



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

ANDERSON DEMATEI

**CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS DAS
SERPENTES *Bothrops atrox* E *B. moojeni* COM AVALIAÇÃO
DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS E ANTIOXIDANTE**

Anderson Dematei

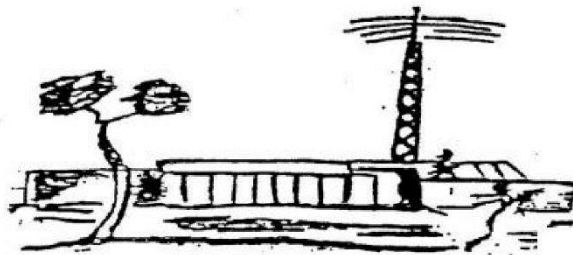
Brasília/DF, BRASIL, 2022

CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS DAS SERPENTES *Bothrops atrox* E *B. moojeni* COM AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS E ANTIOXIDANTE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção de Título de Doutor em Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto S. A. Leite.

Co-orientador: Dr. Peter Eaton



Brasília, 2022.

Universidade de Brasília (UnB)
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

FICHA CATALOGRÁFICA

DD372c Dematei, Anderson
CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS DAS SERPENTES
Bothrops atrox E B. moojeni COM AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANAS E ANTIOXIDANTE / Anderson Dematei;
orientador José R. S. A. Leite; co-orientador Peter Eaton.
- Brasília, 2022.
97 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2022.

1. Bothrops. 2. Peptídeo-antimicrobiano. 3. Veneno. 4.
Antioxidante. 5. Neuroprotetor. I. Leite, José R. S. A.,
orient. II. Eaton, Peter, co-orient. III. Título.

Anderson Dematei

Membros da Comissão Avaliadora da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção de Título de Doutor em Medicina Tropical, 29/04/2022.

Banca Examinadora:

Professor Dr. José R. S. A. Leite (Presidente)
Universidade de Brasília - UnB

Professora Dra. Mariela M. Marani (Membro Externo)
Centro Nacional Patagónico - CENTAP

Professor Dr. Gustavo A. S. Romero (Membro)
Universidade de Brasília - UnB

Professora Dra. Helena C. C. Oliveira (Membro)
Universidade de Aveiro - UA

Biólogo e Pesquisador Dr. Daniel C. Moreira (Suplente)
Universidade de Brasília - UnB

AGRADECIMENTOS

Diante de uma perspectiva otimista, a grosso modo, tenho que agradecer as inúmeras possibilidades que a vida me deu em poder estudar, onde acredito que o futuro, está diretamente atrelado as múltiplas formas de aprendizagem e conhecimentos que o estudo pode nos oferecer.

A minha família, meu porto seguro, que sempre me deu forças e sempre estiveram comigo na alegria e na tristeza, a vocês, meras palavras seriam poucas para expressar tudo o que sinto e o quanto sou grato, obrigado por sempre me apoiarem em minhas decisões e por me incentivar a seguir em frente.

Ao Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília (NMT-UnB) pela formação e pelo convívio, sempre ajudando na medida do possível, agradecer a uma pessoa seria injusto, todos que fazem parte do núcleo, sintam-se agradecidos e abraçados, todos os estagiários, funcionários, professores, sem os quais não seria possível minha formação.

Ao Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA) da UnB na Faculdade de Medicina (FM), aqui obtive muito conhecimento e numerosos amigos, dentre algumas pessoas que contribuíram, em especial a Profa. Dr. Selma Kuckellaus, Andreanne G. Vasconcelos, Daniel Carneiro, Maria da Glória, José Brango, Ariane Nogueira, Ana Luíza, Jhones Dias, Giulliano Rezende, Abimael Nunes, Wanessa Félix, Martina Valim, Maíra Bernardes e todos aqueles que fizeram parte do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) do qual agradeço em nome do João B. Nunes que sempre se fez presente e muito prestativo.

Ao Professor Dr. Guilherme Brand e Eder Alves Barbosa e aos alunos do Instituto de Química (IQ-UnB) que sempre estiveram dispostos a colaborar com os projetos propostos, orientando e participando diretamente, com materiais e conhecimento.

