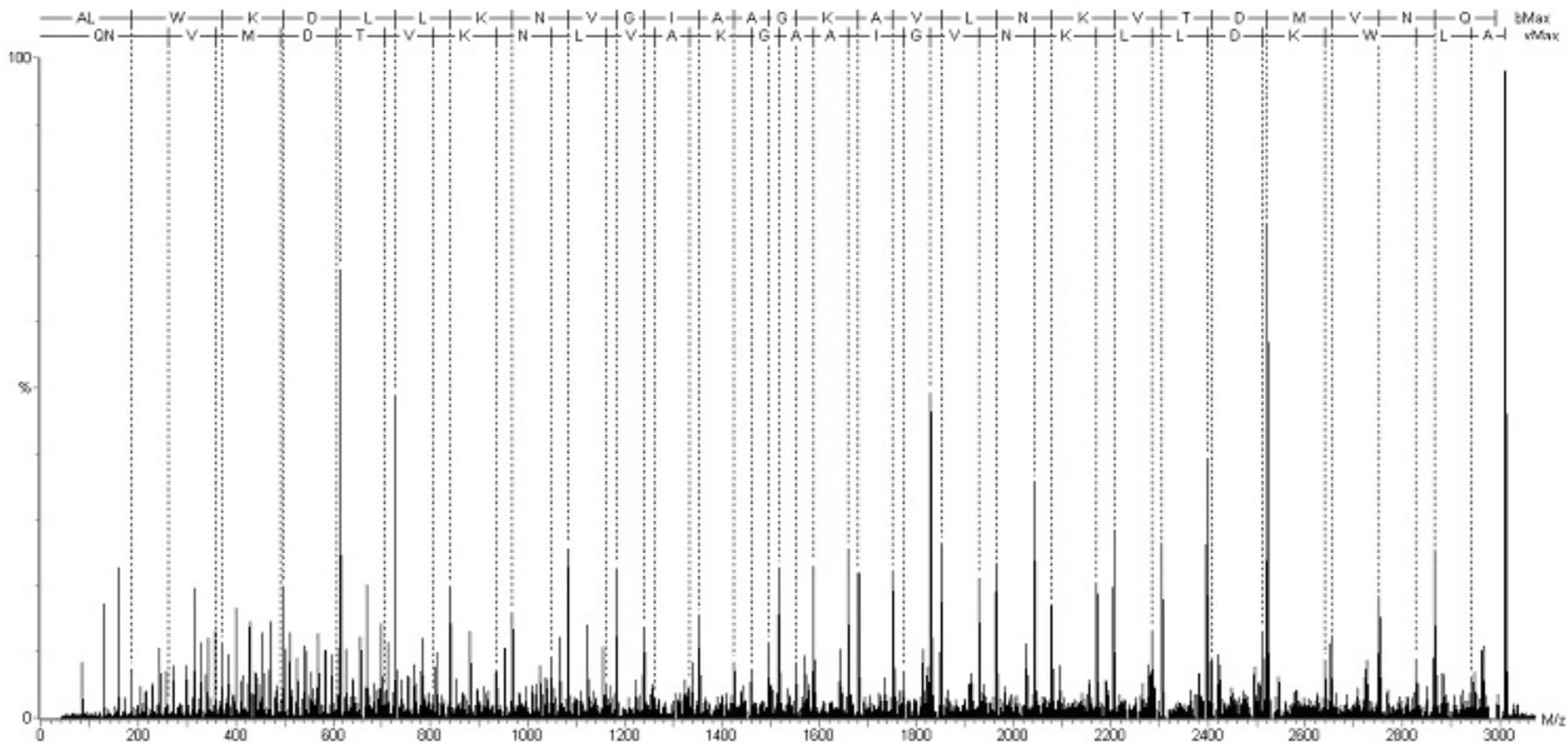


Figura 13. Seqüenciamento *de novo* da DStomo 01. Seqüenciamento de $[M+H]^+ = 3009,54$ em um espectrômetro de massa MALDI TOF/TOF. Séries y e b estão assinaladas no topo. Íons não assinalados constituem outras séries, fragmentos internos ou imônios.

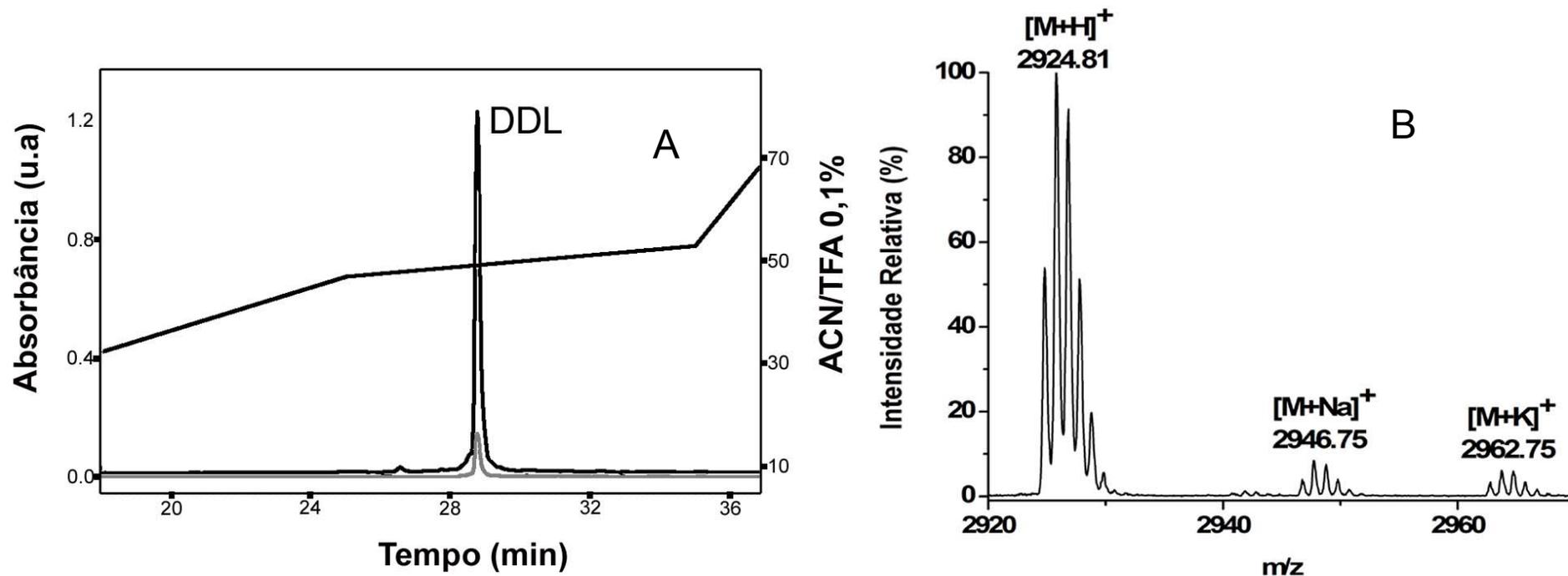


Figura 14. Purificação da DSburn 10 (DD L). A. Etapa final de purificação da DSburn10 (DD L) em um sistema RP-HPLC utilizando coluna SOURCETM (Amersham, 5rpc st4.6/150 Pharmacia Biotech, AB). Frações cromatográficas foram monitoradas em 216 e 280 nm. B. Espectro de MALDI-TOF/MS mostrando a massa molecular da DSburn10 (DD L) e seus adutos de sódio e potássio.

