



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal  
Universidade de Brasília**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS  
ISOLADOS DA SECREÇÃO CUTÂNEA DO ANURO *Boana lundii*  
(Burmeister, 1856)**

**NAYWARA OLIVEIRA DE ARAÚJO**

**BRASÍLIA  
2018**



**NAYWARA OLIVEIRA DE ARAÚJO**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS  
ISOLADOS DA SECREÇÃO CUTÂNEA DO ANURO *Boana lundii*  
(Burmeister, 1856)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestra em Biologia Animal.

Autora: Naywara Oliveira de Araújo  
Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

**BRASÍLIA  
2018**



**Naywara Oliveira de Araújo**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS  
ANTIMICROBIANOS ISOLADOS DA SECREÇÃO CUTÂNEA DO ANURO  
*Boana lundii* (Burmeister, 1856)**

**Comissão Examinadora:**

**Profa. Dra. Mariana de Souza Castro  
Presidente  
Departamento de Ciências Fisiológicas/IB  
Universidade de Brasília**

**Profa. Dra. Pérola de Oliveira Guimarães  
Membro Titular  
Departamento de Farmácia/ FS  
Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior  
Membro Titular  
Departamento de Ciências Fisiológicas/IB  
Universidade de Brasília**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que me ajudaram a completar esse trabalho e, em especial:

- À minha mãe, Maria do Socorro, pela paciência, amor e valores ensinados
- À Patrícia Mourão pelos anos de convivência e pelos aprendizados diários.
- Ao meu pai, Edson Alves, por sempre me incentivar a crescer dia após dia.
- À Profa. Dra. Mariana S. Castro pelo acolhimento no laboratório e pelos conhecimentos compartilhados.
- Ao MSc. Carlos José Correia de Santana pela paciência e auxílio na realização dos experimentos.
- Ao Dr. Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior e aos técnicos Nuno Domingues e MSc. Adolfo Carlos Barros de Souza pela disposição em ajudar em todos os momentos.
- Aos colegas do laboratório Bruna, Verônica, Carol, Tânia, Gislene e Reinaldo pela companhia e descontração.
- À Luísa, Ana Paula, Jéssica, Gisany, Marcus, Ana Carolina pelas alegrias e tristezas compartilhadas.
- Ao MSc. Matheus Nishiyama Pedroca pela amizade e ajuda nos experimentos.
- Ao Diogo, pelo companheirismo ao longo dos anos e pelas histórias e momentos compartilhados.
- Ao Prof. Dr. Osmino R. Pires Júnior pelo fácil acesso e auxílio no fornecimento dos materiais de pesquisa.
- À Capes pelo apoio financeiro por meio da concessão de bolsa de estudos.

## **APOIO FINANCEIRO**

A dissertação de mestrado intitulada “Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea do anuro *Boana lundii* (Burmeister, 1856)” desenvolvida por Naywara Oliveira de Araújo sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq (processos no. 311202/2015-2 - Produtividade em Pesquisa e no. 407801/2013-8 - Rede Centro-Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação - REDE PRÓ-CENTRO-OESTE), da FAPDF (processos no. 193.000.955/2015 e no. 0193.001736/2017), da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

## RESUMO

O aumento da resistência de microrganismos patogênicos aos antibióticos disponíveis promoveu uma busca por novas alternativas terapêuticas para superar os mecanismos de resistência. Essa resistência é causada pelo uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, pois podem favorecer linhagens de microrganismos resistentes. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) atuam com um mecanismo de ação diferenciado, podendo ser utilizado diretamente ou inspirar o desenho de novas drogas para que possam ser aplicadas como novas alternativas terapêuticas para combater a resistência antimicrobiana. O presente estudo teve como objetivo geral realizar a identificação, o isolamento e a caracterização química e biológica de peptídeos antimicrobianos inéditos presentes na secreção cutânea do anuro *Boana lundii* (Anura: Hylidae). Indivíduos adultos de *B. lundii* foram coletados no município de Monte Alegre de Goiás (GO) e a secreção cutânea foi obtida por estimulação elétrica moderada, liofilizada e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Alíquotas da secreção seca foram fracionadas por RP-HPLC em coluna  $\text{C}_{18}$  column (Vydac 218TP54; 4,6 x 250 mm) usando gradiente linear de 0,1 % (v/v) TFA em acetonitrila, com fluxo de 1,0 mL/min. As frações eluídas foram monitoradas a 216 nm, coletadas manualmente e secas. Em seguida, foram realizados ensaios de varredura com as bactérias patogênicas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* para detecção das frações capazes de promover a inibição do crescimento microbiano. As frações com atividade inibitória sobre as bactérias utilizadas foram submetidas à análise por MALDI-TOF MS, permitindo a identificação de três peptídeos. Na fração 28 observou-se a presença de um componente principal de massa molecular igual a 2723,74 Da; na fração 29 detectou-se um componente com massa molecular igual a 1835,02 Da e na fração 30 outro peptídeo com massa molecular de 1879,05 Da. As estruturas primárias dos três peptídeos foram determinadas empregando-se degradação de Edman automatizada. O peptídeo oriundo da fração 28 (com cadeia polipeptídica de 27 resíduos de aminoácidos) foi denominado raniseptina-BI 1 e exibiu similaridade com o peptídeo raniseptina 3 isolado da secreção do anuro *B. raniceps*. Tal peptídeo exibiu atividade antimicrobiana relevante sobre bactérias e fungos patogênicos, merecendo destaque seus efeitos sobre as bactérias *S. epidermidis* com CMI  $< 1 \mu\text{M}$  e sobre *K. pneumoniae* com valor de CMI =  $2 \mu\text{M}$ . Também mostrou-se bem ativo sobre os fungos *C. neoformans* (CMI =  $4 \mu\text{M}$ ) e *C. albicans* (CMI =  $16 \mu\text{M}$ ). Outros dois peptídeos pertencentes à família das hilinas também foram isolados e caracterizados no presente trabalho. Tais peptídeos, denominados hilinas b3 e b4, mostraram-se mais ativos sobre as bactérias Gram-positivas do que sobre as Gram-negativas. A hilina b3 mostrou-se a mais ativa dentre as duas novas hilinas isoladas, merecendo destaque sua atividade sobre as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis* com valores de CMI iguais a  $8 \mu\text{M}$  e sobre o fungo *C. neoformans* com valor de CMI igual a  $16 \mu\text{M}$ . Os três peptídeos exibiram atividade inibitória parcial sobre a proliferação do parasita *T. cruzi*, sendo que nenhum dos peptídeos testados conseguiu inibir completamente a proliferação do parasita mesmo na maior concentração empregada ( $128 \mu\text{M}$ ). Os três peptídeos adotaram conformação em  $\alpha$ -hélice na presença de micelas de SDS, ambiente que mimetiza a membrana plasmática de microrganismos. O presente estudo reforça o potencial terapêutico dos PAMs isolados da secreção cutânea de anuros e evidencia a necessidade de estudos sistemáticos visando explorar adequadamente o potencial farmacológico e bioquímico da anurofauna brasileira.

Palavras-chave: Anuros; *Boana lundii*; Secreção cutânea; Peptídeos antimicrobianos; Purificação; Caracterização.

## ABSTRACT

Increased resistance of pathogenic microorganisms to the available antibiotics promoted a search for new therapeutic alternatives to overcome resistance mechanisms. The indiscriminate use of antimicrobial agents promotes this resistance, as they may select resistant microbial strains. Antimicrobial peptides (AMPs) act with a differentiated mechanism of action, and can be used directly or inspire the design of new drugs so that they can be applied as new therapeutic options to combat antimicrobial resistance. The general objective of this study was to perform the identification, purification and chemical and biological characterization of three novel antimicrobial peptides isolated from the skin secretion of *Boana lundii* (Anura: Hylidae). Adult specimens of *B. lundii* were collected in the municipality of Monte Alegre de Goiás (GO) and the cutaneous secretion was obtained by moderate electrical stimulation, lyophilized and stored at -20°C. Aliquots of the dry secretion were fractionated by RP-HPLC on C<sub>18</sub> column (Vydac 218TP54; 4.6 x 250 mm) using a linear gradient of 0.1% (v / v) TFA in acetonitrile at a flow rate of 1.0 mL/min. The eluted fractions were monitored at 216 nm, manually collected and dried. Screening assays were then performed with pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to detect the fractions capable of promoting inhibition of microbial growth. The fractions with inhibitory activity on the tested bacteria were analyzed by MALDI TOF MS, allowing the identification of three peptides. In fraction 28 it was observed the presence of a major component of molecular mass equals to 2,723.74 Da; in fraction 29 a component with a molecular mass of 1,835.02 Da and in fraction 30 another peptide with a molecular mass of 1,879.05 Da was detected. The primary structures of the three peptides were determined employing automated Edman degradation. The peptide from fraction 28 (with a polypeptide chain of 27 amino acid residues) was named raniseptin-BI 1 and showed similarity to the peptide raniseptin 3 previously isolated from the secretion of the anuran *B. raniceps*. Such peptide exhibited relevant antimicrobial activity on pathogenic bacteria and fungi. Its effects on *S. epidermidis* bacteria with MIC <1 µM and on *K. pneumoniae* with MIC value = 2 µM deserved special mention. It was also very active on fungi *C. neoformans* (MIC = 4 µM) and *C. albicans* (MIC = 16 µM). Two other peptides belonging to the hylin family were also isolated and characterized in the present work. Such peptides, termed hylins b3 and b4, were more active on Gram-positive than on Gram-negative bacteria. Hylin b3 was the most active of the two new hylins isolated, emphasizing its activity on the Gram-positive bacteria *S. aureus* and *S. epidermidis* with MIC values equal to 8 µM and on the fungus *C. neoformans* with value of MIC equals to 16 µM. The three peptides exhibited partial inhibitory activity on *T. cruzi* parasite proliferation, and none of the peptides tested was able to completely inhibit the parasite proliferation even at the highest concentration (128 µM). The three peptides adopted  $\alpha$ -helix conformation in the presence of SDS micelles, an environment that mimics the plasma membrane of microorganisms. The present study reinforces the therapeutic potential of AMPs isolated from cutaneous secretion of anurans and evidences the need for systematic studies to properly explore the pharmacological and biochemical potential of Brazilian anurofauna.

Key words: Anura; *Boana lundii*; Skin secretion; Antimicrobial peptides; Purification; Characterization.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelos representando as diferentes classes estruturais de PAMs.....	10
Figura 2. Principais modelos de mecanismos de ação dos PAMs sobre membranas biológicas.....	11
Figura 3. Indivíduo adulto da espécie <i>Boana lundii</i> .....	13
Figura 4. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de <i>B. lundii</i> .....	21
Figura 5. Espectro de massas da fração 28 obtida em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico).....	23
Figura 6. Espectro de massas da fração 29 obtida em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico).....	24
Figura 7. Espectro de massas da fração 30 obtida em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico).....	25
Figura 8. Alinhamento entre o peptídeo raniseptina 3 isolado de <i>B. raniceps</i> e o peptídeo raniseptina-BI 1 isolado da secreção de <i>B. lundii</i> .....	26
Figura 9. Alinhamento múltiplo entre o peptídeo hilina b3 obtido com o fracionamento da secreção de <i>B. lundii</i> e as hilinas b1 e b2 previamente isoladas dessa mesma secreção.....	26
Figura 10. Alinhamento múltiplo entre o peptídeo hilina b4 obtido com o fracionamento da secreção de <i>B. lundii</i> e as hilinas b1 e b2 previamente isoladas dessa mesma secreção.....	27
Figura 11. Projeção em roda helicoidal dos peptídeos isolados da secreção de <i>B. lundii</i> .....	27
Figura 12. Espectros dicróticos dos peptídeos isolados de <i>B. lundii</i> a 50 $\mu$ M em água e em SDS 35 mM. (A) raniseptina-BI 1, (B) hilina b3 e (C) hilina b4.....	28
Figura 13. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após incubação por 96 horas com os peptídeos raniseptina BI-1 (A), hilina b3 (B) e hilina b4 (C).....	30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Leituras espectrofotométricas a 595 nm obtidas com a incubação por 18 h das frações cromatográficas resultantes do fracionamento da secreção bruta de <i>B. lundii</i> e dos controles (água e formaldeído 0,4%) com a bactéria Gram-negativa <i>E. coli</i> .....	22
Tabela 2. Leituras espectrofotométricas a 595 nm obtidas com a incubação por 18 h das frações cromatográficas resultantes do fracionamento da secreção bruta de <i>B. lundii</i> e dos controles (água e formaldeído 0,4%) com a bactéria Gram-positiva <i>S. aureus</i> .....	22
Tabela 3. Efeitos antimicrobianos (CMI <sub>s</sub> , µM) dos peptídeos isolados da secreção de <i>B. lundii</i> sobre bactérias e fungos patogênicos.....	29

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**ATCC** – Coleção Americana de Culturas Típicas, do inglês *American Type Culture Collection*

**ATP** - Adenosina trifosfato

**BHI** – Infusão cérebro-coração, do inglês *brain heart infusion*

**Da** – Dalton

**Fmoc** – 9-fluorenil-metoxicarbonil

**HCCA** – Ácido-alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, do inglês  *$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid*

**LC-MS** – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography-mass spectrometry*

**MALDI-TOF** – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – Tempo de voo, do inglês *matrix assisted laser desorption ionization – time of flight*.

**CMI** – Concentração mínima inibitória, do inglês *minimum inhibitory concentration*  
**nm** – Nanômetro

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PAM** – Peptídeo antimicrobiano

**p/v** – Peso/volume

**RPM** – Rotações por minuto

**RP-HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês *reversed-phase high-performance liquid chromatography*

**SDS** – Dodecil sulfato de sódio

**TFA** – Ácido trifluoroacético, do inglês *trifluoroacetic acid*

**UFC** – Unidade formadora de colônia, do inglês *colony-forming unit*

**v/v** – Volume/volume

**$\mu$ g** – Micrograma

**$\mu$ L** – Microlitro

**$\mu$ m** – Micrômetro

**$\mu$ M** – Micromolar

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iv
<b>APOIO FINANCEIRO</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Sepses.....	1
1.2. Doenças parasitárias.....	2
1.3. Bactérias patogênicas.....	2
1.3.1. <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	3
1.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	4
1.3.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	4
1.3.4. <i>Escherichia coli</i> .....	5
1.4. Fungos patogênicos.....	6
1.4.1. <i>Candida albicans</i> .....	6
1.4.2. <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	7
1.5. A secreção cutânea de anuros como fonte de peptídeos antimicrobianos.....	8
1.6. Peptídeos antimicrobianos (PAMs).....	9
1.7. Mecanismos de resistência contra PAMs.....	10
1.8. <i>Boana lundii</i> .....	12
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	14
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	15
3.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
4.1. Secreção cutânea de <i>B. lundii</i> .....	16
4.2. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de <i>B. lundii</i> .....	16
4.3. Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF.....	16
4.4. Determinação da estrutura primária dos peptídeos de <i>B. lundii</i> .....	16
4.5. Bioinformática.....	17

4.6. Síntese química dos peptídeos de <i>B. lundii</i> .....	17
4.7. Dosagem dos peptídeos sintéticos.....	17
4.8. Análise da estrutura secundária dos peptídeos de <i>B. lundii</i> por dicroísmo circular.....	17
4.9. Avaliação da atividade antibacteriana.....	18
4.10. Avaliação da atividade antifúngica.....	19
4.11. Ensaio sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	20
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>35</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>36</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>37</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Sepses

A sepsis é causada por uma resposta imune desencadeada pelo corpo por uma infecção na corrente sanguínea. É uma condição que ameaça a vida, pois provoca uma intensa resposta inflamatória em todo o organismo podendo gerar a sepsis grave que leva ao comprometimento funcional dos tecidos e órgãos. A resposta mais comum é resultado de infecções bacterianas, mas também podem ser derivadas de fungos, vírus ou parasitas (Vincent *et al.*, 2013).