As Professoras Dra. Maria Imaculada e Tatiana K. B. Santos e as técnicas Shirley e Maria Ângela do laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina (LIC-FM), que sempre estiveram dispostas a me ajudar com discussões experimentais e diretamente ajudando na disposição dos materiais do laboratório para realização dos experimentos.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) onde através do projeto aprovado como visita técnica de natureza científica, tecnológica e de inovação, pude retornar a Portugal (PT), por meio do Prof. Dr. Peter Eaton, Nuno C. Santos, Alexandra Plácido, Lucinda J. Bessa e Constança Amaral gostaria de agradecer as parcerias que se tornaram indispensáveis cientificamente, mostrando que a ampliação de fronteiras formam parcerias de sucesso acadêmico e conseqüentemente uma vitrine de excelência para as universidades promotoras do conhecimento científico como a Universidade de Brasília (UnB), Faculdade de Ciência do Porto (FCUP), Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (FMUL) e Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S).

Aos colaboradores e parceiros científicos que foram indispensáveis para a realização dessa tese de doutorando, colaborando diretamente na execução do projeto, a Nikon Brasil na figura do Eduardo de Souza Neto, aos professores, funcionários e colaboradores da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFPI), a Universidade de Guarulhos (UNG) na figura do prof. Dr. Josué de Moraes, a Universidade de São Paulo (USP), na figura do prof. Dr. Luiz Felipe Passero, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) na figura do prof. Dr. Fernando Simabuco, graças a vocês hoje estou aqui escrevendo minha tese de doutorado, meus sinceros agradecimentos, conto com vocês para transmitir a todos os departamentos minhas estimas considerações aos grupos de pesquisa que fizeram parte dessa história.

Ao órgão de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sem o qual não teria conseguido realizar meu sonho em contribuir para com a pesquisa e desenvolvimento tecnológico da ciência no Brasil, obrigado.

Ao Prof. Dr. José R. S. A. Leite, foram anos de convivência, o doutorado apenas serviu para admirar ainda mais como pessoa e pesquisador entusiasta da produção científica no Brasil, uma mente incansável, fazendo-se valer do currículo que carrega consigo, grande amigo que tive a oportunidade de trabalhar desde os primórdios do mestrado em Portugal, onde o conheci, e a partir de lá, inúmeros trabalhos científicos realizados juntos, onde para mim o tratarei como um amigo para toda a vida, obrigado por ser meu orientador.

Foram tantas pessoas que passaram por mim nesse período que fico constringido em não citá-las, mas por fim se em algum momento estiver lendo esse

agradecimento e não constar o seu nome, não se sinta esquecido, pois para agradecê-los, eu precisaria escrever outra tese só de pessoas que passaram por mim e marcaram minha vida, obrigado por tudo.

Finalizando eu queria agradecer algo de especial que aconteceu durante meu doutorado, que foi o nascimento da minha filha, Mirella Camargo Dematei, um dia se tiver a oportunidade de ler essa tese, quero dizer filha, que é por você que viverei tentando ser e dar o melhor de mim a cada dia, esperançoso seguirei seus passos através do amor incondicional, te amo e te amarei para sempre.

EPÍGRAFE

“A única coisa de que tenho certeza é
da singularidade do indivíduo”.