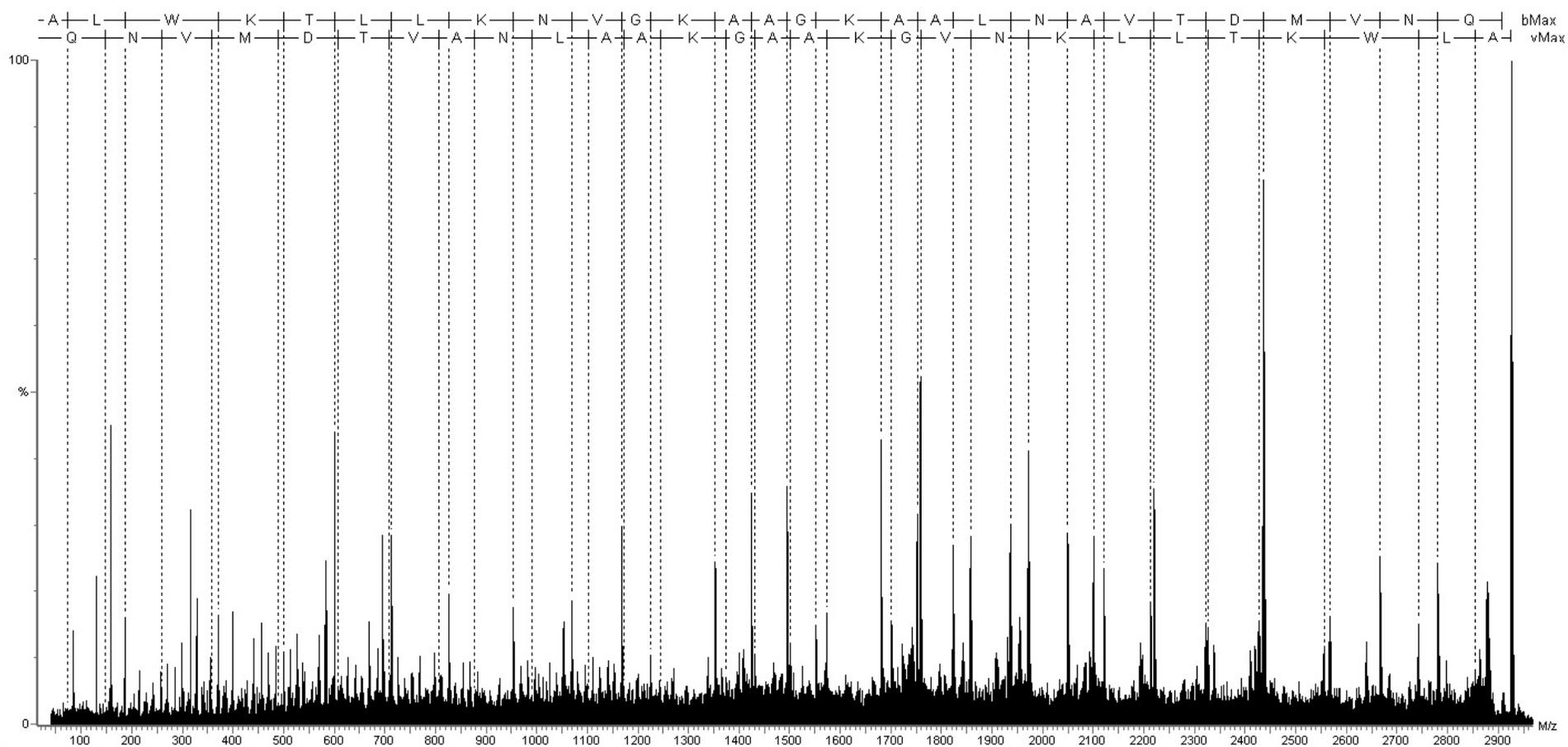


Figura 15. Seqüenciamento *de novo* da DSburn 10 (DD L). Seqüenciamento de $[M+H]^+ = 2924,81$ em um espectrômetro de massa MALDI TOF/TOF. Séries y e b estão assinaladas no topo. Íons não assinalados constituem outras séries, fragmentos internos ou imônios.

Tabela 3. Dermaseptinas encontradas em *P. burmeisteri*, *P. rohdei* e *P. tomopterna*. Tempo de retenção obtido em sistema HPLC utilizando uma coluna Vydac C18 semi-preparativa em um gradiente linear de 5 a 95% de ACN/TFA 0,1%.

Peptídeo	Seqüência	Massa	Modificação	Técnica	Tempo de Retenção
		Experimental	Pós-Traducional		
DSburm01	ALWKDILKNAGKAALNEINQLVNA	2606,3	Amidação C-terminal/-	MS/MS	36,0
DSburm02	GLWSKIKEAAKTAGKMALGFVNDMA	2636,2	Amidação C-terminal	MS/MS	34,6
DSburm03	ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLVGA	2779,4	-	MS/MS	38,4
DSburm04	GLWSKIKEAGKAALTAAGKAAALGAVSEAV	2838,3	Amidação C-terminal	MS/MS	34,5
DSburm05	ALWKTLLKNVGKAAGKAVLNAVTDMMVQ	2953,3	-	MS/MS	36,3
DSburm06	GLFKTLIKGAGKVLGHVAKQFLGSQQQPES	3096,2	-	MS/MS e Edman	36,0
DSburm07	ALWKTMLKKLGTVALHAGKAALGAAADTISQ	3135,2	Amidação C-terminal	MS/MS	36,3
DSburm08	GLWSKIKAAAGKEAAKAAKAAGKAALNAVSEAV	3152,5	-	MS/MS	34,6
DSburm09	ALWKSLLKGAGKMIGHVAKQFLGSQQQPES	3165,9	Amidação C-terminal/-	MS/MS	34,5
DSroh01	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAAFAL	2443,6	Amidação C-terminal	MS/MS	37,7
DSroh02	GLWSKIKEVVGKEAAIAAGKAALGAL	2451,1	Amidação C-terminal	MS/MS	39,0
DSroh03	GLWSKIKEAAKTAGKMALGFVNDMA	2636,9	Amidação C-terminal	MS/MS	-
DSroh05	ALWKDLLKNVGIAGKAVLNKVTDMVQ	3009,8	-	MS/MS	41,1
DSroh06	ALWKDILKKIGTVALHAGKAAFAGAAADTISQ	3165,3	Amidação C-terminal/-	MS/MS	44,6
DStomo02	GLWSKIKQVGKEAAIAAGKAALGAL	2450,8	Amidação C-terminal	MS/MS	33,4
DStomo03	GLWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLL	2651,1	Amidação C-terminal	MS/MS	37,4
DStomo04	GLWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLLGA	2780,2	-	MS/MS	37,4
DStomo05	ALWKDLLKKIGTVALHAGKAAFAGAAADTISQ	3165,5	Amidação C-terminal/-	MS/MS	37,9
DStomo06	ALWKTLLKGAGKVNGHVAKQFLGSQQQPES	3221,6	-	MS/MS	34,7

Tabela 4. Filoseptinas e dermatoxinas encontradas em *P. burmeisteri*, *P. rohdei* e *P. tomopterna*. Tempo de retenção obtido em sistema HPLC utilizando uma coluna Vydac C18 semi-preparativa em um gradiente linear de 5 a 95% de ACN/TFA 0,1%.