Em geral, o acompanhamento é realizado em unidades de terapia intensiva e geralmente é tratada com líquidos intravenosos e antibióticos de largo espectro por via endovenosa, por serem medicamentos que tem demonstrado eficácia contra uma variedade de bactérias. Mesmo esses medicamentos tendo a ação desejada, eles não tem efeito se a infecção tiver sido provocada por outro tipo de microrganismo patogênico (Leekha *et al.*, 2011).

O diagnóstico precoce para iniciar o tratamento é fundamental para o controle da sepsis, evitando assim suas complicações e um possível choque séptico que provoca a diminuição da pressão arterial, dificultando a chegada de sangue e oxigenação nos órgãos, podendo desencadear sinais e sintomas como febre, frequência cardíaca acelerada, dificuldade para respirar e perda da consciência (Siqueira-Batista *et al.* 2011).

A emergência da resistência a antibióticos convencionais e o declínio no desenvolvimento de novos fármacos representa um sério problema de saúde pública, motivando a busca por novas alternativas terapêuticas. O desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos terapeuticamente eficazes para o tratamento de infecções bacterianas sistêmicas tem sido alvo de pesquisas devido ao seu potencial uso como agentes anti-infecciosos e imunomoduladores que são capazes de reduzir a migração leucocitária e a redução no número de microrganismos viáveis, reduzindo assim a inflamação. Os peptídeos antimicrobianos possuem potencial aplicação terapêutica, demonstrando eficiência no controle do foco infeccioso, bem como poderão ser utilizados como protótipos para o desenho racional de novos agentes terapêuticos (Silva *et al.*, 2016).

## **1.2. Doenças parasitárias**

As doenças parasitárias são causadas por agentes patogênicos, como protozoários, insetos ou vermes. Os parasitas são seres primitivos que para sobreviverem se alojam no organismo, alimentando-se de sangue ou do conteúdo intestinal e causam uma série de prejuízos, às vezes, irremediáveis ao organismo do hospedeiro. Cada tipo de parasitose tem a sua própria maneira de transmissão, mas a grande maioria pode ser evitada com medidas simples de higiene e limpeza (Torgerson *et al.*, 2015).

Os parasitas têm preferência por climas quentes e úmidos, mas também podem ser encontrados em regiões de clima frio. Em climas quentes é possível encontrar a doença de Chagas. Ela é provocada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* que, por intermédio da picada do vetor triatomíneo, é eliminado nas fezes do inseto e acaba sendo introduzido no hospedeiro. O grande problema não está na picada, mas sim nas fezes que o barbeiro libera sobre a picada que causa coceira. Quando o indivíduo começa a coçar a região da picada, acaba jogando as fezes infectadas na sua corrente sanguínea (OMS, 2018).

## **1.3. Bactérias patogênicas**

As bactérias são organismos unicelulares e procariontes, possuem material genético disperso no citoplasma. As bactérias estão presentes em diversos ambientes vivendo na forma isolada ou em colônias. Elas podem viver dentro do solo, no ar, nos objetos, ferimentos na pele e até dentro do intestino humano. O relacionamento dos seres humanos com as bactérias é complexo, pois quando a bactéria está no corpo humano na ausência de doença é chamado de colonizador, mas muitas vezes, elas podem ser bactérias patogênicas e podem desencadear doenças infecciosas como, por exemplo, a meningite, faringite e infecção pulmonar (Paul, 2014).

O intestino humano é um ambiente favorável para o desenvolvimento de bactérias, pois há muitos nutrientes disponíveis para a sua sobrevivência. As infecções gastrointestinais geralmente são causadas pela ingestão de patógenos ou toxinas transmitidas pela água ou alimentos, dando origem a diferentes doenças como cólera, disenteria, diarreia, gastrite e intoxicação alimentar. Medidas de higiene, saneamento básico e tratamento térmico nos alimentos devem ser integradas para a prevenção de infecções, minimizando os

riscos à saúde humana e evitando intervenções hospitalares (Humphries e Linscott, 2015).

### **1.3.1. *Staphylococcus epidermidis***

*Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria Gram-positiva que faz parte da microbiota intestinal normal. É uma bactéria anaeróbia facultativa que, embora não seja geralmente patogênica, pode afetar pacientes com o sistema imunológico comprometido e aqueles equipados com cateteres correm o risco de desenvolver infecções no ambiente hospitalar. Esse microrganismo possui uma alta capacidade em formar biofilmes, sendo que a natureza hidrofóbica das superfícies das células de *S. epidermidis* predispõe à aderência dos biofilmes aos dispositivos sintéticos (Otto, 2013; Gomes *et al.*, 2014).

Um dos fatores complicadores de *S. epidermidis* é a inadequação de muitos tratamentos com antibióticos comuns, pois a formação de biofilme reduz o acesso de antibióticos. A presença de biofilmes protege parcialmente as bactérias do sistema imunológico dos hospedeiros, as células neste modo de crescimento são mais resistentes aos antimicrobianos e são difíceis de tratar porque a matriz do biofilme e as características fenotípicas da bactéria conferem resistência à resposta imune do hospedeiro e à ação de drogas antimicrobianas (O'Gara e Humphreys, 2001; Otto, 2013).

O tratamento mais comum para estas infecções é remover ou substituir o implante infectado, embora em todos os casos a prevenção seja ideal. O medicamento de escolha para o tratamento é a vancomicina, à qual pode ser adicionada rifampina ou um aminoglicosídeo. Buscando tratar infecções relacionadas a estafilococos e prevenir seus efeitos colaterais com custos significativos de morbidade e de cuidados de saúde, muitos esforços estão sendo feitos para o desenvolvimento de novas drogas antifilocócicas eficazes. De fato, devido à sua extrema resistência ao tratamento, as infecções associadas aos estafilococos representam um sério ônus para o sistema público de saúde (Claret *et al.*, 2017).

Semelhante às de *S. aureus*, as paredes celulares de *S. epidermidis* têm uma proteína de ligação à transferrina que ajuda o organismo a obter ferro da transferrina. Acredita-se que os tetrâmeros de uma proteína exposta à superfície, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, se ligue à transferrina e removam seu

ferro. Etapas subseqüentes incluem o ferro sendo transferido para lipoproteínas de superfície, em seguida, para transportar proteínas que transportam o ferro para dentro da célula (Nethercott *et al.*, 2013).

### **1.3.2. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva que faz parte da microbiota natural da pele e da mucosa nasal, considerado um dos mais importantes patógenos humanos. Desde o início da era microbiológica, a bactéria *S. aureus* foi reconhecida como um importante patógeno responsável por infecções no ambiente de saúde e na comunidade. As infecções causadas por este microrganismo acontecem quando ocorre a sua entrada por brechas na pele ou mucosa, podendo envolver estruturas locais ou se espalhar para órgãos distantes, gerando infecções invasivas que ameaçam a vida, como bacteremia, pneumonia e osteomielite (Bagnoli *et al.*, 2018).

*S. aureus* é relativamente resistente à morte por peptídeos antimicrobianos catiônicos produzidos por células epiteliais hospedeiras e fagócitos (Flannagan *et al.*, 2018). Um dos principais mecanismos subjacentes para essa resistência envolve alterações na carga da superfície da célula bacteriana. A proteína Dlt provoca substituições de D-alanina nos ácidos teicóicos e lipoteicóicos da parede celular, neutralizando levemente a superfície da célula carregada negativamente (McGuinness *et al.*, 2016).

O *S. aureus* é um colonizador comum das superfícies da pele e mucosa dos seres humanos e desde a década de 1960 os hospitais tiveram que lidar com o surgimento de linhagens de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) que se espalham melhor em hospitais do que o *S. aureus* suscetível à meticilina (MRSA) e são mais difíceis de tratar (Fluit *et al.*, 2010). A resistência de linhagens MRSA foi resultado de mutações em um gene que codifica proteínas do sítio de ligação envolvido na ação de todos os fármacos betalactâmicos, o que significa uma resistência cruzada a penicilinas, cefalosporinas e carbapênemicos (Otto, 2012).

### **1.3.3. *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa que faz parte da microbiota intestinal normal de animais e humanos. Essa bactéria está freqüentemente associada a pneumonia e infecções urinárias, mas, em casos

graves,esses microrganismos podem levar à bacteremia e até a osteomielite (Hurst, 2016).

As infecções causadas por *K. pneumoniae* ganharam muita atenção na última década devido ao surgimento de linhagens resistentes aos medicamentos, que levaram à classificação de *K. pneumoniae* como um patógeno ESKAPE.O termo ESKAPE refere-se aos principais patógenos causadores de infecções nosocomiais (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosae* *Enterobacter* spp.) (Pendleton *et al.*, 2013).

No caso de *K. pneumoniae*, a maioria das estirpes resistentes a fármacos produz *Klebsiella pneumoniae* carbapenamase (KPC), uma  $\beta$ -lactamase que confere resistência a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Pendleton *et al.*, 2013).

A resistência de *K. pneumoniae* é resultado da presença de uma cápsula de polissacarídeo que é bastante espessa, usada pela bactéria para colonizar as superfícies do hospedeiro, como o epitélio pulmonar. A cápsula protege a bactéria contra a opsonofagocitose e fornece uma matriz adesiva para a formação de biofilme. Além disso, a maioria das linhagens de *K. Pneumoniae* expressa as fímbrias tipos I e III, que auxiliam na adesão ao epitélio e aos dispositivos médicos, respectivamente (Murphy *et al.*, 2013; Clegg e Murphy, 2016).

#### **1.3.4. Escherichia coli**

*Escherichia coli* é um dos microrganismos mais intensamente estudados, é uma bactéria Gram-negativa, facultativamente anaeróbica, não-formadora de esporos (Croxen *et al.*, 2013).

A maioria das linhagens de *E.coli* existe como simbiontes inofensivos e algumas delas são até benéficas para seu hospedeiro no equilíbrio da microbiota intestinal e absorção de nutrientes. Existem, no entanto, linhagens patogênicas que causam uma ampla gama de doenças em humanos e animais, desde diarreia até infecção da corrente sanguínea, como resultado da heterogeneidade da espécie (Han *et al.*, 2015).

As linhagens patogênicas de *E. coli* causam um grande número de doenças em humanos, incluindo diarreia, colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica, infecções do trato urinário e meningite neonatal. Os diferentes patotipos de *E. coli* são caracterizados pela presença de conjuntos específicos de genes relacionados

à virulência. Portanto, não é de surpreender que a *E. coli* patogênica constitua uma família de bactérias geneticamente heterogêneas (Fratamico *et al.*, 2016).

Os genes que codificam os fatores de virulência são responsáveis pelos diferentes tamanhos de genoma de *E. coli*, uma vez que as linhagens patogênicas comensais diferem em um milhão de pares de bases que correspondem a um *pool* gênico flexível. Esses genes estão localizados em elementos genéticos móveis, como transposons, seqüências de inserção, bacteriófagos e plasmídeos, resultando na transferência horizontal de genes e na variabilidade genética dentro da espécie, o que pode levar à colonização diferencial dos hospedeiros. Portanto, é importante examinar os efeitos sobre a saúde entre as espécies para compreender a saúde pública e animal e ajudar a implementar o tratamento e a prevenção adequados (Croxen *et al.*, 2013).

#### **1.4. Fungos patogênicos**

Os fungos são organismos eucariontes, aclorofilados e heterótrofos (Galiza *et al.*, 2014). Os fungos podem ser utilizados industrialmente na produção de medicamentos e alimentos. Eles apresentam uma grande importância agrícola e ecológica, pois mantêm o equilíbrio do ambiente decompondo restos vegetais juntamente com algumas bactérias e reciclam elementos químicos que serão úteis na manutenção da vida de outros organismos (Gurung *et al.*, 2013).

Os fungos patogênicos causam, muitas vezes, doenças mais graves, passando de uma forma de crescimento para outra. A levedura *Candida albicans*, por exemplo, muda a sua morfologia passando o seu crescimento de células em broto redondo para o crescimento de células alongadas (filamentosas).

Tanto *Candida albicans* como *Cryptococcus neoformans* são fungos que apenas causam infecções quando ocorrem quebras nas barreiras protetoras da pele e das mucosas ou quando defeitos no sistema imune do hospedeiro permitem a penetração, colonização e reprodução no hospedeiro (Yang *et al.*, 2014).

##### **1.4.1. *Candida albicans***

*Candida albicans* é um dos patógenos oportunistas humanos mais comuns. Tem como característica ser um fungo comensal, que vive em várias partes do corpo humano, atuando como patógeno oportunista em decorrência de queda de

imunidade ou expressando fatores de virulência. Quando presente na corrente sanguínea está associada a altas taxas de mortalidade (Berman, 2012).

Esse patógeno oportunista atinge pacientes imunocomprometidos, indivíduos fracos ou, até mesmo, pessoas saudáveis. A infecção causada por *C. albicans* é comumente conhecida como candidíase. A patogenicidade de *C. albicans* depende de dois fatores. Um é o estado imunológico do hospedeiro e o outro está relacionado aos fatores de virulência desse patógeno. Em geral, os fatores microbianos que contribuem para a patogenicidade são a adesão à célula hospedeira, secreção de enzimas hidrolíticas, fenótipo dimórfico (levedura com a forma filamentosa ou hifas), comutação fenotípica que modula o sistema imunológico do hospedeiro e a formação de biofilmes em superfícies bióticas e abióticas (Kabir *et al.*, 2012).