**Albert Einstein – Alemão, Físico
e Matemático (1879 – 1955)**

RESUMO

Os estudos elaborados para conclusão dessa tese tiveram por objetivo avaliar os efeitos bioativos dos peptídeos sintéticos produzidos a partir dos estudos comparativos de atividade bactericida e leishmanicida de uma espécie de serpente *Bothrops atrox* e avaliação de peptídeos bioativos com propriedades antioxidantes isolados, caracterizados e sintetizados a partir do veneno da serpente *B. moojeni*, encontrada na região do Delta do Parnaíba entre os estados do Piauí e Maranhão. No total do estudo, foram sintetizados 4 peptídeos (BatxC, BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1, BatxC(C-2.15Phe) e BmT-2) com determinação das suas estruturas e composição química-física por técnicas hífenadas e *in silico*. Os três primeiros peptídeos foram avaliados sua citotoxicidade, com ensaios em macrófagos de linhagem J774 e queratinócitos humanos (HaCat) com CC₅₀ (1,60 a 34,07 µM). Os estudos em *Leishmania (L.) amazonensis* avaliaram a capacidade do peptídeo causar dano celular em promastigotas, através dos ensaios por Sitox Green® e por Microscopia de Força Atômica (MFA), determinar a Concentração Mínima Inibitória (CIM) em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (0,48 a 7,75 µM) e as concentrações capazes de destruir amastigotas interiorizadas em macrófagos de BALB/c (0,23 a 1,94 µM). O quarto peptídeo, a primeira triptofilina identificada em veneno de serpente tiveram os ensaios antioxidantes testados para células nervosas Neuro2a e SK-N-BE(2). Ensaios de citotoxicidade em neuroblastoma SK-N-BE(2) e eritrócito humano (RBCs)/O+) com significância de $p < 0,05$, e avaliado sua capacidade antioxidante para os ensaios de ABTS, ORAC e dano ao DNA, com resultado expressivo em 4.000 ppm. O estresse oxidativo foi avaliado através dos ensaios *in vitro* do Nrf2 e SOD2 e citometria de fluxo nas concentrações de 50 e 100 µM o peptídeo BmT-2 apresentando atividade com $p < 0,05$. O presente trabalho obteve resultados significativos, demonstrando a eficácia desses peptídeos quanto sua capacidade microbicida e neuroprotetora.

Palavra-chave: Bothrops, Peptídeo-antimicrobiano, Veneno, Antioxidante, Neuroprotetor.

ABSTRACT

The studies developed to conclude this thesis, aimed to evaluate the bioactive effects of synthetic peptides produced from comparative studies of bactericidal and leishmanicidal activity of a species of *Bothrops atrox* snake and evaluation of bioactive peptides with antioxidant properties isolated, characterized and synthesized at from the venom of the snake *B. moojeni*, found in the Delta do Parnaíba region between the states of Piauí and Maranhão. In the total of the study, 4 peptides (BatxC, BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1, BatxC(C-2.15Phe) and BmT-2) were synthesized, determining their structures and chemical-physical composition by hyphenated and in silico techniques. The first three peptides were evaluated for their cytotoxicity, with assays in J774 lineage Macrophages and Human Keratinocytes (HaCat) with CC₅₀ (1.60 to 34.07 µM). The studies in *Leishmania (L) amazonensis* evaluated the peptides ability to cause cellular damage in promastigotes, through Sitox Green and Atomic Force Microscopy (AFM) assays, to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in Gram-negative and Gram-positive bacteria (0.48 to 7.75 µM) and the concentrations capable of to destroy amastigotes internalized in BALB/c macrophages (0.23 to 1.94 µM). The fourth peptide, the first tryptophyllin identified in snake venom, had the antioxidant assays tested for Neuro2a and SK-N- BE(2) nerve cells. Cytotoxicity assays in neuroblastoma SK-N-BE(2) and human erythrocyte (RBCs)/O+ with a significance of $p < 0.05$, and evaluated its antioxidant capacity for ABTS, ORAC and DNA damage assays, with an expressive result at 4000 ppm. Oxidative stress was evaluated through *in vitro* assays of Nrf2 and SOD2 and flow cytometry at concentrations of 50 and 100 µM the peptide BmT-2 showing activity with $p < 0.05$. The present work obtained significant results, demonstrating the effectiveness of these peptides in terms of their microbicidal and neuroprotective capacity.

Keywords: Bothrops, Antimicrobial peptides, Venom, Antioxidants, Neuroprotective.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAPH	2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride
ABTS	Radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
BALB/c	Camundongos
BATXC	Batroxicidina
CD	Diocrismo Circular
CIM	Concentração Mínima Inibitória
DEOFs	Deformação dos Orbitais de Fronteira
DMCR	Dinâmica molecular com Campo Reativo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPC	Dodecil Fosfocolina
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato
ERN	Espécie reativa a nitrogênio
ERO	Espécie reativa a oxigênio
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HaCaT	Queratinócitos Humanos Imortalizados
IFCA	Índices Fukui condensados para átomos
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
MALDI-TOF	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matrix em Tempo de Vôo
MDA	Mapa doador-aceitador
MDR	Resistente a Múltiplas Drogas
MFA	Microscopia de Força Atômica
MØ J774	Macrófago Linhagem Tumoral
MS/MS	Espectrometria de Massa em Tandem
Nrf2	Fator nuclear derivado de eritróide 2
ORAC	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio
PAM	Peptídeo Antimicrobiano
PEM	Potencial eletroestático molecular
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
POPC/CHOL	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina/ Colesterol
POPC/POPG	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina/1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)
RBCs)/O⁺	Eritrócitos Humanos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Fase Reversa
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SH-SY5Y	Linhagem celular de neuroblastoma
Sk-N-BE(2)	Linhagem celular de neuroblastoma
SOD2	Superoxide dismutase 2
SPPS	Síntese em Fase Sólida