Peptídeo	Seqüência	Massa	Modificação Pós-	Técnica	Tempo de Retenção
		Experimental	Traducional		
PSburm01	SLIPHIASGLASLVKNF	1766,2	Amidação C-terminal	MS/MS	37,6
PSburm02	FLSLIPHIVSGVAALANHL	1971,4	Amidação C-terminal	MS/MS	37,6
PSburm03	FLSLIPHIASGLASLVSKF	1999,4	Amidação C-terminal	MS/MS	42,1
PSburm04	FLSMIPHIVSGVAALAKHL	2003,3	Amidação C-terminal	MS/MS	37,6
PSburm05	FLSLIPHAINAVSAIAKHN	2015,4	Amidação C-terminal	MS/MS	36,3
PSburm06	FLSLIPHIASGLASLVKNF	2026,4	Amidação C-terminal	MS/MS	38,7
DTburm01	GWMSKIASGIGTFLSGVQQ	1966,2	Amidação C-terminal	MS/MS	35,1
PSroh01	FLSLLPGLVSGAVSLVKKL	1940,5	Amidação C-terminal	MS/MS	41,1
PSroh02	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	2048,1	Amidação C-terminal	MS/MS	39,7
PStomo01	SLIPHIANAVSAIAKHF	1788,3	Amidação C-terminal	MS/MS	37,9
PStomo02	LSLIPHALNAVSAIAKHF	1901,5	Amidação C-terminal	MS/MS	36,9
PStomo03	FLSLLPHAINAVSAIAKH	1902,5	-	MS/MS	37,9
PLtomo01	LLGLLPSLLSGAVNLVKK	1835,4	-	MS/MS	35,8
PLtomo02	LLGLLPSIVSGALKLVKK	1849,2	-	MS/MS	35,3
PLtomo03	LLGILPSIVSVFKK	1514,3	-	MS/MS	37,9
PLtomo04	LLGLLPSIVSLVKKL	1592,4	Amidação C-terminal	MS/MS	28,8

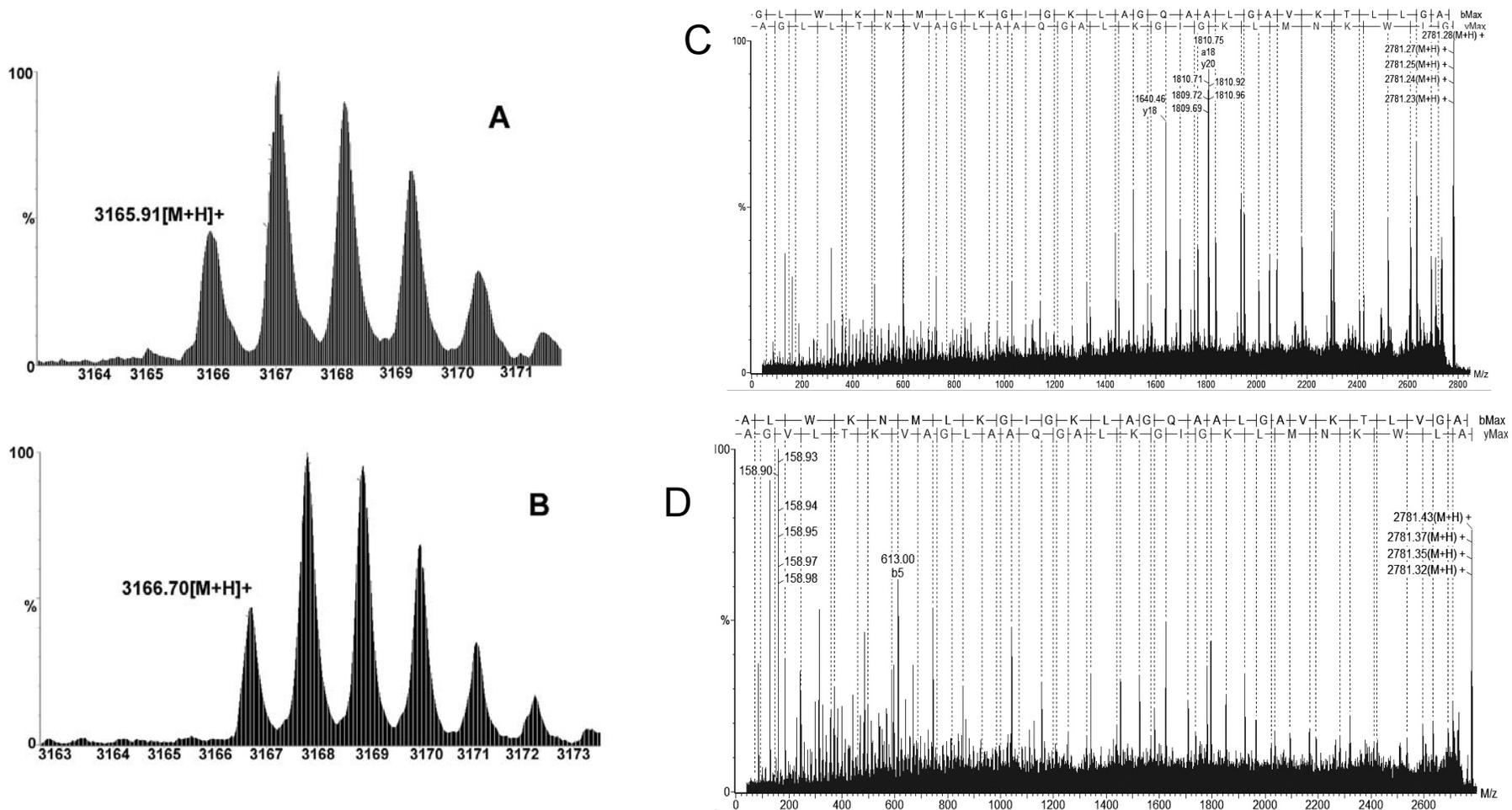


Figura 16. A e B. MALDI TOF/MS mostrando os íons da DSburn 09. A diferença de aproximadamente 1 Da entre os precursores indica a presença das formas amidada e não-amidada de DSburn 09. **C, D** Seqüenciamento *de novo* de 2 moléculas com massas similares das 3 espécies analisadas em um espectrômetro MALDI TOF/TOF. C. [M+H]⁺ = 2779,4 de *P. burmeisteri*. D. [M+H]⁺ = 2780,2 de *P. tomopterna*. Séries y e b estão assinaladas no topo. Íons não assinalados constituem outras séries, fragmentos internos ou imônios.

3. Prospecção de potenciais peptídeos antimicrobianos

Após seqüenciamento e alinhamento dos peptídeos identificados com seqüências depositadas em bancos de dados, os novos análogos encontrados foram inseridos nas famílias de PAMs produzidos por filomedusídeos.

Foram identificados um total de 40 peptídeos pertencentes a 4 famílias de PAMs já descritos em filomedusídeos (dermaseptinas, filoseptinas, hiposinas e dermatoxinas) (Tabelas 1,2,3 e 4). Considerando as seqüências depositadas em banco de dados, o total de moléculas encontradas na secreção de *P. burmeisteri*, *P. rohdei* e *P. tomopterna* possibilitou um aumento de 33,3% no número de análogos de PAMs conhecidos de anfíbios da subfamília *Phyllomedusinae* (Figura 17-E).

Nos casos de dermaseptinas e filoseptinas, as famílias mais numerosas de PAMs dessa subfamília, o número de análogos encontrados foi de 22 e 16, respectivamente. Em termos do total de moléculas conhecidas representam 27% e 50% (Figura 17-B e D)

Quanto às dermatoxinas e hiposinas, a contribuição também foi relevante, elevando a quantidade de análogos descritos em 25% e 16% nas duas famílias (Figura 17-A e C)