#### **1.4.2. *Cryptococcus neoformans***

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura oportunista que consegue se alojar no sistema nervoso central podendo causar patologias como a meningite, criptococose e encefalite principalmente em indivíduos com algum comprometimento do sistema imune. Tanto na natureza como no laboratório, *C. neoformans* pode se desenvolver como um fungo filamentoso. A maioria das infecções causadas por esses microrganismos ocorre nos pulmões, tornando-se um fungo particularmente perigoso (Kwon-Chung *et al.*, 2014; May *et al.*, 2016).

Geralmente, *C. neoformans* é adquirido por seres humanos através da inalação de esporos ou leveduras nos pulmões. Por essa razão é proposto que os macrófagos alveolares são os primeiros na linha de defesa contra criptococose. Estudos experimentais sugerem que os macrófagos desempenham um papel muito importante na defesa do hospedeiro contra a infecção causada por este patógeno. Entre os fatores responsáveis pela virulência nesse patógeno, temos a produção da cápsula polissacarídica e a capacidade de sintetizar melanina. Foi demonstrado que a formação de cápsulas está ligada a funções antifagocíticas e imunomoduladoras, enquanto que a melanina está envolvida na proteção desta levedura de fatores tóxicos, ambientais e do hospedeiro (O'Meara e Alspaugh, 2012; Wager *et al.*, 2016; May *et al.*, 2016).

### **1.5. A secreção cutânea de anuros como fonte de peptídeos antimicrobianos**

Os anfíbios são representados por 7.888 espécies, das quais 6.958 espécies pertencem a Ordem Anura (Frost, 2018). O Brasil ocupa uma posição de grande destaque com 1.080 espécies de anfíbios conhecidos (Segalla *et al.*, 2016), seguido pela Colômbia e pelo Equador. Cerca de 50% desse total ocorre em regiões neotropicais, onde colonizam ecossistemas variados.

A pele dos anfíbios é extremamente sensível e fundamental para o equilíbrio de fluidos, respiração e transporte de íons. Além disso, estas funções fisiológicas estão integradas à defesa imunológica também desempenhada por compostos secretados por glândulas da pele desses animais (Nascimento *et al.*, 2003; Rollins-Smith *et al.*, 2005).

Nos anuros, há pelo menos dois tipos de glândulas dérmicas denominadas mucosas e granulosas, além das glândulas paratóides localizadas em região posterior aos olhos da maioria dos anuros. As glândulas mucosas são menores, distribuem-se por todo o corpo e são responsáveis por manter a pele úmida, propiciando a respiração cutânea. As glândulas granulosas sintetizam e armazenam vários compostos químicos, incluindo peptídeos com ampla atividade antimicrobiana, sendo responsáveis pela imunidade inata, que protege o animal dos microrganismos patogênicos (Nascimento *et al.*, 2003; Conlon *et al.*, 2014).

Há um crescente interesse neste táxon, principalmente devido aos recentes declínios e extinções populacionais que comprometem quase 1/3 das espécies. Mas também devido à presença de compostos químicos na pele desses animais de grande relevância farmacológica (Gomes *et al.*, 2007; Xu e Lai, 2015). Dentre tais compostos, os peptídeos antimicrobianos têm atraído a atenção da comunidade científica como possíveis agentes terapêuticos no combate à infecções promovidas por bactérias que apresentam resistência aos antibióticos atualmente disponíveis comercialmente (Conlon *et al.*, 2005; Conlon *et al.*, 2014).

Os peptídeos antimicrobianos apresentam como principal característica a natureza catiônica e a capacidade de permeabilizar membranas de microrganismos. Alguns exemplos de peptídeos isolados da pele de anuros são: a bombinina, descrita como um peptídeo antibacteriano e hemolítico, isolada da secreção da pele do anfíbio *Bombina variegata*; a xenopsina e a ceruleína, extraídos de *Xenopus laevis*; além dos peptídeos esculentinas, brevininas,

ranalexinas, rugosinas e temporinas obtidos a partir da secreção de espécies do gênero *Rana* (Xu e Lai, 2015). As secreções do gênero *Phyllomedusa* possuem potentes agentes antimicrobianos, denominados dermaseptinas, que apresentam amplo espectro de atividade antimicrobiana (Azevedo Calderon *et al.*, 2011).

### **1.6. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)**

Os peptídeos antimicrobianos (ou PAMs) são produzidos pelas glândulas granulosas de anfíbios e são moléculas consideradas de baixa massa molecular (entre 1 e 3 kDa) que conseguem se inserir facilmente nas membranas lipídicas. Os peptídeos antimicrobianos podem ser encontrados em diferentes grupos taxonômicos sendo detectados em microrganismos, plantas e animais (Vale *et al.*, 2014). A síntese e a liberação de peptídeos antimicrobianos de glândulas granulosas de anuros são consideradas parte da imunidade inata envolvida na proteção contra patógenos microbianos (Conlon *et al.*, 2014).

Os mecanismos de ação dos PAMs dependem da sua capacidade de interagir com as membranas biológicas ou paredes celulares. Geralmente, os PAMs apresentam uma carga positiva líquida e uma alta proporção de aminoácidos hidrofóbicos, que permite a sua ligação seletiva com as membranas bacterianas que são carregadas negativamente (Zhang e Gallo, 2016).

Os PAMs são moléculas compostas por 10-50 resíduos de aminoácidos e dispostos em diferentes grupos dependendo da sua composição de aminoácidos, extensão e conformação (Nakatsuji e Gallo, 2012; Zhang e Gallo, 2016), podendo ser divididos em três classes principais: 1) Peptídeos que adotam folhas- $\beta$  que contém resíduos de cisteínas e formam ligações de dissulfeto; 2) Peptídeos sem resíduos de cisteína que adotam conformações anfipáticas em  $\alpha$ -hélice ao entrar em contato com a membrana do microorganismo alvo; e 3) Peptídeos com estruturas estendidas ou em *loop*, lineares sem resíduos de cisteína e contendo elevada proporção de resíduos de prolina, arginina, glicina, triptofano e histidina (Lewies *et al.*, 2015) (Figura 1).

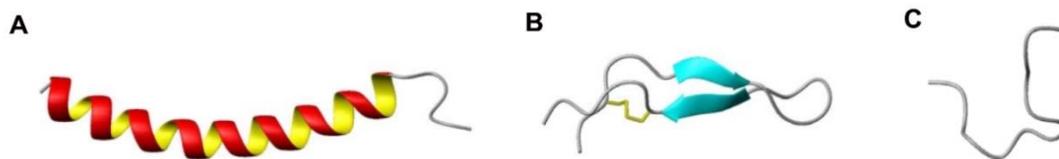


Figura 1. Modelos representando as diferentes classes estruturais de PAMs. A) Peptídeo com estrutura em  $\alpha$ -hélice (catelicidina humana, código PDB 2K60). B) Peptídeo com estrutura em folha beta (lactoferricina, código PDB 1LFC). C) Peptídeo estendido (indolicidina, código PDB 1G89). (Figura adaptada de Jenssen, 2009).

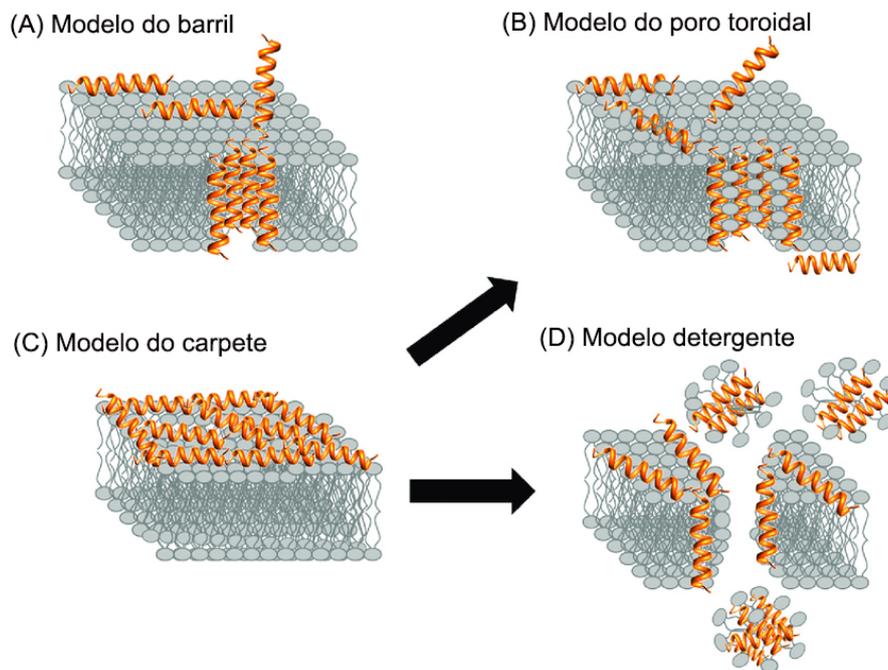
### 1.7. Mecanismos de resistência contra PAMs

Os peptídeos antimicrobianos podem ser encontrados em diversas fontes na natureza como em fungos, plantas, animais vertebrados e invertebrados. Diversos estudos já demonstraram serem raros os episódios de resistência aos PAMs, tornando-os excelentes candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos. Entretanto, uma vez que os microrganismos estão em constante contato com PAMs, mecanismos de resistência começam a ser descritos. Os mecanismos de resistência mais comuns são: o remodelamento da superfície bacteriana que empregam enzimas celulares, de forma a tornar suas membranas celulares menos eletronegativas; a produção de cápsula polissacarídica que impede que os PAMs cheguem ao seu alvo com o enrijecimento da membrana celular externa; degradação dos peptídeos por atividade proteolítica mediada por proteases produzidas pelos patógenos; efluxo dos peptídeos por meio de bombas ou transportadores e seqüestro dos peptídeos por moléculas secretadas pelos patógenos (Guilhelmelli *et al.*, 2013; Joo *et al.*, 2016).

Os peptídeos antimicrobianos estão em constante evolução e essas mudanças rápidas dos PAMs fazem parte de um processo dinâmico de co-evolução em que o patógeno apresenta mecanismos de resistência a esses PAMs e o hospedeiro, em contrapartida, altera seu repertório de PAMs para combater de forma mais eficiente os microrganismos. Esse processo evolutivo favoreceu os peptídeos que apresentam múltiplos alvos, ao invés de moléculas com alta afinidade a um alvo específico. Essa estratégia permite que o hospedeiro controle a infecção sem criar uma pressão seletiva específica para determinado alvo, como ocorre para patógenos altamente resistentes a antibióticos que são muito específicos para apenas um único tipo de alvo (Peschel e Sahl, 2006).

Alguns modelos de ação dos PAMs sobre as membranas bacterianas foram propostos. Dentre esses, quatro destacam-se como principais: 1) modelo do carpete, 2) modelo do barril, 3) modelo do poro toroidal e 4) modelo detergente (Rashid *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018) (Figura 2).

No primeiro modelo citado, os PAMs se acumulam paralelamente à membrana para que essa seja rompida através da formação de poros ou através da formação de micelas com fragmentos de membrana (Rashid *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018). No modelo do barril, os PAMs se inserem na membrana bacteriana e se orientam lado a lado formando um poro em forma de barril, o qual pode agir como um canal para a passagem excessiva de íons aleatórios, levando à morte celular (Rashid *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018). A formação do poro toroidal se dá de forma similar, todavia, nesse modelo há o dobramento da membrana devido à inserção dos PAMs nesta, gerando um poro composto por PAMs e lipídios intercalados (Rashid *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018). No modelo detergente, com a agregação dos PAMs sobre a membrana celular, há o aumento na sua concentração local. A alta concentração de PAMs, associada ao caráter anfipático destes, possibilita que os PAMs atuem como um detergente sobre a membrana, rompendo-a em pequenas estruturas ou micelas (Rashid *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018).



**Figura 2. Principais modelos de mecanismos de ação dos PAMs sobre membranas biológicas. (A) Modelo do barril. (B) Modelo do poro toroidal. (C) Modelo do carpete (D) Modelo detergente. (Figura adaptada de Kumar *et al.*, 2018).**

Um outro mecanismo de resistência está relacionado com a formação de biofilmes bacterianos. Os biofilmes bacterianos são um conjunto de células associadas pela sua superfície e mergulhadas em uma matriz composta principalmente por proteínas extracelulares, DNA e exopolissacarídeos (Otto, 2013). Bactérias em biofilmes são mais resistentes aos PAMs, pois as mudanças na expressão gênica nas células do biofilme, na arquitetura de biofilme e na natureza da matriz de exopolímero pode causar repulsão dos PAMs, que não conseguirão se aproximar das células ou serão até mesmo imobilizá-los uma vez que entrem no biofilme, impedindo que cheguem até as células bacterianas (Whiteley e Lee, 2015).

### **1.8. *Boana lundii***

O gênero *Boana* possui 92 espécies descritas até o momento, as quais se encontram distribuídas em grande parte na América do Sul sendo encontradas em florestas de galeria (Frost, 2018). Esse gênero está incluído na família Hylidae que apresenta 711 espécies, sendo uma família bem estudada em termos bioquímicos com o isolamento de vários peptídeos antimicrobianos como as dermaseptinas (Azevedo Calderon *et al.*, 2011).

A espécie investigada neste trabalho foi *Boana lundii* (Burmeister, 1856), que é um anuro de pequeno porte, terrestre ou semi-aquático que possui como característica dedos terminados em ventosas que fazem com que eles possam se prender a superfícies verticais, sendo amplamente distribuída pelo Cerrado brasileiro (Frost, 2018). Até recentemente, a espécie *B. lundii* era identificada pela denominação *Hypsiboas lundii*, o mesmo ocorrendo com várias espécies do gênero *Hypsiboas* (Dubois, 2017).

Como a secreção cutânea dessa espécie em particular ainda é pouco conhecida quanto à sua composição química e farmacológica, salvo o trabalho realizado por nosso grupo por meio do qual foram identificados e caracterizados dois peptídeos hemolíticos, as hiliinas b1 e b2 (Castro *et al.*, 2005), no presente estudo decidimos proceder à purificação e a caracterização estrutural de peptídeos antimicrobianos inéditos presentes nessa secreção.



Figura 3. Indivíduo adulto da espécie *Boana lundii* (Imagem disponível em: <https://www.lafuc.com/hypsiboas-lundii>).

## 2. JUSTIFICATIVA

Ao longo dos últimos 30 anos, diversos estudos têm comprovado a importância da preservação e exploração racional da biodiversidade, já que diversas espécies animais e vegetais são fontes de produtos bioativos que poderão ser de grande importância para a saúde humana (Bernarde e Santos, 2009). A secreção cutânea dos anfíbios possui diversas funções, entre as quais estão as atividades antimicrobianas, responsáveis pela defesa do indivíduo contra infecções de microrganismos. A membrana plasmática parece ser o principal alvo de ação dos peptídeos antimicrobianos e muitos dos seus efeitos estão relacionados às alterações no balanço osmótico celular e nas propriedades funcionais da membrana plasmática, resultando em morte celular (Conlon *et al.*, 2014).