LISTA DE FIGURAS

INTODUÇÃO

Figura 1. (A) Imagem da Região do Delta do Parnaíba, em **(B)** espécie de *B. moojeni*..... 6

CAPÍTULO I

Figura 1. Serpente da América do Sul e Peptídeos relacionados a e catelicidinas. **(A)** Fotografia representativa de uma espécie de *Bothrops atrox* (foto: Reuber Brandão, Ilha do Marajó, Pará, Brasil). **(B)** Estrutura primária do peptídeo batroxidina (BatxC) e análogos sintéticos utilizados nesse trabalho. Alinhamento de múltiplas sequências de catelicidinas descritas na literatura..... 21

Figura 2. Imagens representativas de microscopia de força atômica de *E. coli* ATCC 25922. **(A)** Controle negativo (bactérias não tratadas) e bactérias tratadas e **(B)** tratadas com BatxC 0,47 μM , **(C)** BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 com 0,12 μM e **(D)** BatxC(C-2.15Phe) 0,23 μM . A coluna da esquerda mostra os dados de altura para cada amostra, enquanto a coluna do meio é uma imagem de amplitude. A coluna da direita mostra visualizações 3D com sombra clara dos dados de altura. 24

Figura 3. (A) Atividades leishmanicida e integridade da membrana celular induzidas por batroxidinas em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* incubada com peptídeos e anfotericina B (Ampho), e os respectivos valores de concentração efetiva de 50% (EC_{50}) estimados por 24 h. **(B)** Estrutura SYTOX Green® **(C)** Esquema simplificado do mecanismo de ação da sonda SYTOX Green® **(D)** *L. (L.) amazonensis* na forma promastigota foram incubadas com os peptídeos na EC_{50} ou em $2 \times \text{EC}_{50}$, a integridade da membrana do parasita foi analisada usando SYTOX Green®. Os resultados são expressos com absorvância média \pm desvio padrão (DP) de experimentos independentes (n=3). 26

Figura 4. Caracterização morfológica por microscopia de força atômica de promastigotas de *L. amazonensis*: controle de promastigotas **(A)** e tratados com **(B)** BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 61,98 μM e **(C)** BatxC(C-2.15Phe) 59,81 μM . As

imagens da esquerda são dados da altura; imagens da direita são amplitude dados.
..... 27

Figura 5. Ensaio antileishmania em amastigotas. **(A)** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e então tratados com diferentes concentrações de peptídeos ou anfotericina B (Ampho); após 24 h as células foram coradas com Giemsa 10% e os respectivos índices de infecção foram determinados. **(B)** Macrófagos infectados (controle positivo) e **(C)** macrófagos tratados com 0,70 μ M BatxC. Setas vermelhas indicam as amastigotas no citoplasma dos macrófagos. Ampliação de 100x. *Estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$). 28

Figura 6. Dicroísmo circular e modelos estruturais *in silico* de BatxC e análogos sintéticos. Espectros ECD de BatxC e seus análogos sintéticos em solução aquosa e na presença de DPC (Dodecil Fosfocolina). Estrutura *in silico* para BatxC e seus análogos sintéticos: modelos de estrutura tridimensional gerados pelo PEP-FOLD 3.5⁵⁶ (Shen *et al.*, 2014) e projeções de roda helicoidal, com o fragmento 1-23 da sequência de aminoácidos, corresponde a estrutura α -hélice, juntamente com seus dados de hidrofobicidade (H) e momento hidrofóbico (μ H)⁵⁷. 30

Figura 7. N^H /aromático região dos espectros de ¹H-RMN de BatxC e análogos sintéticos em solução aquosa na ausência (preto) e na presença (vermelho) de DPC. **(A)** BatxC; **(B)** BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1); **(C)** BatxC(C-2.15Phe). 31