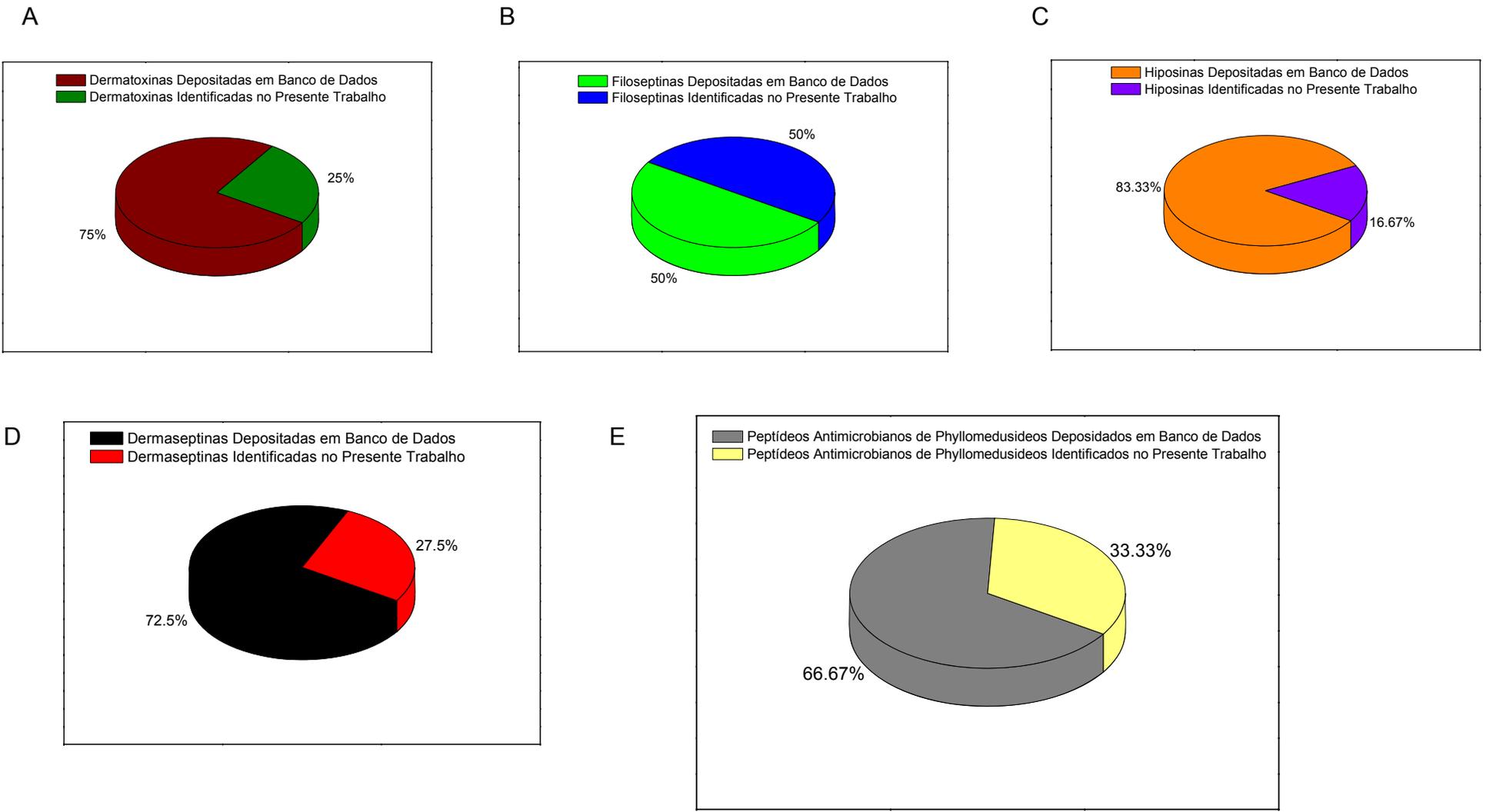


Figura 17. Comparação da quantidade de peptídeos depositados em banco de dados e peptídeos identificados no presente trabalho. A. Dermatoxinas. B. Filoseptinas. C. Hiposinas. D. Dermaseptinas. E. Peptídeos Antimicrobianos de filomedusídeos

4. Atividade biológica

A filoseptina 08 (PS 08) foi sintetizada e testada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, patógenos de humanos e de plantas (Figura 11). Os resultados mostraram que PS 08 demonstrou ter uma maior atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas, principalmente *S. aureus* (Figura 19- C). Já contra *P. aeruginosa* e *E.coli*, PS 08 não demonstrou atividade relevante (Figura 19- A e B). Em concentrações próximas ao MIC obtido contra *S. aureus*, PS 08 possui uma alta atividade hemolítica (90 % de hemólise na concentração 256 µg/mL) (Tabela 6).

As dermaseptinas DRT 12 e DRT 15 por sua vez apresentaram atividade tanto contra cepas Gram-positivas quanto Gram-negativas. Essa atividade foi verificada contra bactérias fitopatogênicas *X. citrii* e contra patógenos humanos *S. aureus* e *E. coli* (Figuras 18- A e 19- A e C). Estes dados corroboram com o papel das dermaseptinas como antimicrobianos potentes e de amplo espectro de ação. DRT 12 demonstrou atividade em concentrações micromolares contra *X. citrii* e manteve essa ação em concentrações maiores do que o MIC (Figura 18- A). Em contraste, DRT 15 mostrou uma perda na atividade inibitória em concentrações superiores aos MICs estabelecidos contra *E. coli* e *S. aureus* (Figura 19- A e C).

A hiposina 6, apesar de sua similaridade com outras famílias de PAMs, não apresentou atividade relevante contra nenhuma das cepas bacterianas testadas. Atividade hemolítica também não foi relevante para essa molécula (Tabela 6 e Figuras 18- A e 19- A-C).

A ação conjunta da hiposina 6 com PS 8 foi testada contra *X. citrii*. A obtenção do mesmo valor do MIC para as duas moléculas juntas (1:1, mol:mol) e da PS 8 apenas indica uma possível ação sinérgica entre esses dois peptídeos (Figura 18- C) já que seria esperada somente a atividade da PS 8.

As atividades obtidas contra patógenos humanos foram comparadas às atividades determinadas para os antibióticos convencionais ampicilina e cloranfenicol, com os MICs determinados para esses antibióticos juntamente com os MICs dos peptídeos testados sendo os mesmos descritos na tabela 5.