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de mortalidade no mundo devido à resistência dos microrganismos aos antibióticos atualmente disponíveis. Em contraste aos antibióticos convencionais, que inviabilizam ou matam bactérias em um período de dias, os peptídeos antimicrobianos, por agirem instantaneamente, reduzem a taxa de multiplicação o que torna o microrganismo menos resistente às drogas convencionais (Blondelle e Lohner, 2000; Nascimento *et al.*, 2003; Conlon *et al.*, 2014).

Considerando a presença de peptídeos nas secreções cutâneas de várias espécies de anuros, o presente projeto teve como objetivo identificar, purificar e caracterizar química e biologicamente peptídeos inéditos presentes na secreção cutânea do anuro *Boana lundii* com ênfase na prospecção de peptídeos antimicrobianos para aplicações terapêuticas. A presente pesquisa é uma boa oportunidade para o avanço na caracterização das propriedades antimicrobianas e antiparasitárias dos principais compostos ativos presentes nessa secreção.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Realizar a identificação, o isolamento e a caracterização química e biológica de peptídeos antimicrobianos inéditos presentes na secreção cutânea do anuro *Boana lundii* (Anura: Hylidae).

#### **3.2. Objetivos específicos**

**3.2.1.** Identificar, isolar e caracterizar quimicamente peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea de *B. lundii*;

**3.2.2.** Determinar a composição de elementos de estrutura secundária dos peptídeos identificados e isolados da secreção cutânea de *B. lundii* com o emprego da técnica de difração circular;

**3.2.3.** Determinar os efeitos antibacterianos dos peptídeos identificados e isolados da secreção cutânea de *B. lundii* sobre bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas por meio da determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI).

**3.2.4.** Determinar os efeitos antiparasitários dos peptídeos identificados e isolados da secreção cutânea de *B. lundii* sobre formas epimastigotas do protozoário *Trypanosoma cruzi*.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Secreção cutânea de *B. lundii***

As secreções cutâneas empregadas no presente estudo fazem parte do Banco de Secreções do Laboratório de Toxinologia, sendo que os espécimes adultos da espécie *B. lundii* foram coletados em excursões, realizadas durante o período noturno, no município de Monte Alegre de Goiás. Todas as coletas foram realizadas sob licença do ICMBIO (licença SISBIO Nº 51541-1). As secreções cutâneas empregadas foram obtidas por meio da aplicação de corrente elétrica branda alternada, com eletrodos envolvidos em algodão umedecido em solução 0,25% de NaCl. A secreção foi recolhida por lavagem da região estimulada com água Milli-Q, congelada, liofilizada e armazenada a -20°C até a sua utilização.

### **4.2. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de *B. lundii***

Alíquotas individualizadas da secreção liofilizada (2,0 mg) foram dissolvidas em TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q, centrifugadas e fracionadas em coluna de RP-HPLC de tipo C<sub>18</sub> (Vydac 218TP54, Separations Group, USA). Um gradiente linear de TFA 0,1 % (v/v) em acetonitrila foi empregado na eluição. A detecção ao UV foi monitorada a 216 nm. As frações eluídas foram coletadas manualmente, secadas a vácuo e armazenadas a -20°C.

### **4.3. Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF**

As frações cromatográficas que exibiram atividade inibitória sobre o crescimento das bactérias *E. coli* e *S. aureus* (como descrito na seção 4.9 na parte referente ao ensaio de varredura) foram analisadas *off-line* em um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF, modelo Autoflex II (Bruker, Alemanha), operado no modo positivo e com uso de *reflectron* para aumento de resolução de modo a se determinar o grau de homogeneidade e as massas moleculares dos componentes presentes.

### **4.4. Determinação da estrutura primária dos peptídeos de *B. lundii***

A estrutura primária dos peptídeos purificados foi determinada por degradação de Edman em seqüenciador automático PPSQ-33A (Shimadzu, Japão), de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.5. Bioinformática

O algoritmo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990) foi utilizado para buscas de similaridade nos bancos de dado; o Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers *et al.*, 2011) foi usado para o alinhamento de sequências e o aplicativo em NetWheel (<http://lbqp.unb.br/NetWheels/>) para projeções helicoidais dos peptídeos.

#### 4.6. Síntese química dos peptídeos de *B. lundii*

Os três peptídeos isolados no presente trabalho, foram produzidos por síntese química pela empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil) empregando-se a química Fmoc (*9-fluorenil-metoxicarbonil*) com grau de pureza acima de 95%. O controle de qualidade foi realizado mediante análises por espectrometria de massas para se determinar se foram corretamente sintetizados.

#### 4.7. Dosagem dos peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintéticos obtidos foram dosados em espectrofotômetro (Bel Photonics UV/Vis M51) e empregados em todos os ensaios de avaliação das propriedades biológicas dos peptídeos de interesse.

A leitura das absorvâncias foi realizada nos comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm (Aitken e Learmonth, 2002). O cálculo que permitiu obter a concentração protéica em µg/mL a partir das medidas de absorvância está descrito abaixo:

$$\text{Concentração}_1 = \frac{\text{Abs}_{(205\text{nm})} \times 1000}{31} \qquad \text{Concentração}_2 = 144 \times [\text{Abs}_{(215\text{nm})} - \text{Abs}_{(225\text{nm})}]$$
$$\frac{\text{Concentração}_1 + \text{Concentração}_2}{2} = \text{Concentração da alíquota analisada}$$

O volume total do estoque de cada peptídeo foi alíquotado em tubos tipo *eppendorf* de 1 mL, que posteriormente foram secos a vácuo (SpeedVac modelo SC 100, Savant).

#### 4.8. Análise da estrutura secundária dos peptídeos de *B. lundii* por dicroísmo circular

Para realizar as análises de dicroísmo circular foi utilizado o espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Analytical Instruments, Tóquio, Japão) e cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 0,1 cm. Os espectros de UV foram obtidos à temperatura constante de 25°C nos comprimentos de onda entre 190 e

260 nm com o resultado calculado a partir da média de cinco leituras em sequência de cada amostra.

Os espectros dicróicos foram gerados a partir das soluções peptídicas a 50 µM em água e a 50 µM em SDS (dodecilsulfato de sódio) na concentração de 35 mM. A elipticidade molar foi calculada a partir da conversão das elipticidades observadas através da equação abaixo:

$$[\theta] = \frac{(\theta \times 100 \times M)}{(C \times l \times n)}$$

Onde  $[\theta]$  é a elipticidade molar média dada em grau.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>.  $\theta$  é a elipticidade em graus,  $M$  é a massa molecular,  $C$  é a concentração em mg/mL,  $l$  é o caminho óptico em cm e  $n$  número de resíduos.

Os percentuais de helicidade foram calculados tendo como base as elipticidades molares a 208 nm.

$$f_H = \frac{[\theta]_{208} - 4000}{33\,000 - 4000}$$

#### **4.9. Avaliação da atividade antibacteriana**

Linhagens de bactérias obtidas do estoque de células do Banco de Culturas do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília foram cultivadas em 7 mL de meio Mueller-Hinton, sob agitação, a 37°C, durante 16 horas. Quando a densidade óptica a 595 nm atingiu o valor de 1.0, cada suspensão bacteriana foi diluída em meio Mueller-Hinton fresco, nas proporções de 1:50 para bactérias Gram-negativas e 1:100 para Gram-positivas. As amostras foram solubilizadas em água Milli-Q estéril e incubadas com a suspensão bacteriana diluída, numa proporção de 1:1 (v/v), em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato).

Como controle representativo da ausência de crescimento bacteriano foi realizada a incubação de formaldeído 0,8% (v/v) com a suspensão bacteriana e, como controle representativo do crescimento máximo, foi feita a incubação da suspensão bacteriana com água Milli-Q estéril.

O ensaio de varredura foi realizado empregando-se as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, a fim de verificar quais componentes resultantes do fracionamento da secreção de *B. lundii*

apresentavam atividade inibitória sobre o crescimento bacteriano. Cada fração cromatográfica de uma corrida de RP-HPLC foi solubilizada em água Milli-Q e incubada com a suspensão bacteriana, de acordo com o método descrito acima.

De posse dos peptídeos bioativos purificados foram realizadas determinações da concentração mínima inibitória (CMI) para diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de interesse médico. Alíquotas de 50 µL de diluições seriadas de cada peptídeo puro, feitas a partir de uma solução-estoque 256 µM esterilizada por filtração em filtros Millex® GV 0,22 µm (Merck, Alemanha), foram incubadas com 50 µL de suspensão bacteriana, contendo de 2 a 7 x 10<sup>5</sup> UFCs, dependendo da linhagem bacteriana empregada. A faixa de concentração testada foi de 128 a 1,0 µM. Os poços com formaldeído foram cobertos com Parafilm® para evitar interferência nos demais poços em virtude da sua evaporação. As placas foram incubadas a 37°C por 20-24 horas e a inibição do crescimento bacteriano foi avaliado por leitura espectrofotométrica a 595 nm em leitora de microplacas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, San Jose, CA). Os ensaios foram realizados em triplicata e o valor determinado para CMI corresponde à menor concentração de peptídeo em que não houve crescimento bacteriano espectrofotometricamente detectável.

#### **4.10. Avaliação da atividade antifúngica**

Alíquotas de 200 µL de suspensão dos fungos a serem testados (*Candida albicans* ATCC 14053 e *Cryptococcus neoformans* H99) foram adicionadas a 7 mL de meio BHI (*Brain Heart Infusion*) em um tubo plástico de 15 mL. O tubo, então, foi incubado entreaberto em um *shaker* a 37°C durante 16 horas, com agitação constante. Em seguida, foi avaliado o crescimento celular por meio de detecção a 595 nm em espectrofotômetro (UV-M51, Bel Photonics, Brasil) e as suspensões foram ajustadas para um valor próximo a 1 com a adição de meio BHI. Após esse ajuste, foram preparados os inóculos (diluição 1:100 em meio BHI). As soluções-estoque dos peptídeos na concentração de 256 µM foram preparadas em água Milli-Q e filtradas em filtros Millex de 0,22 µm (Merck Millipore Corporation, Alemanha). Posteriormente foi realizada diluição seriada das amostras em água Milli-Q e adicionados 50 µL da suspensão fúngica previamente diluída. A faixa de concentração testada foi de 128 a 1,0 µM. Como controle negativo foi utilizada apenas água Milli-Q e como controle positivo foi empregado formaldeído 0,4% (v/v) (concentração final). Cada peptídeo foi testado em triplicata,

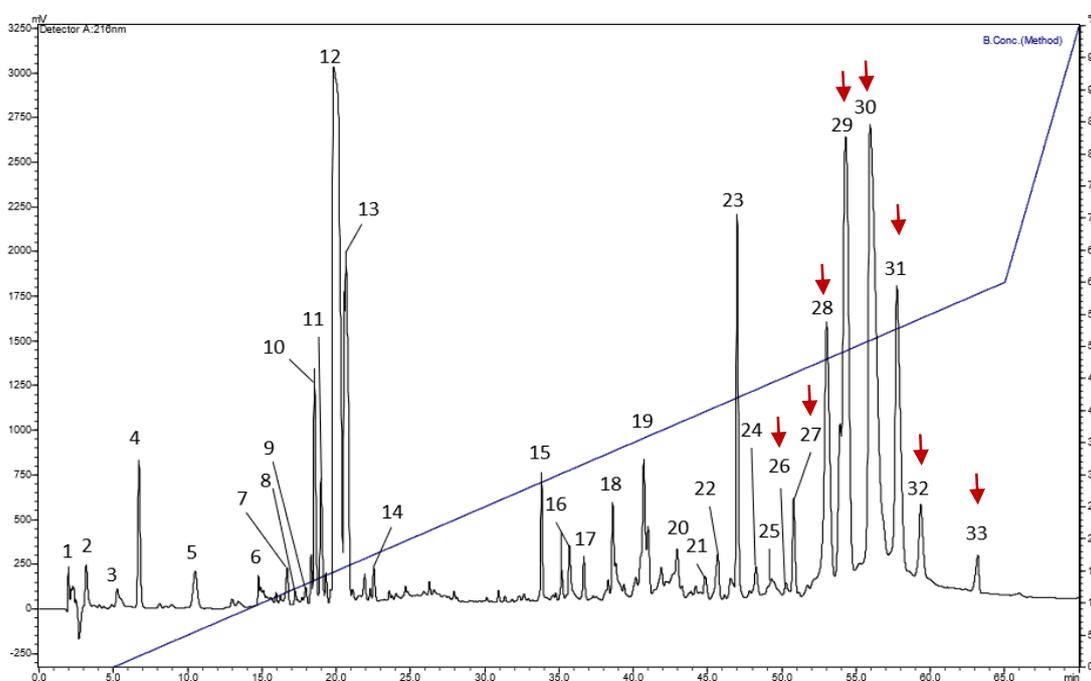
assim como os controles. Os poços com formaldeído foram cobertos com Parafilm® para evitar interferência nos demais poços em virtude da sua evaporação. As placas foram incubadas a 37°C por 20-24 horas e a inibição da proliferação fúngica foi avaliada por leitura espectrofotométrica a 595 nm em leitora de microplacas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, San Jose, CA). A concentração mínima inibitória (CMI) foi assumida como sendo a menor concentração na qual não houve crescimento espectrofotometricamente detectável.

#### **4.11. Ensaios sobre formas epimastigotas de *T. cruzi***

As culturas de formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa CL-Brener) foram cultivadas a 28°C em estufa, em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*), contendo 10% de SFB (soro fetal bovino, que é a fração líquida do sangue coagulado do feto bovino, contendo grande quantidade de nutrientes celulares). Resumidamente, as culturas foram crescidas até que a densidade celular de  $10^7$  parasitos/mL fosse atingida. Cem microlitros da suspensão de parasita a  $5 \times 10^6$  parasitas/mL foram incubados em microplacas de 96 poços para leitura de fluorescência com um volume igual dos peptídeos, diluídos em série (128 a 1,0  $\mu$ M) em meio LIT, por 96 horas, para avaliação da ação inibitória sobre o crescimento dos protozoários. Depois deste tempo, foram transferidos 100  $\mu$ L de cada poço da placa transparente para uma placa branca e fosca e foram adicionados 20  $\mu$ L de CellTiter-Blue® (Promega, EUA) para avaliação dos efeitos antiparasitários. A viabilidade parasitária foi determinada por fluorescência a 560 nm (excitação) e 590 nm (emissão), após 1 hora de incubação a 37°C, em uma leitora de microplacas (SpectraMax® M5 Microplate Reader, Molecular Devices, EUA). Como controle positivo, foi utilizado o composto Nifurtimox. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## 5. RESULTADOS

Alíquotas de 2,0 mg de secreção cutânea bruta de *B. lundii* foram fracionadas em RP-HPLC em uma coluna C<sub>18</sub> (Figura 4). Essa secreção mostrou-se, em geral, bastante diversificada, resultando na eluição de, aproximadamente, 33 frações cromatográficas obtidas com o monitoramento da absorvância a 216 nm e cada fração foi coletada manualmente para realização do ensaio de varredura para detecção das frações com propriedades inibitórias sobre o crescimento de bactérias patogênicas. O perfil cromatográfico assemelhou-se ao obtido por Castro *et al.* (2005) que realizaram o fracionamento prévio dessa mesma secreção cutânea, embora empregando condições cromatográficas distintas.