Figura 8. Vazamento em membrana (%), avaliação de ruptura de POPC:Chol (70:30) e POPC:POPG (80:20) vesículas unilamelares grandes (LUVs). Concentrações crescentes em **(A)** BatxC, **(B)** BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 e **(C)** BatxC(C-2.14Phe) usadas a partir de 1/100 de suas CIMs correspondentes contra *E. coli*. 32

CAPÍTULO II

Figura 1. *Bothrops moojeni* (**Figura 1, A e B**). Perfil cromatográfico do extrato do veneno obtido da serpente *B. moojeni* **(C)**. **(D)** DEspectro de ionização/dessorção obtido por espectrometria de massa assistida por matriz – tempo de voo (MALDI-TOF). (Fotos: Peter Eaton). 50

Figura 2. Experimentos com glóbulos vermelhos humanos (RBCs). (A) Atividade citotóxica de BmT-2 em hemácias humanas. O grupo controle (Ctrl) continha apenas eritrócitos e DMEM (controle negativo). (B) Efeito anti-hemolítico do BmT-2. O asterisco (*) representa diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em comparação com o controle negativo de eritrócitos humanos tratados apenas com AAPH (grupo A). Trolox foi usado como controle positivo (grupo T) Resultados expressos como média \pm SEM, N=3.	51
Figura 3. (A) BmT-2 protege o DNA contra danos oxidativos induzidos por AAPH in vitro. (B) Níveis normalizados de bandas enoveladas de plasmídeo; (C) Níveis normalizados de bandas lineares de plasmídeo. Painel mostra duas réplicas técnicas. Os dados foram analisados usando ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. O asterisco (*) denota uma diferença estatisticamente significativa; $p < 0,05$, N=2.	52
Figura 4. Descritores de reatividade local para BmT-2: (A) IFCA em relação a nucleófilos (f+), eletrófilos (f-), radicais livres (f0) e PEM (potencial eletrostático molecular). (B) Mapa doador-aceptor: índices BmT-2 (estrela) em relação a outros antioxidantes (círculos).	53
Figura 5. Interações relevantes identificadas por simulações DMCR: (A) Empilhamento Phe-Trp π - π ; (B) Interação entre Phe e AAPH degradado e (C) Interação entre Trp e AAPH degradado.	54
Figura 6. BmT-2 apresenta potencial antioxidante em células Neuro2a. (A) Análise de <i>Western blot</i> para NRF2, SOD2 e β -actina em extratos celulares totais de células Neuro2a tratadas com arsenito, BmT-2 ou sua combinação; (B) Níveis normalizados de NRF2; (C) Níveis normalizados de SOD2. Os dados foram analisados com ANOVA de uma via seguida de teste <i>post hoc</i> de Bonferroni. A exibição de letras compactas indica que os grupos que não compartilham letras são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$), N=3.	56
Figura 7. BmT-2 mostrando propriedades antioxidantes e neuroprotetoras. (A) Cronograma do ensaio. (B) A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e (C) espécies reativas de nitrogênio foram induzidas por forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) em células Sk-N-BE(2), que foram tratadas com 50 e 100 μ M de BmT-2. Controles: DMEM (controle negativo) e DMEM + PMA (controle positivo). A exibição de letras compactas indica que os grupos que não compartilham letras são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).	58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Atividade antimicrobiana representada pela CIM.....	22
Tabela 2. Ensaios de citotoxicidade em linhagens celulares padrão (Média±DP; n=3)	34