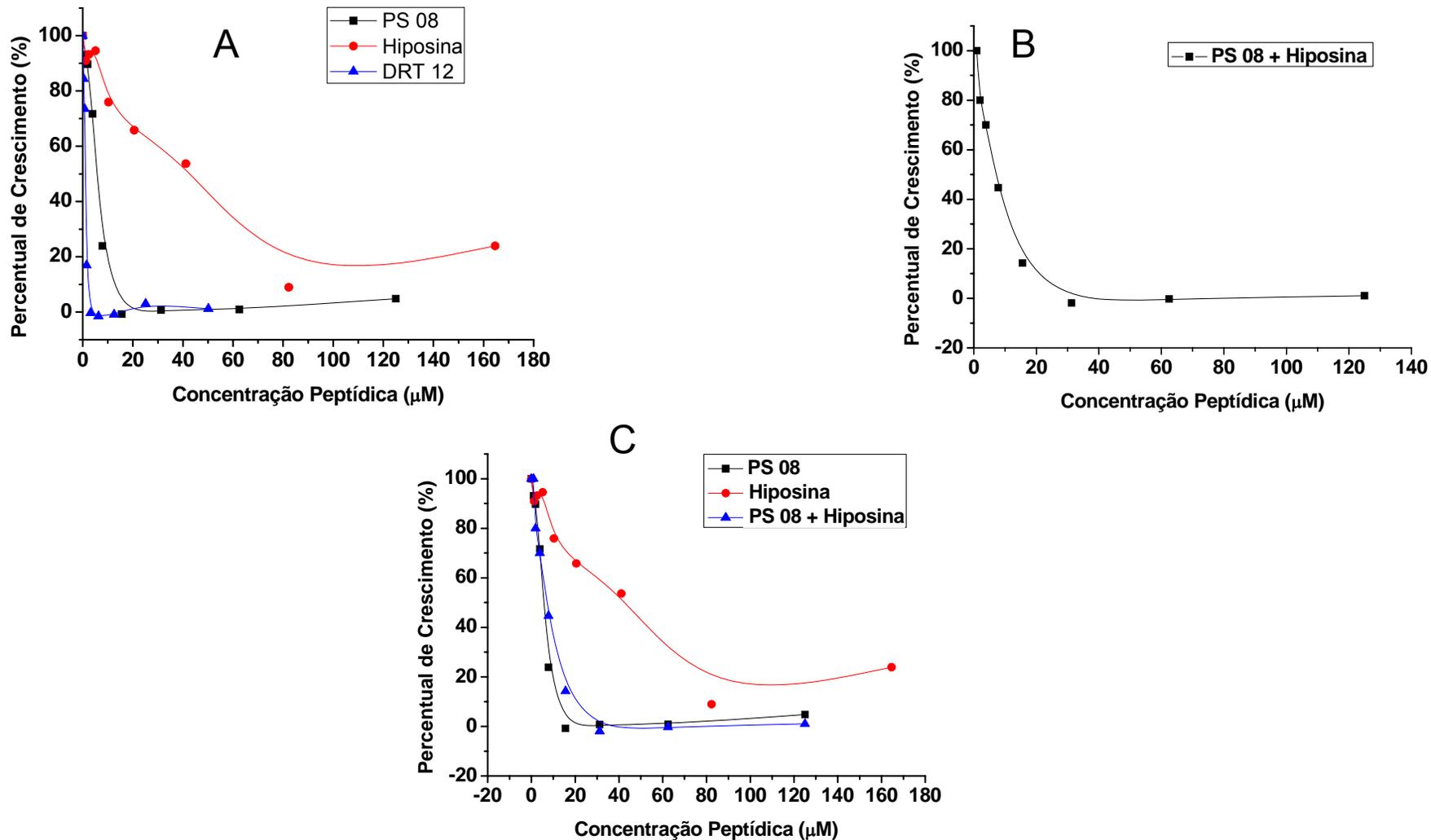


Figura 18. Bioensaios contra *X. citrii*. **A.** Atividade antimicrobiana da PS 08, Hiposina e DRT 12 contra *X. citrii*. **B.** Atividade antimicrobiana de quantidades equimolares de PS 08+Hiposina contra *X. citrii*. **C.** Comparação entre atividade da PS 08, hiposina e as duas combinadas.

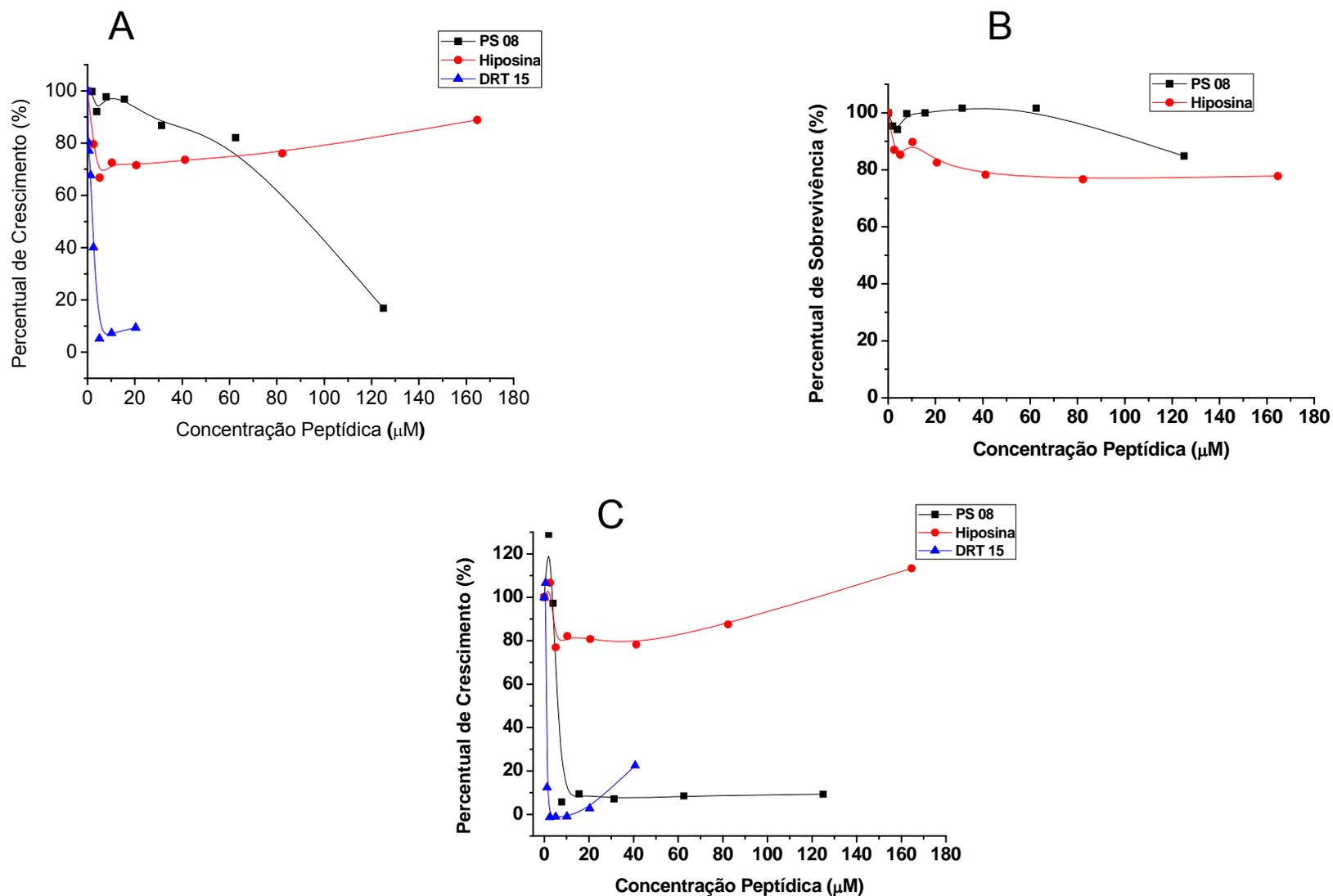


Figura 19. Bioensaios contra *E.coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. A. Atividade antimicrobiana da PS 08, Hiposina e DRT 15 contra *E. coli*. **B.** Atividade antimicrobiana de PS 08 e Hiposina contra *P. aeruginosa*. **C.** Atividade antimicrobiana de PS 08, Hiposina e DRT15 contra *S. aureus*.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos peptídeos testados. A concentração mínima inibitória (MIC) foi determinada com 100% de inibição de crescimento microbiano. Valores entre parênteses são concentrações que inibiram 80% do crescimento. SM. Sem determinação de MIC. (-). Não testado.

Bactéria	MIC (µM)						
	PS 08	Hiposina	PS 08+Hiposina	DRT12	DRT15	Ampicilina	Cloranfenicol
<i>X. citrii</i>	16	SM(82)	31(16)	3	-	-	-
<i>E. coli</i>	SM(125)	SM	-	-	5	46	395
<i>S. aureus</i>	8	SM	-	-	1	<11	25
<i>P. aeruginosa</i>	SM	SM	-	-	-	SM	25

Tabela 6. Atividade hemolítica da PS 08 e Hiposina 6. Porcentagem de hemólise causada por essas duas moléculas em eritrócitos humanos obtidos a partir de sangue fresco O positivo.

	32µg/mL	256µg/mL
PS 08	24%	90%
Hiposina	10%	8%

Discussão

Secreções glandulares de anfíbios são ricas em diversos componentes com várias funções farmacológicas. Assim como uma grande quantidade de análogos de hormônios de mamíferos, diversos peptídeos com atividade antimicrobiana são encontrados na secreção desses animais. Filomedusídeos são animais pertencentes à família Hylidae, subfamília Phyllomedusinae. Esta subfamília vem demonstrando cada vez mais a sua importância como fontes de peptídeos farmacologicamente ativos, principalmente PAMs (Mor *et al.*, 1991; Brand *et al.*, 2002; 2006a; Leite *et al.*, 2005).

A expressão, produção e acúmulo de peptídeos com atividade antimicrobiana apesar de se extremamente conservada nos mais diferentes grupos animais apresenta uma enorme variedade qualitativa quanto aos peptídeos encontrados em cada espécie. Na subfamília Phyllomedusinae, a comparação entre os perfis obtidos em cromatografias em sistemas RP-HPLC mostra a expressão de populações de moléculas distintas nas diferentes espécies desse grupo (Figura 5). Essa diferença é constatada nas características físico-químicas das moléculas encontradas nesses perfis, as quais são reflexo direto das diferenças de estrutura primária desses análogos

O presente trabalho relata a descoberta de vários peptídeos pertencentes às famílias de dermaseptinas e filoseptinas, as quais são moléculas com comprovada atividade antimicrobiana e antiviral (Mor *et al.*, 1991; Krugliack *et al.*, 2000; Lorin *et al.*, 2005; Brand *et al.*, 2005). Assim como outros filomedusídeos, *P. burmeisteri*, *P. tomopterna* e *P. rohdei* apresentaram inúmeros análogos destas famílias de antimicrobianos (Wechselberger, 1998; Leite *et al.*, 2006; Amiche *et al.*, 2008) (Tabelas 3 e 4).