**Figura 4.** Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *B. lundii* em uma coluna C<sub>18</sub> (Vydac 218TP54) em sistema HPLC com um fluxo de 1 mL/min e monitoramento realizado a 216 nm. As frações que apresentaram atividade biológica (antibacteriana) estão identificadas por setas vermelhas.

O ensaio de varredura para identificação das frações com atividade antimicrobiana foi realizado com a incubação das frações cromatográficas eluídas com as bactérias patogênicas de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva) de modo a se determinar sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano (Tabelas 1 e 2).

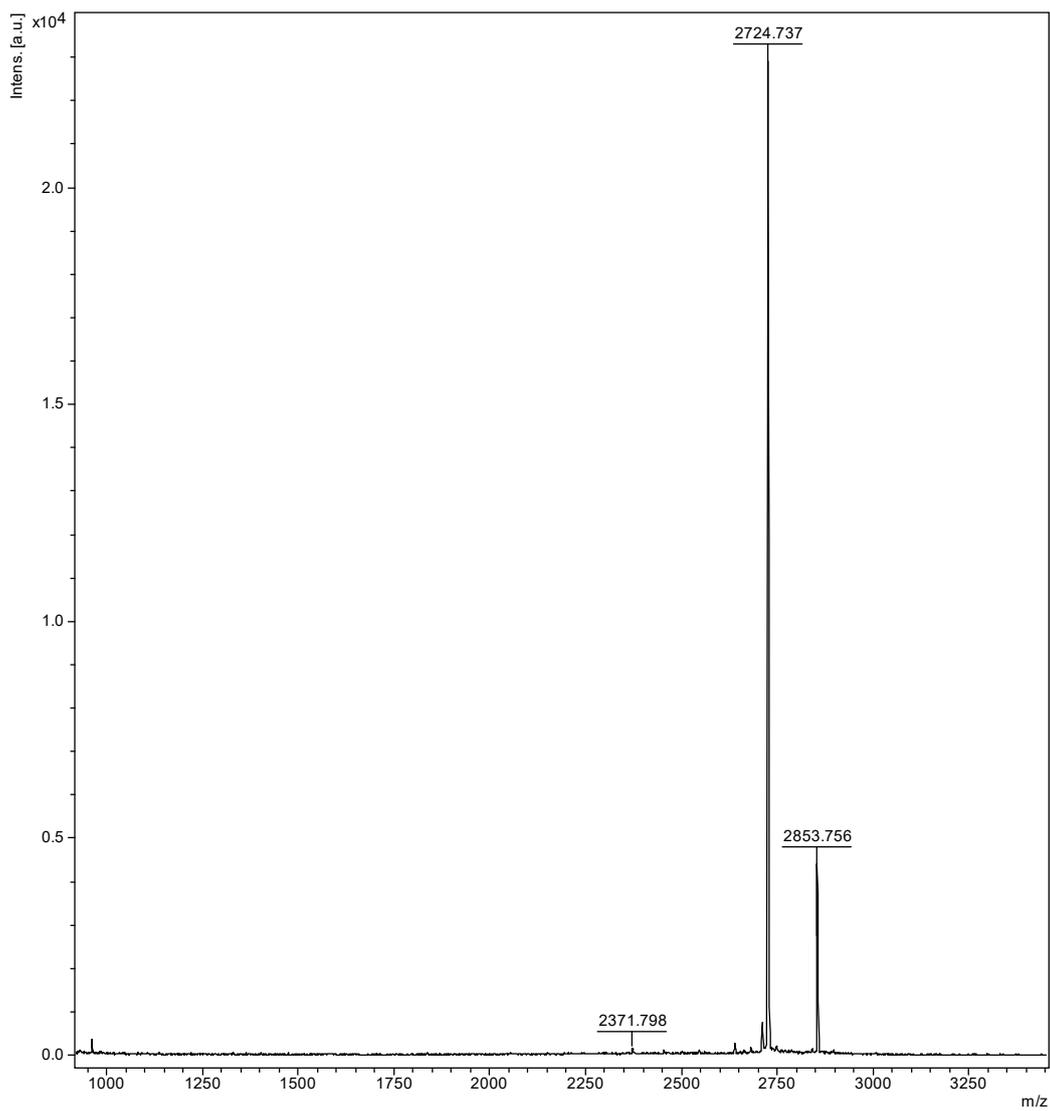
**Tabela 1. Leituras espectrofotométricas a 595 nm obtidas com a incubação por 18 h das frações cromatográficas resultantes do fracionamento da secreção bruta de *B. lundii* e dos controles (água e formaldeído 0,4%) com a bactéria Gram-negativa *E. coli*. As frações que exibiram atividade inibitória relevante estão assinaladas em amarelo.**

Fração cromatográfica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Absorvância a 595 nm	0.5919	0.3704	0.4438	0.5172	0.4630	0.4576	0.4340	0.5306	0.4310	0.5302	0.4772	0.3993
Fração cromatográfica	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Absorvância a 595 nm	0.3447	0.4000	0.4188	0.4178	0.5359	0.5078	0.4117	0.5468	0.5395	0.4779	0.5489	0.6619
Fração cromatográfica	25	26	27	28	29	30	31	32	33			
Absorvância a 595 nm	0.4433	0.4842	0.0468	0.0543	0.1033	0.0899	0.0498	0.5685	0.4677			
Controles	C+	0.5771	0.5680	0.6003					C-	0.0438	0.0483	0.0485

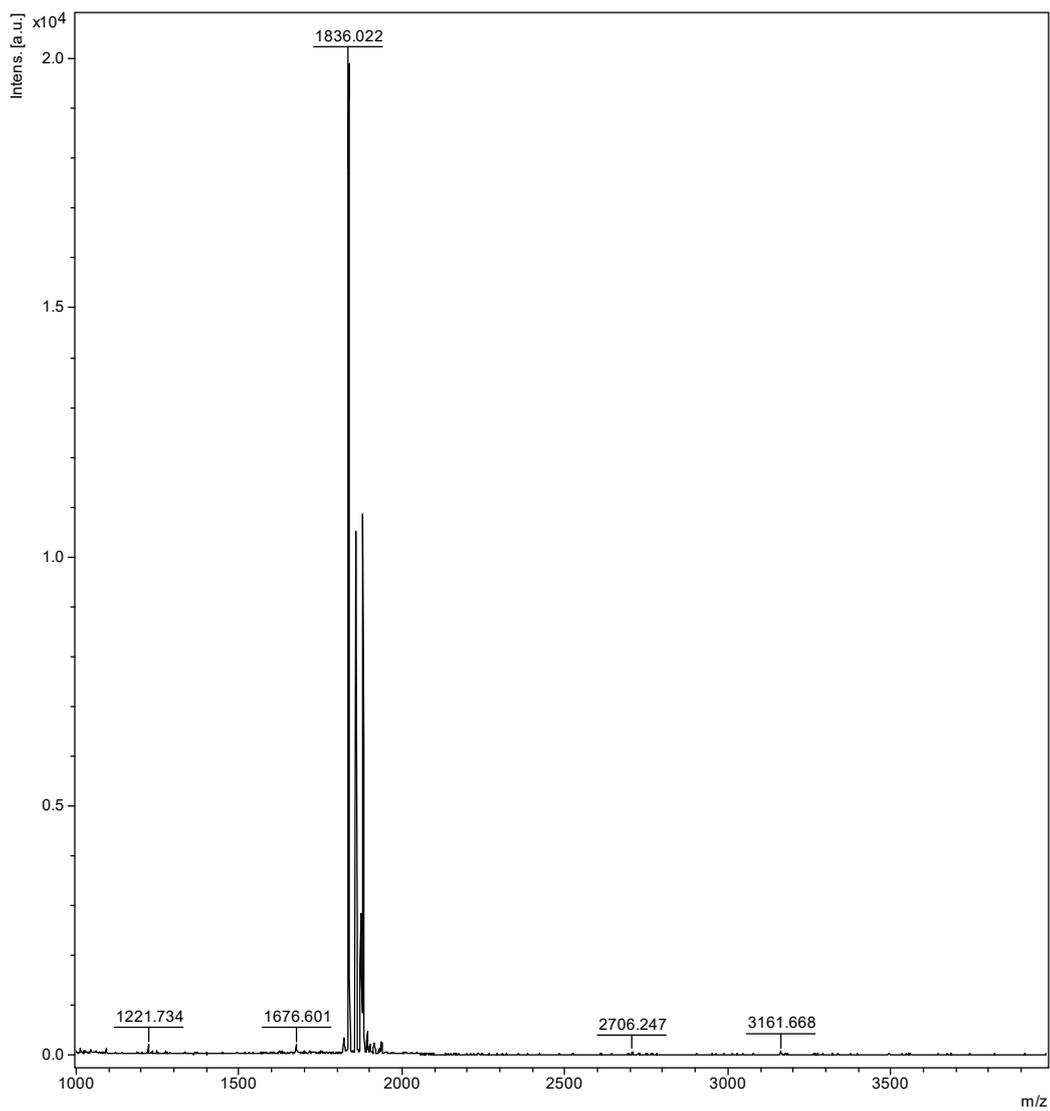
**Tabela 2. Leituras espectrofotométricas a 595 nm obtidas com a incubação por 18 h das frações cromatográficas resultantes do fracionamento da secreção bruta de *B. lundii* e dos controles (água e formaldeído 0,4%) com a bactéria Gram-positiva *S. aureus*. As frações que exibiram atividade inibitória relevante estão assinaladas em amarelo.**

Fração cromatográfica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Absorvância a 595 nm	0.5846	0.4228	0.4628	0.5401	0.5909	0.5452	0.5999	0.4041	0.5357	0.5861	0.6001	0.7391
Fração cromatográfica	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Absorvância a 595 nm	0.4896	0.5592	0.3633	0.6369	0.4925	0.5309	0.5004	0.5558	0.5074	0.5233	0.5558	0.8328
Fração cromatográfica	25	26	27	28	29	30	31	32	33			
Absorvância a 595 nm	0.4145	0.0593	0.0535	0.0634	0.0845	0.0991	0.0532	0.0520	0.7424			
Controles	C+	0.7382	0.6865	0.7816					C-	0.0421	0.0940	0.0422

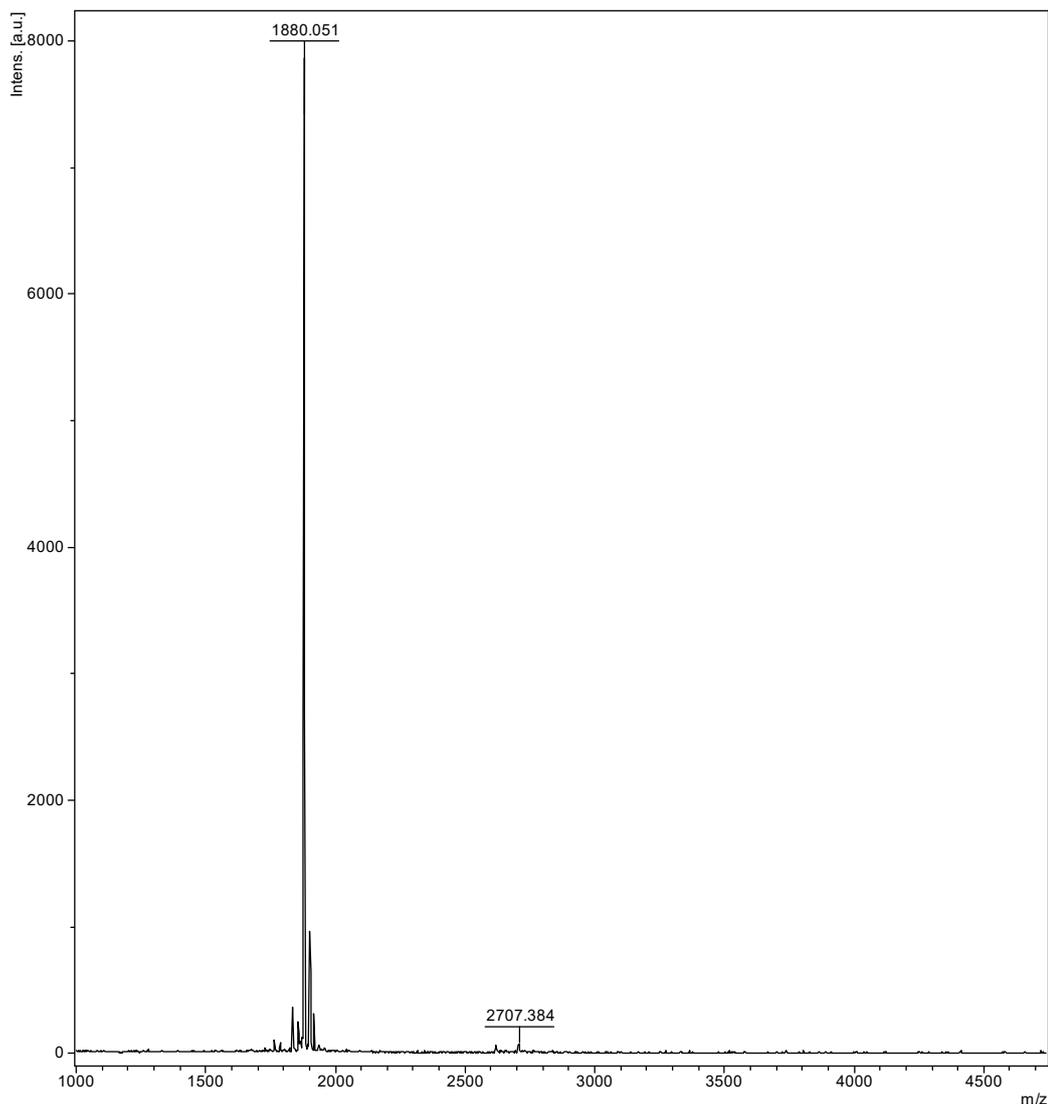
Cinco frações (27 a 31) apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento da bactéria Gram-negativa *E. coli* e sete delas (frações 26 a 32) sobre o patógeno Gram-positivo *S. aureus*. Essas frações foram submetidas à análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF de modo a se determinar o seu grau de homogeneidade, bem como as massas moleculares monoisotópicas dos principais componentes peptídicos presentes. Três frações apresentaram-se com alto grau de homogeneidade, sendo que a fração 28 apresentou um componente principal com massa molecular protonada igual a 2724,74 Da (Figura 5); a fração 29 apresentou um componente principal com massa molecular protonada igual a 1836,02 Da (Figura 6) e a fração 30 apresentou massa molecular protonada de 1880,05 Da (Figura 7).