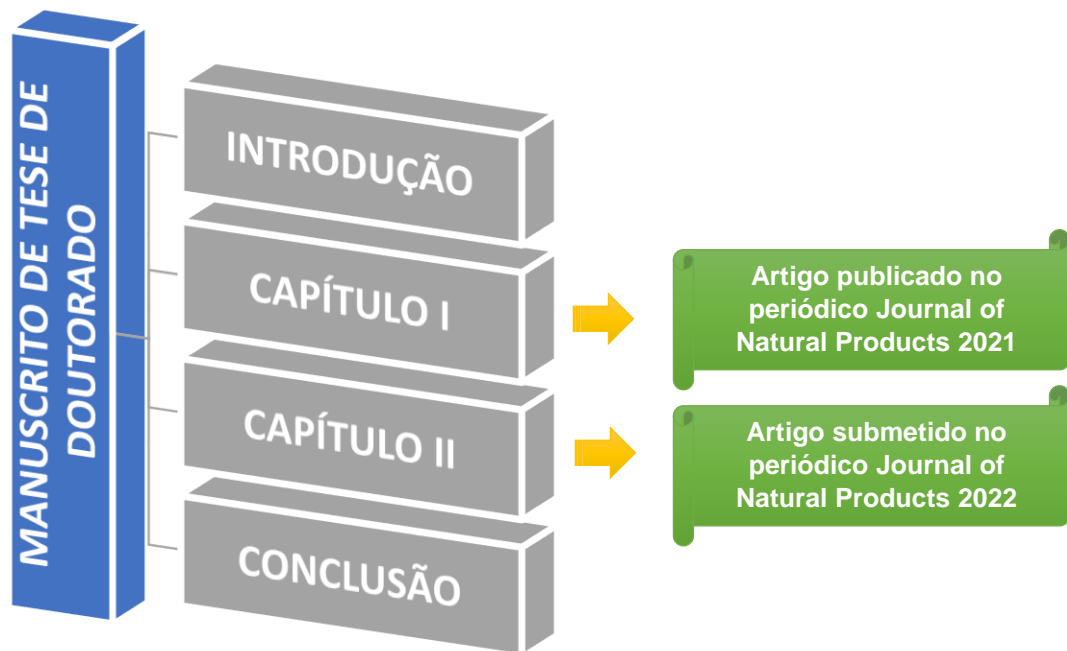
ÓRGÃOS FINANCIADORES

Anderson Dematei através dessa tese de doutorado, concluída pela Universidade de Brasília (UnB), através do Núcleo de Medicina Tropical (NMT), vem agradecer aos órgãos de fomento, pelo apoio financeiro realizado, através do amparo determinante aos processos inerentes da construção e desenvolvimento da formação científica, tão importante para a nortear uma sociedade em constante evolução.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), através da bolsa de doutorado (142099/2018-0), imprescindível para a realização do mesmo, meus sinceros agradecimentos. A Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (**FAPDF**, Brasil, número de concessão 00193.00001937/2018-83), da qual financiou a ida a Portugal como pesquisador estrangeiro, muito obrigado.

Diante dos desafios estabelecidos para a execução dessa tese, muitas sementes foram plantadas e alguns frutos, já colhidos com excelência.

SUMÁRIO ESQUEMÁTICO



SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVO GERAL.....	7
OBJETIVO ESPECÍFICO.....	7

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	11
2. SEÇÃO EXPERIMENTAL.....	13
2.1. Síntese e Caracterização	13
2.2. Ensaio de atividade antibacteriana.....	14
2.3. Atividade Antileishmania e Integridade da membrana	15
2.3. Infecção em macrófago e tratamento.....	16
2.4. Análise da morfologia por microscopia de força atômica	16
2.5. Estudos estruturais e interação peptídica em membranas biomiméticas..	17
2.5. Ensaio de citotoxicidade	18
2.5. Análise Estatística.....	19
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	20
3.1. Síntese Química e Análise de Sequência de BatxC e análogos sintéticos	20
3.2. Efeitos dos peptídeos na proliferação e membrana bacteriana	22
3.3. Efeitos dos peptídeos na viabilidade celular e membrana de Leishmania .	24
3.4. Estudos estruturais de interação com modelos de membranas biomiméticas	29
3.5. Ensaio de citotoxicidade com células de mamíferos	33
4. CONCLUSÃO	34
5. AGRADECIMENTOS.....	35

CAPÍTULO II

1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Material biológico	41
2.2 Purificação, identificação e caracterização de BmT-2.....	42
2.3 Síntese e caracterização de BmT-2	42
2.4 Análise <i>in silico</i>	43
2.5 Medição da capacidade de eliminação de radicais	44
2.6 Danos ao DNA induzidos por AAPH	44
2.7 Estudos em eritrócitos humanos	45
2.8 Análise do teor de proteínas antioxidantes em células Neuro2a submetidas ao estresse oxidativo induzido por arsenito	46
2.9 Western blotting	46
2.10 Citotoxicidade em células SK-N-BE(2).....	46
2.11 Medição intracelular de EROs e ERNs em células SK-N-BE(2)	47
2.12 Análise Estatística	48
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	48
4. CONCLUSÃO	58
5. AGRADECIMENTOS.....	59
CONCLUSÃO FINAL.....	60
ANEXOS	62
Anexo I.....	62
Anexo II.....	63
Anexo III.....	65
Anexo IV	66
Anexo V	67
Anexo VI	68