Os 40 análogos identificados no presente estudo contribuem para um aumento significativo no conhecimento sobre a variabilidade existente dentro das famílias de antimicrobianos produzidos por esses anfíbios. No caso de filoseptinas a quantidade de seqüências conhecidas aumentou em 100% (Figura 16- B). A contribuição para as outras famílias (dermaseptinas, dematoxinas e hiposinas) também foi significativa, adicionando ao todo, 33% a mais de estruturas primárias caracterizadas (Figura 16- E). O aumento no número de análogos conhecidos certamente

contribuirá para o melhor entendimento das características físico-químicas que regem a atividade antimicrobiana bem como a atividade hemolítica dos mesmos.

A identificação de análogos de dermaseptinas e filoseptinas em todas as espécies estudadas comprova que essas famílias de peptídeos são amplamente distribuídas em todo o grupo de filomedusídeos (Amiche *et al.*, 2008). É importante ressaltar que tais análogos apresentaram altos índices de similaridades com outros peptídeos já descritos em outras espécies do gênero *Phyllomedusa*, sendo que alguns peptídeos idênticos aos já descritos foram encontrados nas espécies estudadas no presente trabalho, como a DD L, encontrada em *P. distincta* (Batista *et al.*, 1999).

Os níveis de similaridade e alinhamentos entre os peptídeos identificados e os encontrados em outras espécies dessa subfamília, corroboram para a existência de um ancestral comum para esse grupo de moléculas tal como sugerido a partir da análise dos precursores desses peptídeos (Duda *et al.*, 2002; Vanhoye *et al.*, 2003). A existência de mutações, inversões, inserções e deleções, mesmo que pontuais, podem contribuir para traçar relações de parentesco entre grupos de moléculas e talvez entre as espécies de anfíbios que as produzem.

Os anfíbios estudados são distribuídos em regiões específicas do Brasil, sendo *P. tomopterna* e *P. tarsi* encontrados em regiões de floresta amazônica (norte do país) e *P. burmeisteri* e *P. rohdei* espécies endêmicas de mata atlântica (sudeste do país). A comparação das moléculas encontradas nessas espécies mostrou uma diferenciação regional quanto à quantidade de componentes moleculares detectados para certos tamanhos e hidrofobicidades. *P. tomopterna* apresentou uma concentração maior de moléculas com massa abaixo de 3000 Da quando comparada às duas espécies de Mata Atlântica. Esta diferenciação também foi observada no tempo de retenção dessas moléculas, sendo os peptídeos presentes na espécie amazônica menos hidrofóbicos (Figuras 7 e 8). Tal comparação ainda não foi feita na literatura atual sobre o tema e pode ajudar a compreender a evolução das diferenças em grupos de moléculas de interesse.

As filoseptinas e dermaseptinas identificadas foram seqüenciadas por meio de seqüenciamento *de novo* com a utilização de espectrômetros de massa do tipo MALDI TOF/TOF e ESI Q-TOF (Figuras 9 a 15). A utilização dessa metodologia, tal como em estudos anteriores, foi de extrema importância na obtenção da estrutura primária dessas moléculas, apesar da dificuldade de identificação dos diferentes resíduos isóbaros (I/L e K/Q) (Prates *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006).

Os microrganismos utilizados para testar os possíveis PAMs identificados são patógenos de extrema importância para o homem. *X. citrii* é uma bactéria fitopatogênica responsável por causar cancro cítrico em espécies de plantas do gênero *Citrus* portanto, seu controle é de extrema importância econômica. Pela primeira vez uma filoseptina (PS 08) e uma dermaseptina (DRT 12) foram testadas contra esse microrganismo e o resultado foi a inibição do crescimento em concentrações micromolares e a conseqüente descoberta de novas moléculas aparentemente capazes de conter *in vitro* a proliferação desse microrganismo de grande importância para a fruticultura nacional (Figura 18- A e B).

E. coli é causadora de infecções relacionadas ao trato digestivo, *S. aureus* pode causar doenças de pele e infecções alimentares e *P. aeruginosa* é agente causador de infecções urinárias e respiratórias. DRT15 apresentou atividade inibitória contra as duas cepas as quais foi testada (*E. coli* e *S. aureus*), ambas em concentrações micromolares (Figura 19- A e C). Essa ação acentuada somada à atividade da DRT 12 contra *X. citrii* comprova a importância de dermaseptinas no desenvolvimento de novos fármacos que atuem no controle de infecções causadas por patógenos de animais e também contra patógenos de plantas, nas quais tais moléculas poderiam ser até mesmo expressas (transgênicos) conferindo resistência a patógenos. Este resultado aumenta o espectro de ação desse grupo de moléculas, que já abrangia inclusive vírus e protozoários (Brand *et al.*, 2002; Lorin *et al.*, 2005)

A PS 8 ao contrário da PS 1 e PS 07 previamente descritas e que demonstraram atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Leite *et al.*, 2005), apresentou atividade apenas contra *X. citrii* e *S. aureus*, sendo completamente inativa contra *E. coli* e *P. aeruginosa* (Figuras 18 e 19). Adicionalmente, as PS 1, 2 e 7 não apresentam efeito hemolítico (Leite *et al.*, 2005

Conceição *et al.*, 2006) enquanto a PS 8 foi hemolítica mesmo em baixas concentrações micromolares. Esse fato poderia estar relacionado a singularidades nessas seqüências de aminoácidos, ainda que a única mudança significativa entre a PS 1 e PS 8 seja um resíduo de fenilalanina no C-terminal da PS 8 em substituição a um resíduo de asparagina. Entre PS 7 e PS 8 há apenas a substituição de um resíduo de leucina por isoleucina em PS 8, aparentemente essa substituição não deveria causar tal efeito uma vez que esses resíduos são igualmente hidrofóbicos. Estudos de caracterização estrutural e funcional desses peptídeos serão necessários para compreender essa atividade.

O aumento da concentração de DRT 15 resultou em uma diminuição da inibição do crescimento de microrganismos causada por esse peptídeo (Figura 19- A e C). A formação de agregados em virtude da hidrofobicidade de determinados peptídeos influencia em sua atividade antimicrobiana e hemolítica (Feder *et al.*, 2000). DRT 15, ao contrário da DRT 12, parece formar agregados em concentrações altas (dados não mostrados), sendo que este fato pode contribuir para uma diminuição de sua atividade inibitória em altas concentrações indicando também que DRT 15 deve possuir propriedades hemolíticas já que tem sido mostrado que esses peptídeos tendem a ser hemolíticos.

Apesar de sua similaridade com outras famílias de antimicrobianos (Thompson *et al.*, 2007), a hiposina 6, não demonstrou efeito hemolítico nem atividade inibitória contra todas as cepas testadas (Figuras 18 e 19). Isso indica um possível papel fisiológico alternativo para essa família de potenciais PAMs antes considerados bioativos contra microrganismos (Kustanovich *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2007). Estudos adicionais serão necessários para esclarecer a(s) atividade(s) biológica(s) dessa família de peptídeos.