**Figura 5. Espectro de massas da fração 28 obtida em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico).**



**Figura 6. Espectro de massas da fração 29 obtida em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico).**



**Figura 7. Espectro de massas da fração 30 obtida em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico).**

Seus grau de homogeneidade foram considerados satisfatórios e essas três frações foram submetidas ao procedimento de sequenciamento químico por degradação de Edman.

A determinação das estruturas primárias foi possível para os três peptídeos purificados, tendo resultado nas estruturas indicadas abaixo, sendo que, no caso dos peptídeos 29 e 30 foi assumida a presença de amidação na porção C-terminal, tendo em vista a diferença de 1 Da a menos entre a massa molecular teórica obtida a partir da estrutura primária elucidada por sequenciamento químico e a massa molecular experimental determinada pela análise por MALDI-MS:

Fração 28: <sup>1</sup>GFLDAVKAIGKKVVGKIAIGVAKNLLNS<sup>27</sup>.COOH  
 Fração 29: <sup>1</sup>FLGAILPALAGVIGKLING<sup>19</sup>.NH<sub>2</sub>  
 Fração 30: <sup>1</sup>FLGAVLPALAGVIGSLINR<sup>19</sup>.NH<sub>2</sub>

As sequências obtidas foram avaliadas quanto ao seu grau de similaridade com outros peptídeos antimicrobianos previamente isolados cujas estruturas primárias estão depositadas em bancos públicos de sequências por meio da realização de buscas empregando-se o algoritmo BLASTp.

O peptídeo oriundo da fração 28, com cadeia polipeptídica de 27 resíduos de aminoácidos, exibiu similaridade com o peptídeo raniseptina 3 isolado por Magalhães *et al.* (2008) a partir da secreção do anuro *Boana raniceps* (previamente classificado como *Hypsiboas raniceps*) (Figura 8).

Em virtude da similaridade encontrada entre esses dois PAMs, o peptídeo isolado da fração 28 foi denominado raniseptina-BI 1, o primeiro peptídeo tipo raniseptina isolado da espécie *Boana lundii*.

Raniseptina 3	AWLDKLSIQKVVVGKVAIGVAKNLLNPQ
Raniseptina-BI 1	GFLDAVKAIGKKVVGKIAIGVAKNLLNS-
	:** :*: * **:******

**Figura 8. Alinhamento entre o peptídeo raniseptina 3 isolado de *B. raniceps* e o peptídeo raniseptina-BI 1 isolado da secreção de *B. lundii*. Os símbolos (\*) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas.**

Os peptídeos obtidos a partir das frações 29 e 30, com cadeias polipeptídicas contendo 19 resíduos de aminoácidos cada, exibiram similaridade com os peptídeos hilina b1 e hilina b2 previamente isolados por Castro *et al.* (2005) a partir dessa mesma secreção cutânea (Figuras 9 e 10).

Em virtude da similiaridade com as hilinas, esses dois peptídeos foram denominados hilinas b3 e b4, respectivamente.

Hilina b1	FIGAILPAIAGLVHGLINR
Hilina b2	FIGAILPAIAGLVGGLINR
Hilina b3	FLGAILPALAGVIGKLING
	*:*****:***: ***

**Figura 9. Alinhamento múltiplo entre o peptídeo hilina b3 obtido com o fracionamento da secreção de *B. lundii* e as hilinas b1 e b2 previamente isoladas dessa mesma secreção. Os símbolos (\*) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas.**

Hilina b1	FIGAILPAIAGLVHGLINR
Hilina b2	FIGAILPAIAGLVGGLINR
Hilina b4	FLGAVLPALAGVIGSLINR
	*:***:***:***:~:****

Figura 10. Alinhamento múltiplo entre o peptídeo hilina b4 obtido com o fracionamento da secreção de *B. lundii* e as hilinas b1 e b2 previamente isoladas dessa mesma secreção. Os símbolos (\*) indica resíduos idênticos e (~) indica substituições conservativas.

Para um melhor entendimento sobre a possível relação estrutura-função destes peptídeos com membranas biológicas foram realizadas projeções em roda helicoidal (Figura 11) dos peptídeos de *B. lundii*.

Os peptídeos raniseptina-BI 1, hilina b3 e hilina b4 foram encontrados nas últimas frações coletadas durante o fracionamento da secreção bruta, sugerindo um alto grau de hidrofobicidade nesses três peptídeos. Pela observação da projeção helicoidal infere-se um caráter anfipático a essas moléculas o que pode favorecer suas interações com as membranas biológicas dos microrganismos.

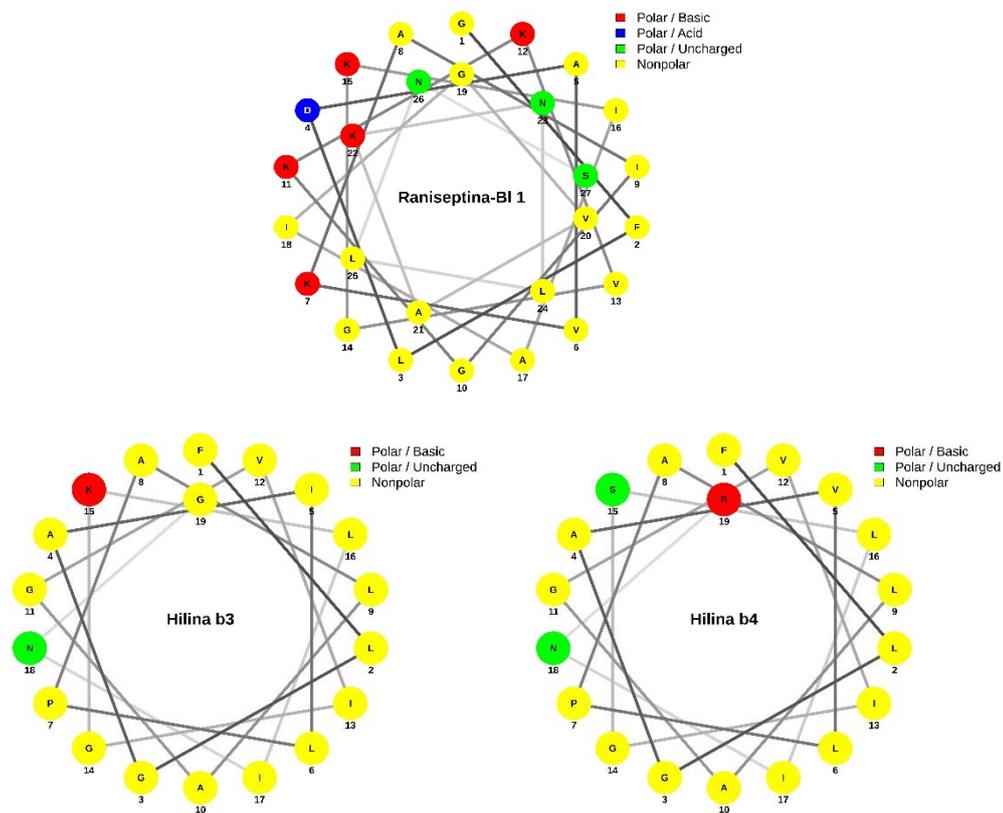


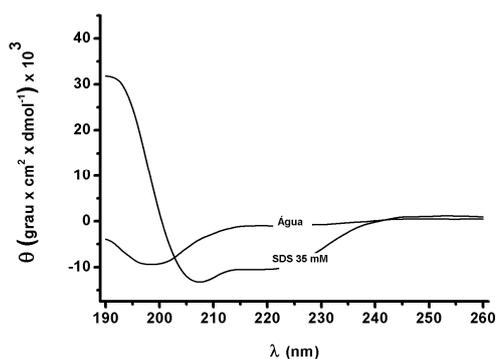
Figura 11. Projeção em roda helicoidal dos peptídeos isolados da secreção de *B. lundii*.

Versões sintéticas dos peptídeos raniseptina-BI 1, hilina b3 e hilina b4 foram empregados na caracterização dos elementos de estrutura secundária presentes nessas moléculas, assim como na determinação de suas propriedades

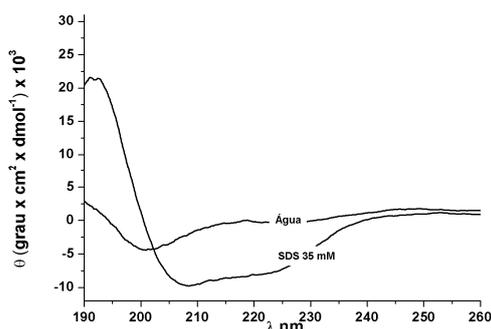
inibitórias sobre o crescimento de bactérias e fungos patogênicos, assim como do parasita *T. cruzi*.

Experimentos de dicroísmo circular foram realizados de modo a se avaliar a composição de estruturas secundárias dos três peptídeos isolados e os espectros dicroicos estão apresentados na Figura 12.

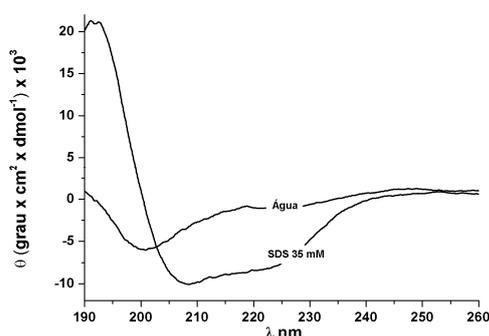
(A)



(B)



(C)



**Figura 12. Espectros dicroicos dos peptídeos isolados de *B. lundii* a 50  $\mu$ M em água e em SDS 35 mM. (A) raniseptina-BI 1, (B) hilina b3 e (C) hilina b4.**

Os espectros dicroicos para cada um dos peptídeos foram gerados em água e na presença de SDS, comumente usado para mimetizar o ambiente hidrofóbico de membranas.

Quando os peptídeos foram dissolvidos em água, apresentaram estrutura desordenada, sem preferências conformacionais. Já na presença de SDS 35 mM, que forma micelas com estruturas similares às da membrana celular de microrganismos, os três peptídeos apresentaram formação em  $\alpha$ -hélice como é possível observar pela presença característica de bandas negativas nos comprimentos de onda de 208 e 222 nm.

Os peptídeos sintéticos foram testados contra 4 bactérias e 2 fungos patogênicos. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3.

**Tabela 3. Efeitos antimicrobianos (CMIs,  $\mu\text{M}$ ) dos peptídeos isolados da secreção de *B. lundii* sobre bactérias e fungos patogênicos.**

Microrganismos	Peptídeos de <i>B. lundii</i>		
	Raniseptina-BI 1	Hilina b3	Hilina b4
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	64	n.a.
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	2	16	32
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	4	8	16
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<1	8	8
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	16	32	n.a.
<i>C. neoformans</i> H99	4	16	16

n.a. = não ativo na maior concentração empregada (128  $\mu\text{M}$ )

O peptídeo raniseptina-BI 1 foi o mais efetivo na inibição do crescimento das bactérias e fungos testados com valores de CMI bastante expressivos como o observado no caso de *S. epidermidis* com CMI < 1  $\mu\text{M}$  e sobre *K. pneumoniae* com valor de CMI = 2  $\mu\text{M}$ . Tais valores de CMI equiparam-se aos obtidos com a avaliação das propriedades antimicrobianas da raniseptina 1 (previamente isolada de *B. raniceps*) que corresponderam a 5  $\mu\text{M}$  para a *E. coli* e 20  $\mu\text{M}$  para *S. aureus* (Magalhães *et al.*, 2008)

Os peptídeos da família das hilinas, hilinas b3 e b4, mostraram-se mais ativos sobre as bactérias Gram-positivas, sendo que a hilina b3 exibiu valores de CMI iguais a 8  $\mu\text{M}$  tanto contra *S. aureus* quanto contra *S. epidermidis*, enquanto que no caso da hilina b4 os valores foram iguais a 16 e 8  $\mu\text{M}$  para as mesmas bactérias. De maneira geral, a hilina b3 mostrou-se mais ativa do que a hilina b4 que se apresentou inativa sobre a bactéria *E. coli* na maior concentração empregada (128  $\mu\text{M}$ ).

No caso dos fungos patogênicos analisados, os três peptídeos testados mostraram-se ativos sobre *C. neoformans* com valores de CMI iguais a 4  $\mu\text{M}$  (para a raniseptina-BI 1) e 16  $\mu\text{M}$  (para as hilinas b3 e b4). A levedura patogênica *C. albicans* mostrou-se mais resistente, sendo que a hilina b4 não se mostrou ativa sobre esse patógeno.

Também foram realizados ensaios para se avaliar os efeitos inibitórios desses peptídeos sobre a proliferação de formas epimastigotas do protozoário *T. cruzi* (Figura 13). Os três peptídeos apresentaram inibição parcial sobre a proliferação do parasita na maior concentração testada (128  $\mu$ M), com efeitos semelhantes sobre a viabilidade celular do parasita, com inibição de cerca de 80% na maior concentração empregada. Em concentrações menores, os três peptídeos apresentaram índices de viabilidade maiores em relação ao controle negativo, sugerindo um efeito estimulatório sobre a proliferação do parasita.