Anexo VII	69
Anexo VIII	72
Anexo IX	73
Anexo X	74
Anexo XI	75
Anexo XII	76
APÊNDICE A	77
Congressos	77
Comunicação Oral	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

INTRODUÇÃO GERAL

O uso da ligação química no campo de peptídeos bioativos abriram várias oportunidades para expandir as aplicações de peptídeos/proteínas em ciências biológicas¹. Através da bioprospecção de moléculas bioativas, os produtos naturais desempenham um papel relevante no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e outros bioprodutos, devido à diversidade estrutural e funcional presentes em diversas substâncias encontradas através dos estudos da fauna e flora espalhadas pelos ecossistemas terrestres, contribuindo para a descoberta de importantes moléculas de interesse a saúde humana².

Desde suas origens na síntese de hormônios naturais endógenos, a inovação na ciência dos peptídeos continua a moldar a prática da química sintética e analítica, devido aos desafios inerentes à montagem dessas moléculas multifuncionais e suas aplicações abundantes em vários campos do conhecimento, incluindo medicina, ciência de materiais, catálise e nanotecnologia³. Nas últimas décadas, inúmeras aplicações de tais transformações químicas nos campos da química medicinal e química de peptídeos vem sendo relatadas, empregando abordagens pró-fármaco para melhorar as propriedades físico-químicas de candidatos a fármacos⁴.

Inúmeros estudos apontam para a importância da prospecção e isolamento de novas moléculas de interesse ao combate a doenças infecciosas, adjunto a produção e desenvolvimento tecnológico e a conservação da biodiversidade explorada^{5,6}. Segundo o Centro para Controle e Prevenção de Doenças – CDC/Estados Unidos da América (EUA), as ameaças à saúde causadas por infecções de microrganismos resistentes a antibióticos e a vários agentes germicidas vêm atingindo altos índices. Estima-se que anualmente, pelo menos dois milhões de pessoas desenvolvem doenças relacionadas às infecções e 23.000 mortes são causadas por bactérias resistentes aos antibióticos nos EUA⁷.

Muitos microrganismos têm desenvolvido resistência tanto contra os já bem estabelecidos antibióticos de uso convencional quanto contra os antibióticos de última geração⁸. Uma importante ferramenta no combate a esses microrganismos,

são os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Foram estabelecidos a tempos como poderosos componentes do sistema imune inato de muitos organismos. Devido ao seu amplo espectro de atividade e ao improvável desenvolvimento de resistência do hospedeiro contra eles, os PAMs são fortes candidatos ao controle de patógenos microbianos patogênicos resistentes a drogas. Os PAMs são moléculas que causam morte celular através de vários mecanismos independentes ou cooperativos envolvendo lise de membrana, atividade não lítica e/ou mecanismos intracelulares⁹.

Defensinas e catelicidinas compreendem as principais famílias de peptídeos disruptivos de membrana em vertebrados. A interação eletrostática entre aglomerados de resíduos catiônicos da defensina e grupos fosfolipídeos carregados negativamente pode formar poros na membrana bacteriana que destroem a integridade da membrana, promovendo o rompimento membranoso dos micróbios-alvo¹⁰.

A família das temporinas-SHd, peptídeo de estrutura de 8 a 17 resíduos de aminoácidos, apresentam um grande espectro no controle antimicrobiano. Este peptídeo apresentou potentes atividades antibacterianas contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistentes a múltiplos fármacos, bem como atividade antiparasitária contra o promastigota e o estágio intracelular (amastigota) de *Leishmania infantum*¹¹. A identificação e caracterização desses PAMs ao longo do tempo, vem demonstrando uma excelente alternativa para a formulação de possíveis fármacos de interesse a saúde. A potencialidade dos PAMs é observada em vários experimentos quanto sua eficiência no controle de microrganismos. A dermaseptina 01 um potente peptídeo leishmanicida, foi extraída da secreção produzida pela *Phyllomedusa nordestina*, perereca também distribuída na região do Delta do Parnaíba^{12,13}.