O grande número de peptídeos com possível atividade antimicrobiana encontrado em cada espécie vai de encontro com a idéia de que tais peptídeos, apesar de apresentarem um amplo espectro de ação são muitas vezes seletivos a um determinado grupo de microrganismos, como demonstrado para dermaseptinas encontradas em *P. sauvagei* e *P. hypochondrialis* (Mor *et al.*, 1994, Brand *et al.*, 2006a). A possibilidade de uma ação sinérgica entre PAMs e uma expressão

induzida pelo contato com determinados patógenos possibilita uma defesa mais eficaz contra um maior número desses organismos (Mor *et al.*, 1994). A ação sinérgica entre peptídeos da mesma família já foi descrita anteriormente (Mor *et al.*, 1994). Peptídeos de diferentes famílias (PS 08 e Hiposina 6) também apresentaram ação conjunta contra *X. citrii*, comprovando que a diversidade entre famílias pode contribuir para um mecanismo de defesa mais eficiente e mais complexo do que o já reconhecido (Figura 18- B).

Atividade antimicrobiana foi mais uma vez demonstrada por moléculas pertencentes às famílias dermaseptina e filoseptina de peptídeos antimicrobianos (Tabela 5). Este fato juntamente com a crescente dificuldade de conter infecções rotineiras em humanos, animais e plantas aponta para um novo campo de produção de fármacos com objetivo de conter o avanço de patógenos (Morton *et al.*, 2007). A síntese química constitui uma alternativa para obtenção de quantidades moderadas desses peptídeos ainda que a sua obtenção em larga escala ainda seja bastante onerosa. Entretanto, por meio dessa metodologia é possível a realização de experimentos que permitam analisar quais parâmetros são importantes para a atividade antimicrobiana, facilitando assim o desenvolvimento de alternativas menos dispendiosas para o controle de doenças baseadas em estudos com PAMs.

Por fim, este estudo demonstra a importância de filomedusídeos como reservas naturais de peptídeos antimicrobianos. A utilização desses peptídeos como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos vem se tornando cada vez mais imprescindível no controle de doenças, tanto humanas quanto em animais e plantas. Além disso, a ampla distribuição dessas moléculas nas mais diversas famílias de anfíbios pode contribuir para elucidar a história filogenética e evolutiva do grupo bem como a de vertebrados, uma vez que a presença destas moléculas é altamente conservada nesse grupo de animais.

Conclusões

1. O presente estudo aumentou o conhecimento acerca da biodiversidade de PAMs originados de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*.
2. Filoseptinas, dermaseptinas, dermatoxinas e hiposinas são peptídeos amplamente distribuídos no gênero *Phyllomedusa*.
3. Os análogos de dermaseptinas e filoseptinas identificados possuem atividade antimicrobiana como outros peptídeos conhecidos dessas famílias
4. DRT 12 e PS 08 são análogos com atividade antimicrobiana contra *X. citrii*, um fitopatógeno.
5. A família das filoseptinas possuem pelo menos um membro com atividade hemolítica (PS 08).
6. Até agora, hiposinas não possuem atividade antimicrobiana nem hemolítica, podendo ter outra atividade biológica distinta nos anfíbios de origem.
7. A quantidade de peptídeos descritos no presente estudo aumentou de forma relevante a quantidade de peptídeos conhecidos da subfamília Phyllomedusinae depositados em bancos de dados (33%)

Referências Bibliográficas

AMICHE, M., SEON, A.A., PIERRE, T.N., NICOLAS, P. The dermaseptin precursors: a protein family with a common preproregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. **FEBS Lett.** v. 456, p. 352-6, 1999

AMICHE, M., SEON, A.A., WROBLEWSKI, H., NICOLAS, P. Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family. **Eur. J. Biochem.** v. 267, p. 4583-92, 2000.

AMICHE, M., LADRAM, A., NICOLAS, P. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily *Phyllomedusinae*. **Peptides.** *in press.*

AMMAR, B., PERIANIN, A., MOR, A., SARFATI, G., TISSOT, M., NICOLAS, P., GIROUD, J.P., ROCH-ARVEILLER, M. Dermaseptin, a peptide antibiotic, stimulates microbicidal activities of polymorphonuclear leukocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 247, p. 870-5, 1998.

BATISTA, C.V., DA SILVA, L.R., SEBBEN, A., SCALONI, A., FERRARA, L., PAIVA, G.R., OLAMENDI-PORTUGAL, T., POSSANI, L.D., BLOCH, C. Jr. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. **Peptides.** v. 20, p. 679-86, 1999.

BECHINGER, B. & LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1758, p. 1529-39. 2006.

BEVINS, C.L. & ZASLOFF, M. Peptides From Frog Skin. **Ann. Rev. Biochem.** v. 59, p. 395-414. 1990.

BRAND, G.D.; LEITE, J.R.S.A.; SILVA, L.P.; ALBUQUERQUE, S.; PRATES, M.V.; AZEVEDO, R.B.; CARREGARO, V.; SILVA, J.S.; SÁ, V.C.L.; BRANDÃO, R.A.; BLOCH JR, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 49332–40. 2002.

BRAND, G.D.; LEITE, J.R.S.A.; DE SÁ MANDEL, S.M.; MESQUITA, D.A.; SILVA, L.P.; PRATES, M.V.; BARBOSA, E.A.; VINECKY, F.; MARTINS, G.R.; GALASSO, J.H.; KUCKELHAUS, S.A.S.; SAMPAIO, R.N.R.; FURTADO JR., J.R.; ANDRADE, A.C.; BLOCH JR, C. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v. 347, p. 739-46. 2006a.

BRAND, G.D.; KRAUSE, F.C.; SILVA, L.P.; LEITE, J.R.S.A.; MELO, J.A.T.; PRATES, M.V. PESQUERO, J.B.; SANTOS, E.L.; NAKAIE, C.R.; COSTA-NETO, C.M.; BLOCH JR, C. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**. v. 27, p. 2137-46. 2006b.

CHAN, W.C.; WHITE, P.D. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis a practical approach. **Ed. Oxford**. Nova Iorque, 2000.

CHEN, T., WALKER, B., ZHOU, M., SHAW C. Dermatoxin and phylloxin from the waxy monkey frog, *Phyllomedusa sauvagei*: cloning of precursor cDNAs and structural characterization from lyophilized skin secretion. **Regul Pept.** v.129, p. 103-8, 2005

CHEN, T.; ZHOU, M.; GAGLIARDO, R.; WALKER, B.; SHAW, C. Elements of the granular gland peptidome and transcriptome persist in air-dried skin of the South American orange-legged leaf frog, *Phyllomedusa hypocondrialis*. **Peptides**. v. 27, p. 2129-36. 2006.

- CONCEIÇÃO, K., KONNO, K., RICHARDSON, M., ANTONIAZZI, M.M., JARED, C., DAFFRE, S., CAMARGO, A.C., PIMENTA, D.C. Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**. v. 27, p. 3092-9, 2006.
- CONLON, J.M., AL-GHAFFERI, N., ABRAHAM, B., JIANGSHENG, H., COSETTE, P., LEPRINCE, J., JOUENNE, T., VAUDRY, H. Antimicrobial peptides from diverse families isolated from the skin of the Asian frog, *Rana grahami*. **Peptides**. v. 27, p. 2111-7, 2006.
- CONLON, J.M., WOODHAMS, D.C., RAZA, H., COQUET, L., LEPRINCE, J., JOUENNE, T., VAUDRY H, ROLLINS-SMITH, L.A. Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). **Toxicon**. v. 50, p. 498-506, 2007
- DALY, J.W.; CACERES, J.; MONI, R.W.; GUSOVSKY, F.; MOOS, M. JR.; SEAMON, K.B.; MILTON, K.; MYERS C.W. Frog secretions and hunting magic in the upper Amazon: identification of a peptide that interacts with an adenosine receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 89, p. 10960-3. 1992.
- DUDA JR., T.F.; VANHOYE, D., NICOLAS, P. Roles of diversifying selection and coordinated evolution in the evolution of amphibian antimicrobial peptides. **Mol. Biol. Evol.** v. 19, p. 858–64. 2002.
- EL AMRI, C., BRUSTON, F., JOANNE, P., LACOMBE, C., NICOLAS, P. Intrinsic flexibility and structural adaptability of Plasticins membrane-damaging peptides as a strategy for functional versatility. **Eur. Biophys. J.** v. 36, p. 901-9, 2007.