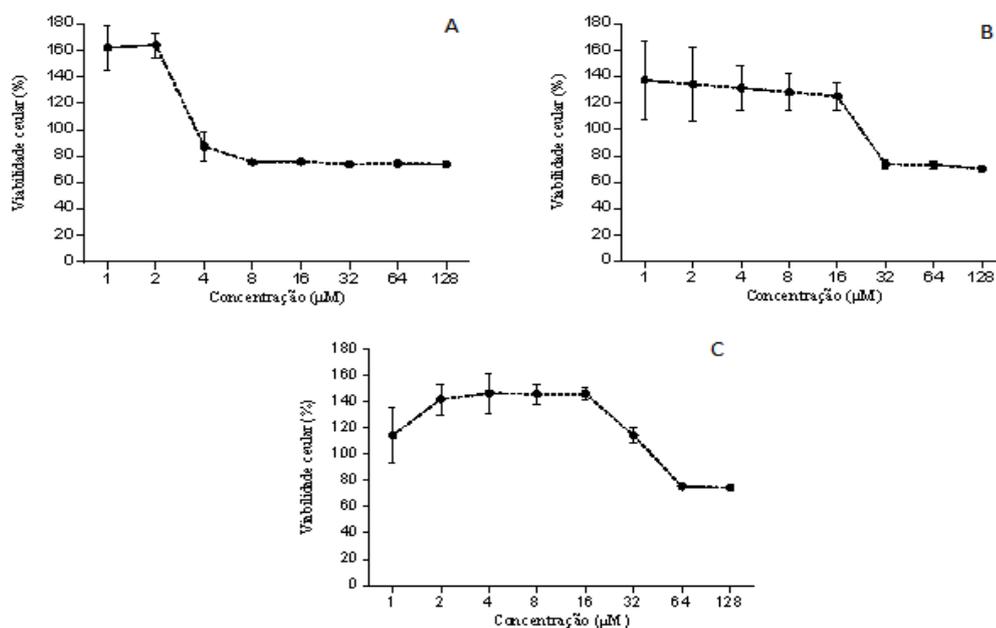


Figura 13. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* após incubação por 96 horas com os peptídeos raniseptina BI-1 (A), hilina b3 (B) e hilina b4 (C).

## 6. Discussão

Diversos estudos realizados utilizando secreções de anfíbios têm permitido o isolamento de centenas de peptídeos com diversas propriedades biológicas (Wang *et al.*, 2012; Attoub *et al.*, 2013; Xu e Lai, 2015; Marani *et al.*, 2017; Conlon *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Long *et al.*, 2018) e, dentro desse contexto, o presente trabalho resultou no isolamento e caracterização química e biológica de três peptídeos inéditos presentes na secreção cutânea da rã, endêmica do Brasil, *Boana lundii*.

A secreção cutânea de *B. lundii* exibiu elevada complexidade em sua composição em termos de conteúdos peptídicos, como pode ser inferido pela observação do perfil cromatográfico resultante do fracionamento dessa secreção com o emprego da técnica de interação hidrofóbica em coluna de fase reversa tipo C<sub>18</sub> (Figura 4), técnica comumente utilizada com o intuito de purificar peptídeos oriundos da pele de anfíbios. Tal riqueza de componentes peptídicos tem sido vastamente relatada na literatura para outras secreções da pele de diferentes espécies de anuros (Castro *et al.*, 2005; Conlon *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009; Libério *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Conlon *et al.*, 2017).

No presente estudo, o emprego da técnica de interação hidrofóbica em coluna de fase reversa tipo C<sub>18</sub> aliada à análise por espectrometria de massas e sequenciamento químico por degradação de Edman permitiram a purificação e a elucidação das estruturas primárias de três novos peptídeos com propriedades antimicrobianas sobre bactérias e fungos leveduriformes. A caracterização estrutural desses três peptídeos permitiu classificá-los como membros das famílias raniseptina e hilina.

A família das raniseptinas consiste de peptídeos antimicrobianos inicialmente isolados do anuro *Boana raniceps* (Magalhães *et al.*, 2008), enquanto que as hilinas foram isoladas das secreções das rãs *B. lundii* (Castro *et al.*, 2005) e *B. albopunctata* (Castro *et al.*, 2009). Os peptídeos de *B. lundii* isolados no presente estudo foram denominados raniseptina-BI 1, hilina b3 e hilina b4 em virtude das similaridades estruturais com outros membros das famílias raniseptina e hilina (Figura 8, figura 9 e Figura 10).

Os peptídeos raniseptina-BI 1, hilina b3 e hilina b4 apresentaram uma alta incidência dos resíduos hidrofóbicos leucina, alanina e glicina, que são

conhecidos por estabilizarem ou promoverem a formação de  $\alpha$ -hélices (Harris *et al.*, 2011).

O alinhamento das estruturas primárias da raniseptina-BI 1 com a raniseptina 3 resultou em índices de identidade de 79% e de similaridade de 83% (Figura 8). Já no caso das hilinas b3 e b4, os índices de identidade e de similaridade com as hilinas b1 e b2 também mostraram-se altos, sendo que a hilina b3 exibiu índices de identidade de 68% e de 72% e de similaridade de 73% e 77% com as hilinas b1 e b2, respectivamente. Já no caso da hilina b4, os índices observados foram de 63% e de 68% em termos de identidade e de 69% e 78% de similaridade com as hilinas b1 e b2, respectivamente.

A diferença de 1 Da entre as massas moleculares experimentais e as massas teóricas das hilinas b3 e b4 indica a presença de uma possível modificação pós-traducional correspondente à amidação na porção C-terminal. A presença de amidação na extremidade C-terminal das hilina b1 e hilina b2 foi confirmada por derivatização utilizando esterificação de Fisher e análise por espectrometria de massas dos peptídeos modificados (Castro *et al.*, 2005) e tal característica parece ser fundamental na estabilização dos elementos de estrutura secundária de PAMs ao adotarem conformação  $\alpha$ -helicoidal (da Silva *et al.*, 2014).

Os PAMs de *B. lundii* descritos no presente trabalho exibiram efeitos inibitórios sobre o crescimento de diversos patógenos, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e o protozoário *T. cruzi*. De maneira geral, os peptídeos de *B. lundii* mostraram-se mais ativos sobre bactérias Gram-positivas do que sobre os demais patógenos (Tabela 3 e Figura 13).

Geralmente os peptídeos ativos em membranas são capazes de assumir uma estrutura secundária anfipática quando em contato com as membranas biológicas. Como a parede celular bacteriana é altamente carregada negativamente, os PAMs catiônicos (que representam a maioria do PAMs já descritos) têm maior capacidade de interagir com a membrana bacteriana e de causar danos a ela (Omardien *et al.*, 2016), sendo assim a classe de PAMs mais estudada para uso terapêutico. Em termos gerais, considera-se que a interação entre as características dos peptídeos e a composição da membrana celular é o que determina a especificidade e a potência da atividade desempenhada pelo peptídeo (Lewies *et al.*, 2015).

A conformação em  $\alpha$ -hélice e a anfipaticidade são consideradas importantes para a atividade hemolítica e para a atividade sobre bactérias Gram-positivas (Rodríguez *et al.*, 2014). Além de assumirem, na maioria das vezes, conformação em  $\alpha$ -hélice, esses peptídeos são de natureza catiônica. A carga líquida positiva direciona a ligação do peptídeo à bicamada lipídica negativamente carregada dos microrganismos. Estudos feitos com membranas miméticas sugerem que o caráter catiônico dos PAMs pode ser determinante para a formação de poros nas membranas biológicas (Lee *et al.*, 2017). Isso sugere que provavelmente é a carga líquida da molécula e não a anfipaticidade que determina em grande parte a atividade citolítica das hilinas. É possível que a atividade antifúngica também seja afetada por este parâmetro, pois a hilina a1 também mostrou uma atividade considerável em várias espécies de *Candida* (Castro *et al.*, 2009).

O aumento da resistência aos medicamentos nas populações de tripanossomatídeos e a ausência de vacinas eficazes fizeram com que novas pesquisas por efetores anti-parasitários com amplo espectro de atividade, baixa toxicidade para o hospedeiro e baixa propensão a induzir resistência fossem realizadas. Os PAMs também são capazes de interagir com as membranas de protozoários, visto que eles exibem uma quantidade maior de fosfolipídios aniônicos em suas membranas celulares (Silva *et al.*, 2013), no entanto os PAMs de *B. lundii* caracterizados no presente trabalho exibiram baixo efeito sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

A característica anfipática das  $\alpha$ -hélices observadas nos PAMs de *B. lundii* (Figura 11) e em outros peptídeos antimicrobianos é crucial para a interação com a membrana celular graças ao posicionamento dos aminoácidos hidrofóbicos de um lado e os resíduo básicos dispostos do outro lado do eixo da hélice. Peptídeos helicoidais e anfipáticos geralmente se encontram desestruturados em solução e são eletrostaticamente atraídos pelos grupos negativamente carregados presentes na superfície das células, tais como ácidos teicóicos e peptidoglicanos em bactérias Gram-positivas e a camada externa rica em LPS em Gram-negativas. Com o objetivo de induzir a conformação funcional relevante para a atividade citolítica, modelos experimentais que mimetizam a membrana biológica frequentemente são utilizados como, por exemplo, o uso de micelas de SDS que estabelece um meio hidrofóbico semelhante ao encontrado

na membrana (da Silva *et al.*, 2014). Experimentos realizados com o emprego da técnica de difração circular confirmaram a formação de estrutura helicoidal nos PAMs raniseptina-BI 1, hilina b3 e hilina b4 (Figura 12).

Peptídeos lineares que são capazes de assumir uma estrutura helicoidal ativa e anfipática estão entre os mais abundantes na natureza e há alguns parâmetros físicos que se mostraram relevantes para a atividade biológica, tais como a extensão da cadeia peptídica, a sequência de resíduos de aminoácidos, a carga, o grau de estruturação (helicidade), a hidrofobicidade e anfipaticidade (Guimarães *et al.*, 2016).

A maior atividade dos peptídeos aqui avaliados sobre bactérias Gram-positivas pode estar relacionado com o fato de que a parede celular das bactérias Gram-positivas, mais grossa, ser utilizada pelos PAMs para se acumularem na membrana, facilitando sua ação. Isso se daria porque, apesar da parede celular dessas bactérias ser grossa, ela é porosa, não impedindo a passagem dos PAMs e permitindo que eles formem complexos com moléculas precursoras da parede, facilitando seu acúmulo na superfície da membrana celular (Malanovic e Lohner, 2016). Entretanto, o aumento da densidade dessa parede, com a finalidade de sequestrar moléculas nocivas à célula, é um mecanismo de defesa relativamente comum em bactérias Gram-positivas (Dorschner *et al.*, 2006; Saar-Dover *et al.*, 2012), mas que não parece ter sido suficiente para apresentar resistência semelhante às Gram-negativas contra os PAMs aqui testados.

Os peptídeos isolados da secreção cutânea de *B. lundii* descritos nesse trabalho representam um aporte inédito para esta espécie e podem contribuir para o desenvolvimento de novos modelos terapêuticos. A identificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos inéditos podem servir de inspiração para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, uma vez que o modo de ação dos peptídeos sobre as membranas bacterianas torna mais difícil a seleção de mecanismos de resistência nas bactérias, contribuindo assim para contornar o problema de resistência microbiana aos antibióticos convencionais.

O presente estudo reforça o potencial terapêutico dos PAMs isolados da secreção cutânea de anuros e evidencia a necessidade de estudos sistemáticos visando explorar adequadamente o potencial farmacológico e bioquímico da anurofauna brasileira.

## 7. CONCLUSÕES

No presente estudo foram identificados e caracterizados três peptídeos inéditos com propriedades antimicrobianas isolados da secreção cutânea do anuro *Boana lundii*.

O peptídeo com cadeia polipeptídica de 27 resíduos de aminoácidos foi denominado raniseptina-BI 1 e exibiu similaridade com o peptídeo raniseptina 3 isolado da secreção do anuro *B. raniceps*. Tal peptídeo exibiu atividade antimicrobiana relevante sobre bactérias e fungos patogênicos, merecendo destaque seus efeitos sobre as bactérias *S. epidermidis* com CMI < 1 µM e *K. pneumoniae* com valor de CMI = 2 µM. Também mostrou-se bem ativo sobre os fungos *C. neoformans* (CMI = 4 µM) e *C. albicans* (CMI = 16 µM).

Outros dois peptídeos pertencentes à família das hilinas também foram isolados e caracterizados no presente trabalho. Tais peptídeos, denominados hilinas b3 e b4, mostraram-se mais ativos sobre as bactérias Gram-positivas do que sobre as Gram-negativas. A hilina b3 mostrou-se a mais ativa dentre as duas novas hilinas isoladas, merecendo destaque sua atividade sobre as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis* com valores de CMI iguais a 8 µM e sobre o fungo *C. neoformans* com valor de CMI igual a 16 µM.

Os três peptídeos exibiram atividade inibitória parcial sobre a proliferação do parasita *T. cruzi*, sendo que nenhum dos peptídeos testados conseguiu inibir completamente a proliferação do parasita mesmo na maior concentração empregada (128 µM).

## 8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para o presente trabalho, destacamos:

- ✓ Avaliar seus efeitos hemolíticos sobre eritrócitos humanos;
- ✓ Avaliar seus efeitos antimicrobianos sobre bactérias e fungos multirresistentes;
- ✓ Avaliar seus efeitos antimicrobianos sobre outros protozoários patogênicos, como *Leishmania sp.* e *Plasmodium falciparum*;
- ✓ Avaliar os efeitos antimicrobianos dos peptídeos analisados em combinação com drogas antibióticas convencionais;
- ✓ Avaliar seus efeitos sobre vírus de interesse médico, como vírus zika, da febre amarela, da dengue e da febre chikungunya;
- ✓ Propor e produzir, por síntese química, análogos dos peptídeos isolados no presente trabalho com o objetivo de melhorar suas propriedades antimicrobianas e sua seletividade.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken, A., Learmonth, M. 1996. Protein Determination by UV Absorption. In: Walker J.M. (eds) The Protein Protocols Handbook. Humana Pres.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215(3), 403-410.
- Attoub, S., Arafat, H., Mechkarska, M., Conlon, J.M. 2013. Anti-tumor activities of the host-defense peptide hymenochirin-1B. Regul Pept. 187, 51-56.
- Azevedo Calderon, L., Silva Ade, A., Ciancaglini, P., Stábeli, R.G. 2011. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. Amino Acids. 40(1), 29-49.
- Bagnoli, F., Rappuoli, R., Grandi, G. 2018. *Staphylococcus aureus*: microbiology, pathology, immunology, therapy and prophylaxis. Springer. 540p.
- Berman, J. 2012. *Candida albicans*. Curr. Biol. 22(16), R620-R622.
- Bernarde, P.S., Santos, R.A. 2009. Utilização medicinal da secreção (“vacina-do-sapo”) do anfíbio kambô (*Phyllomedusa bicolor*) (Anura: Hylidae) por população não-indígena em Espigão do Oeste, Rondônia, Brasil. Biotermas 22, 213-220.
- Blondelle, S.E., Lohner, K. 2000. Combinatorial libraries: a tool to design antimicrobial and antifungal peptide analogues having lytic specificities for structure-activity relationship studies. Biopolymers 55(1), 74-87.
- Castro, M.S., Ferreira, T.C., Cilli, E.M., Crusca, E. Jr., Mendes-Giannini, M.J., Sebben, A., Ricart, C.A., Sousa, M.V., Fontes, W. 2009. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). Peptides 30(2), 291-296.
- Castro, M.S., Matsushita, R.H., Sebben, A., Sousa, M.V., Fontes, W. 2005. Hylins: bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the Brazilian tree-frog *Hyla biobeba*. Protein Pept. Lett. 12(1), 89-93.
- Claret, L., Miquel, S., Vieille, N., Ryjenkov, D.A., Gomelsky, M., Darfeuille-Michaud, A. 2017. The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP--dependent pathway. J. Biol. Chem. 282, 33275–33283.
- Clegg, S., Murphy, C.N. 2016. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol. Spectr. 4(1).