- EL AMRI, C., NICOLAS, P. Plasticins: membrane-damaging peptides with 'chameleon-like' properties. **Cell. Mol. Life. Sci.** v. 65, p. 895-909, 2008.
- EPAND, R.M. & VOGEL, H.J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1462, p. 11-28. 1999.
- ERSPAMER, V. Bioactive secretions of the amphibian integument. **Amph. Biol.** v. 1, p. 178-350. 1994.
- ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P.; ERSPAMER, G.F.; MONTECUCCHI, P.C.; DE CASTIGLIONE, R. Phyllomedusa Skin: A Huge Factory and Store-House of a Variety of Active Peptides. **Peptides.** v. 6, p. 7-12. 1985.
- FEDER, R., DAGAN, A., MOR, A. Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 4230-8, 2000.
- GEBHARD, L.G.; CARRIZO, F.U.; STERN, A.L.; BURGARDT, N.L.; FAIVOVICH, J.; LAVILLA, E.; ERMÁCORA, M.R. A Kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of *Phyllomedusa sauvagii*. **Eur. J. Biochem.** v. 271, p. 2117-26. 2004.
- KRUGLIAK, M.; FEDER, R.; ZOLOTAREV, V.Y.; GAIDUKOV, L.; DAGAN, A.; GINSBURG, H.; MOR, A. Antimalarial activities of dermaseptin S4 derivatives. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 44, p. 2442-51. 2000.

KUSTANOVICH, I., SHALEV, D.E., MIKHLIN, M., GAIDUKOV, L., MOR, A. Structural requirements for potent versus selective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin S4 derivatives. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 16941-51, 2002.

LAZARUS, L.H. & ATILLA. M. The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. **Prog. in Neur.** v. 41, p. 473-507. 1993.

LAZARUS, L.H.; BRYANT, S.D; COOPER, P.S.; SALVADORI, S. What peptides these deltorphins be. **Prog. in Neur.** v. 57, p. 377-420. 1999.

LEITE, J.R.S.A.; SILVA, L.P.; RODRIGUES, M.I.S.; PRATES, M.V.; BRAND, G.D.; LACAVAL, B.M.; AZEVEDO, R.B.; BOCCA, A.L.; ALBUQUERQUE, S.; BLOCH JR, C. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides.** v. 26, p. 565–73. 2005.

LEITE, J.R.S.A.; BRAND, G.D.; SILVA, L.P.; KUCKELHAUS, S.A.; BENTO, W.R.; ARAUJO, A.L.; MARTINS, G.R.; LAZZARI, A.M.; BLOCH JR, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. *Comp. Biochem. Physiol.* **A Mol. Integr. Physiol.** 2007. *In press.*

LEQUIN, O., LADRAM, A., CHABBERT, L., BRUSTON, F., CONVERT, O., VANHOYE, D., CHASSAING, G., NICOLAS, P., AMICHE, M. Dermaseptin S9, an alpha-helical antimicrobial peptide with a hydrophobic core and cationic termini. **Biochemistry.** v. 45, p. 468-80, 2006.

- LORIN, C.; SAIDI, H.; BELAID, A.; ZAIRI, A.; BALEUX, F.; HOCINI, H.; BELEC, L.; HANI, K.; TANGY, F. The antimicrobial peptide Dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. **Virology**. v. 334, p. 264-75. 2005.
- MOR, A.; NGUYEN, V.H.; DELFOUR, A.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; NICOLAS, P. Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. **Biochem**. v. 30, p. 8824-30. 1991.
- MOR, A.; HANI, K.; NICOLAS, P. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. **J. Biol. Chem**. v. 269, p. 31635-41. 1994.
- MOR, A. & NICOLAS, P. Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. **Eur. J. Biochem**. v. 219, p. 145-54. 1994.
- MORTON, C.O., DOS SANTOS, S.C., COOTE, P. An amphibian-derived, cationic, alpha-helical antimicrobial peptide kills yeast by caspase-independent but AIF-dependent programmed cell death. **Mol. Microbiol**. v. 65, p. 494-507, 2007.
- NEGRI, L.; ERSPAMER, G.F.; SEVERINI, C.; POTENZA, R.L.; MELCHIORRI, P.; ERSPAMER, V. Dermorphin-related peptides from the skin of *Phyllomedusa bicolor* and their amidated analogs activate two μ opioid receptor subtypes that modulate antinociception and catalepsy in the rat. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 89, p. 7203-07. 1992.
- PARK, C.B., KIM, H.S., KIM, S.C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. v. 244, p. 253-7, 1998.

PIERRE, T.N., SEON, A.A., AMICHE, M., NICOLAS, P. Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/opioid peptide precursors. **Eur. J. Biochem.** v. 267, p. 370-8, 2000.

POUGH, F. H.; HELSER, J. B.; McFARLAND, W.N. A Vida dos Vertebrados. 2ed. São Paulo. **Atheneu.** 1999.

PRATES, M.V., Peptídeos Catiônicos de *Phyllomedusa Tarsius* (Amphibia): estrutura e atividade biológica. BioCel. **UnB.** 1999

PRATES, M.V.; SFORÇA, M.L.; REGIS, W.C.B.; LEITE, J.R.S.A.; SILVA, L.P.; PERTINHEZ, T.A.; ARAÚJO, A.L.T.; AZEVEDO, R.B.; SPISNI, A.; BLOCH JR, C. The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 13018–26, 2004.

PUKALA, T.L., BOWIE, J.H., MASELLI, V.M., MUSGRAVE, I.F., TYLER, M.J. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. **Nat. Prod. Rep.** v. 23, p. 368-93, 2006.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipids bilayer membranes by K-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1462, p. 55-70, 1999.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers.** v. 66, p. 236-48. 2002.

SILVA, L.P., LEITE, J.R., BRAND, G.D., REGIS, W.B., TEDESCO, A.C., AZEVEDO, R.B., FREITAS, S.M., BLOCH, C. Jr. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Liposomes fusion and/or lysis investigated by fluorescence and atomic force microscopy. **Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.** *in press*

STEBBINS, R.C. & COHEN, N.W. A Natural History of Amphibians. 1ed. Princeton. Princeton University Press. 1995.

THOMPSON, A.H., BJOURSON, A.J., ORR, D.F., SHAW, C., MCCLEAN, S. A combined mass spectrometric and cDNA sequencing approach to the isolation and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretions of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*. **Peptides.** v. 28, p. 1331-43, 2007a.

THOMPSON, A.H., BJOURSON, A.J., ORR, D.F., SHAW, C., MCCLEAN, S. Amphibian skin secretomics: application of parallel quadrupole time-of-flight mass spectrometry and peptide precursor cDNA cloning to rapidly characterize the skin secretory peptidome of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*: discovery of a novel peptide family, the hyposins. **J. Proteome Res.** v. 6, p. 3004-13, 2007b.

VANHOYE, D.; BRUSTON, F.; NICOLAS, P.; AMICHE, M. Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. **Eur. J. Biochem.** v. 270, p. 2068–81, 2003.

WECHSELBERGER, C. Cloning of cDNAs encoding new peptides of the dermaseptin-family. **Biochim. Biophys. Act.** v. 1388, p.279-83, 1998.

YEAMAN, M.R. & YOUNT, N.Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance.

Pharmacol. Rev. v. 55, p. 27-55. 2003.

ZAIRI, A., SERRES, C., TANGY, F., JOUANNET, P., HANI, K. In vitro spermicidal activity of peptides from amphibian skin: dermaseptin S4 and derivatives. **Bioorg. Med. Chem.** v.16, p. 266-75, 2007.

ZAIRI, A., TANGY, F., SAADI, S., HANI, K. In vitro activity of dermaseptin S4 derivatives against genital infections pathogens. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v. 50, p. 353-8, 2008.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 15, p. 5449-53. 1987.