Conlon, J.M., Mechkarska, M., Lukic, M.L., Flatt, P.R. 2014. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. *Peptides* 57, 67-77.

Conlon, J.M., Guilhaudis, L., Leprince, J., Coquet, L., Mangoni, M.L., Attoub, S., Jouenne, T., King, J.D. 2017. Peptidomic analysis of skin secretions of the Mexican burrowing toad *Rhinophrynus dorsalis* (Rhinophrynidae: Insight into the origin of host-defense peptides within the Pipidae and characterization of a proline-arginine-rich peptide. *Peptides* 97, 22-28.

Conlon, J.M., Sonnevend, A., Jouenne, T., Coquet, L., Cosquer, D., Vaudry, H., Iwamuro, S. 2005. A family of acyclic brevinin-1 peptides from the skin of the Ryukyu brown frog *Rana okinavana*. *Peptides* 26(2), 185-190.

Conlon, J.M., Woodhams, D.C., Raza, H., Coquet, L., Leprince, J., Jouenne, T., Vaudry, H., Rollins-Smith, L.A. 2007. Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). *Toxicon* 50(4), 498-506.

Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 822–880.

da Silva, A.V., De Souza, B.M., Dos Santos Cabrera, M.P., Dias, N.B., Gomes, P.C., Neto, J.R., Stabeli, R.G., Palma, M.S. 2014. The effects of the C-terminal amidation of mastoparans on their biological actions and interactions with membrane-mimetic systems. *Biochim Biophys Acta.* 1838(10), 2357-2368.

Dorschner, R.A., Lopez-Garcia, B., Peschel, A., Kraus, D., Morikawa, K., Nizet, V., Gallo, R.L. 2006. The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides. *FASEB J.* 20(1), 35-42.

Dubois, A. 2017. The nomenclatural status of *Hysaplesia*, *Hylaplesia*, *Dendrobates* and related nomina (Amphibia, Anura), with general comments on zoological nomenclature and its governance, as well as on taxonomic databases and websites. *Binomina* 11, 1-48.

Flannagan, R.S., Kuiack, R.C., McGavin, M.J., Heinrichs, D.E. 2018. *Staphylococcus aureus* uses the GraXRS regulatory system to sense and adapt to the acidified phagolysosome in macrophages. *MBio.* 9(4), pii: e01143-18.

Fluit, A.C., Terlingen, A.M., Andriessen, L., Ikawaty, R., van Mansfeld, R., Top, J., Cohen, Stuart. J.W., Leverstein-van Hall, M.A., Boel, C.H. 2010. Evaluation of the DiversiLab system for detection of hospital outbreaks of infections by different bacterial species. *J Clin Microbiol.* 48(11), 3979-3989.

Fratamico, P.M., DebRoy, C., Needleman, D.S. 2016. Emerging approaches for typing, detection, characterization, and tradeback of *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 7, 2089.

Frost, D.R. 2018. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Disponível em: [http:// research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php](http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php). American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>.

Galiza, G.J.N., Silva, T.M., Caprioli, R.A., Barros, C.S.L., Irigoyen, N.L.F., Figuera, R.A., Lovato, M., Kommers, G.D. 2014. Ocorrência de micoses e pitioses em animais doméstico: 230 casos. *Pesq. Vet. Bras.* 34(3), 224-232.

Gomes, A., Giri, B., Saha, A., Mishra, R., Dasgupta, S.C., Debnath, A., Gomes, A. 2007. Bioactive molecules from amphibian skin: their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. *Indian J Exp Biol.* 45(7), 579-593.

Gomes, F., Teixeira, P., Oliveira, R. 2014. Mini-review: *Staphylococcus epidermidis* as the most frequent cause of nosocomial infections: old and new fighting strategies. *Biofouling.* 30, 131–141.

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

Guimarães, A.B., Costa, F.J., Pires, O.R., Fontes, W., Castro, M.S. 2016. The amazing world of peptide engineering: the example of antimicrobial peptides from frogs and their analogues. *Protein Pept Lett.* 23(8), 722-737.

Gurung, N., Ray, S., Bose, S., Rai, V. 2013. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Biomed Res. Int.* 2013, 329121.

Han, X., Bai, H., Tu, J., Yang, L., Xu, D., Wang, S., Qi, K., Fan, G., Zhang, Y., Zuo, J., Tian, M., Ding, C., Yu, S. 2015. Deletion of *luxS* further attenuates the

virulence of the avian pathogenic *Escherichia coli aroA* mutant. *Microb. Pathog.* 88, 39–47.

Harris, F., Dennison, S.R., Singh, J., e Phoenix, D.A. 2011. On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells. *Medicinal Research Research Reviews*, 33(1), 190-234.

Humphries, R.M., Linscott, A.J. 2015. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 3–31.

Hurst, C.J. 2016. The Rasputin effect: when commensals and symbionts become parasitic (3<sup>th</sup> ed). Springer. 102p.

Jenssen, H. 2009. Therapeutic approaches using host defence peptides to tackle virus infections. *Viruses* 1, 939-964.

Joo, H-S., Fu, C-I., Otto, M. 2016. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 371(1695), pii: 20150292.

Kabir, M.A., Hussain, M.A., Ahmad, Z. 2012. *Candida albicans*: a model organism for studying fungal pathogens. *ISRN Microbiology Article ID 538694*.

Kumar, P., Kizhakkedathu, J.N., Straus, S.K. 2018. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. *Biomolecules* 8(1), pii: E4.

Kwon-Chung, K.J., Fraser, J.A., Doering, T.L., Wang, Z., Janbon, G., Idnurm, A., Bahn, Y-S. 2014. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 4(7), a019760.

Lee, E.Y., Lee, M.W., Fulan, B.M., Ferguson, A.L., Wong, G.C.L. 2017. What can machine learning do for antimicrobial peptides, and what can antimicrobial peptides do for machine learning? *Interface Focus* 7, 20160153.

Leekha, S., Terrell, C.L., Edson, R.S. 2011. General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clin. Proc.* 86(2), 156–167.

Lewies, A., Wentzel, J.F., Jacobs, G.P. 2015. The potential use of natural and structural analogues of antimicrobial peptides in the fight against neglected tropical diseases. *Molecules* 20(8), 15392-15433.

Libério, M.S., Joanitti, G.A., Azevedo, R.B., Cilli, E.M., Zanotta, L.C., Nascimento, A.C., Sousa, M.V., Pires Júnior, O.R., Fontes, W., Castro, M.S. 2011. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. *Amino Acids* 40(1), 51-59.

Long, Q., Wang, L., Zhou, M., Wu, Y., Chen, T. 2018. A novel peptide Phylloseptin-PBu from *Phyllomedusa burmeisteri* possesses insulinotropic activity via potassium channel and GLP-1 receptor signalling. *J Cell Mol Med.* 22(5), 2804-2814.

Magalhães, B.S., Melo, J.A., Leite, J.R., Silva, L.P., Prates, M.V., Vinecky, F., Barbosa, E.A., Verly, R.M., Mehta, A., Nicoli, J.R., Bemquerer, M.P., Andrade, A.C., Bloch, C. Jr. 2008. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377(4), 1057--1061.

Malanovic, N., Lohner, K. 2016. Antimicrobial peptides targeting Gram-positive bacteria. *Pharmaceuticals (Basel).* 9(3), pii: E59.

Marani, M.M., Perez, L.O., de Araujo, A.R., Plácido, A., Sousa, C.F., Quelemes, P.V., Oliveira, M., Gomes-Alves, A.G., Pueta, M., Gameiro, P., Tomás, A.M., Delerue-Matos, C., Eaton, P., Camperi, S.A., Basso, N.G., de Souza de Almeida Leite, J.R. 2017. Thaulin-1: the first antimicrobial peptide isolated from the skin of a Patagonian frog *Pleurodema thaul* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) with activity against *Escherichia coli*. *Gene* 605, 70-80.

May, R.C., Stone, N.R.H., Wiesner, D.L., Bicanic, T., Nielsen, K. 2016. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte global pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 14(2), 106–117.

McGuinness, W.A., Kobayashi, S.D., DeLeo, F.R. 2016. Evasion of neutrophil killing by *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* 5(1), 32.

Murphy, C.N., Mortensen, M.S., Krogfelt, K.A., Clegg, S. 2013. Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. *Infect Immun.* 81(8), 3009-3017.

Nakatsuji, T., Gallo, R.L. 2012. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J. Invest. Dermatol.* 132(3Pt 2), 887–895.

Nascimento, A.C., Fontes, W., Sebben, A., Castro, M.S. 2003. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein Pept. Lett.* 10(3), 227-238.

Nethercott, C., Mabbett, A.N., Totsika, M., Peters, P., Ortiz, J.C., Nimmo, G.R., Coombs, G.W., Walker, M.J., Schembri, M.A. 2013. Molecular characterization of endocarditis-associated *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2131–2138.

O'Gara, J.P., Humphreys, H. 2001. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. J. Med. Microbiol. 50, 582–587.

Omardien, S., Brul, S., Zaat, S.A. 2016. Antimicrobial activity of cationic antimicrobial peptides against Gram-positives: current progress made in understanding the mode of action and the response of bacteria. Front Cell Dev Biol. 4, 111.

O'Meara, T.R., Alspaugh, J.A. 2012. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. Clin. Microbiol. Rev. 25(3), 387–408.

Otto, M. 2012. MRSA virulence and spread. Cellular Microbiology 14(10), 1513-1521.

Otto, M. 2013. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. Annu. Rev. Med. 64, 175-188.

Paul, E.A. 2014. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. Academic Press (4<sup>th</sup> ed). 598p.

Pendleton, J.N., Gorman, S.P., Gilmore, B.F. 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 11, 297–308.

Peschel, A., Sahl, H.G. 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. Nat. Rev. Microbiol. 4, 529-536.

Rashid, R., Veleba, M., Kline, K.A. 2016. Focal targeting of the bacterial envelope by antimicrobial peptides. Frontiers in Cell and Developmental Biology 4, 55.

Rodríguez, A., Villegas, E., Montoya Rosales, A., Rivas-Santiago, B., Corzo, G. 2014. Characterization of antibacterial and hemolytic activity of synthetic pandinin 2 variants and their inhibition against *Mycobacterium tuberculosis*. Plos One 9(7), e101742.

Rollins-Smith, L.A., Reinert, L.K., O'Leary, C.J., Houston, L.E., Woodhams, D.C. 2005. Antimicrobial peptide defenses in amphibian skin. Integr. Comp. Biol. 45(1), 137-142.

Saar-Dover, R., Bitler, A., Nezer, R., Shmuel-Galia, L., Firon, A., Shimoni, E., Trieu-Cuot, P., Shai, Y. 2012. D-alanylation of lipoteichoic acids confers resistance to cationic peptides in group B streptococcus by increasing the cell wall density. PLoS Pathog. 8(9), e1002891. Erratum in: PLoS Pathog. 2012 8(11), 10.1371/annotation/05894f00-6d95-4b7a-aff1-2e008d2a864f.

Segalla, M.V., Caramaschi, U., Cruz, C.A.G., Grant, T., Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A., Berneck, B.V.M., Langone, J.A., 2016. Brazilian amphibians: list of species. *Herpetologia Brasileira* 5(2), 34-46.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7(1), 2011.

Silva, O.N., de la Fuente-Núñez, C., Haney, E.F., Fensterseifer, I.C., Ribeiro, S.M., Porto, W.F., Brown, P., Faria-Junior, C., Rezende, T.M., Moreno, S.E., Lu, T.K., Hancock, R.E., Franco, O.L. 2016. An anti-infective synthetic peptide with dual antimicrobial and immunomodulatory activities. *Sci Rep.* 6, 35465.

Silva, T., Adão, R., Nazmi, K., Bolscher, J.G., Funari, S.S., Uhríková, D., Bastos, M.T. Silva, R. Adão, K. Nazmi, J.G.M. Bolscher, S.S. Funari, D. Uhríková, M. Bastos, 2013. Structural diversity and mode of action on lipid membranes of three lactoferrin candidacidal peptides. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1828, 1329–1339.

Siqueira-Batista, R., Gomes, A.P., Calixto-Lima, L., Vitorino, R.R., Perez, M.C.A., Mendonça, E.G., Oliveira, M.G.A., Geller, M. 2011. Sepsis: atualidades e perspectivas. *Rev. Bras. Ter. Intensiva.* 23(2), 207-216.

Torgerson, P.R., Hagan, J.E., Costa, F., Calcagno, J., Kane, M, Martinez--Silveira, M.S., Goris, M.G., Stein, C., Ko, A.I., Abela-Ridder, B. 2015. Global burden of leptospirosis: estimated in terms of disability adjusted life years. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(10), e0004122.

Vale, N., Aguiar, L., Gomes, P. 2014. Antimicrobial peptides: a new class of antimalarial drugs? *Front. Pharmacol.* 5, 275.

Vincent, J.L., Opal, S.M., Marshall, J.C., Tracey, K.J. 2013. Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 381(9868), 774-775.

Wager, C.M.L., Hole, C.R., Wozniak, K.L., Wormley Jr., F.L. 2016. *Cryptococcus* and phagocytes: complex interactions that influence disease outcome. *Front. Microbiol.* 7, 105.

Wang, H., Yu, Z., Hu, Y., Li, F., Liu, L., Zheng, H., Meng, H., Yang, S., Yang, X., Liu, J. 2012. Novel antimicrobial peptides isolated from the skin secretions of Hainan odorous frog, *Odorrana hainanensis*. *Peptides* 35(2), 285-290.

Whiteley, C.G., Lee, D.J. 2015. Bacterial diguanylatecyclases: structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development. *Biotechnol Adv.* 33(1), 124-141.

Xu, X., Lai, R. 2015. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chem Rev.* 115(4), 1760-1846.

Yang, W., Yan, L., Wu, C., Zhao, X., Tang, J. 2014. Fungal invasion of epithelial cells. *Microbiol Res.* 169, 803-810.

Zhang, L., Chen, X., Wu, Y., Zhou, M., Ma, C., Xi, X., Chen, T., Walker, B., Shaw, C., Wang, L. 2018. A Bowman-Birk type chymotrypsin inhibitor peptide from the amphibian, *Hylarana erythraea*. *Sci Rep.* 8(1), 5851.

Zhang, L.J., Gallo, R.L. 2016. Antimicrobial peptides. *Curr. Biol.* 26(1), R14-19.