Em outro trabalho com extração de peptídeos antimicrobianos em anfíbios com atividade antileishmania, isolou uma nova molécula, pertencente à família das ocelatinas, a partir da secreção da pele de *Leptodactylus pustulatus*¹⁴. Os estudos com secreções da pele dos anfíbios, vem possibilitando a descoberta de uma variedade de novas moléculas com atividades antimicrobianas, a filosseptina isolada da secreção cutânea das rãs brasileiras *Phyllomedusa hypochondrialis* e

Phyllomedusa oreades, também apresentam atividade contra protozoários da família dos *Trypanosomatidae*, *Trypanosoma cruzi*¹⁵.

Os répteis também exercem um papel importante, a partir de seu veneno podemos isolar peptídeos antimicrobianos. A desintegrina isolada do veneno de *Ceraste ceraste*, encontrada nos desertos e semidesertos do Norte Africano, exibe atividade antiparasitária em promastigotas de *Leishmania infantum*¹⁶.

Os polipeptídeos da peçonha de *Bothrops atrox* demonstraram grande potencial como antiprotozoários. A batroxocidina (BatxC) um PAM relacionado a catelicidina, promovem atividade não só contra *Trypanosoma cruzi*, mas também contra os tripanossomas africanos e parasitas do gênero *Leishmania*¹⁷. Em saúde pública, os PAMs vêm demonstrando ser uma fonte alternativa no combate aos microrganismos, as doenças negligenciadas causadas por agentes infecciosos são consideradas endêmicas em populações de baixa renda e possuem um volume de investimentos aquém das expectativas e necessidades o que dificulta a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos desse espectro.

Para além dos estudos já bem caracterizados relacionados as atividades microbidas dos peptídeos encontrados em espécies de anfíbios e serpentes, outro campo promissor de interesse na descoberta de moléculas bioativas, são os peptídeos de baixo peso molecular, com atividade antioxidante.

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante enzimático (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e não enzimático de origem endógena ou dietética (licopeno, carotenoides e ácido ascórbico), onde a geração de radicais livres e/ou espécies reativas não radicais resultante do metabolismo de oxigênio e/ou nitrogênio (EROs e ERN) são captados e neutralizados, impedindo os possíveis danos celulares¹⁸.

Em doenças neurodegenerativas, essas espécies reativas de oxigênio (EROs) estão associadas a mecanismos de disfunção celular neural. Estudos apontam que para essas doenças, o estresse oxidativo é uma parte essencial do processo patológico, como na doença de Alzheimer (DA) onde, distúrbio mitocondrial com o aumento dos níveis de metais, inflamação e peptídeo β -amilóide ($A\beta$), promovem a deposição de $A\beta$, hiperfosforilação de tau e a subsequente perda

de sinapses e neurônios¹⁹. Outros exemplos são as doenças de Parkinson e Huntington, que estão diretamente associadas ao seu desenvolvimento através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), neuroinflamação, disfunção mitocondrial e agregação proteica aberrante^{20,21}. Atualmente no mundo, inúmeros países vem demonstrando o aumento da incidência de doenças neurodegenerativas conforme o aumento da perspectiva de vida de seus habitantes, estima-se que a doença de Alzheimer (DA) afeta 36 milhões de pessoas espalhadas pelo mundo²², bem como a doença de Parkinson (DP), com aproximadamente 6 milhões de pessoas²³. Só nos Estados Unidos, por exemplo, a doença de Alzheimer (DA) afeta aproximadamente 4,5 milhões de americanos, com projeção de aumentar para 11 e para 16 milhões até 2050; A doença de Parkinson (DP) aflige aproximadamente um milhão de pessoas nos Estados Unidos, 60.000 novos casos são diagnosticados a cada ano, e sua incidência é projetada para quadruplicar até 2040²⁴.

Os peptídeos e proteínas com atividade antioxidante encontrados nos venenos dos animais, podem ser uma alternativa para tentar combater o estresse desencadeado por ERO e ERN em níveis celulares. Em abelhas *Apis cerana*, a proteína vitelogenina (Vg) desempenham papéis importantes, testes *in vitro*, demonstraram que o AcVg está envolvido na imunidade inata na infecção e em um sistema de defesa contra ERO, apoiando um papel crucial do Vg de abelha como agente antimicrobiano e antioxidante produzido no corpo e no veneno²⁵.

Em anfíbios, diversos trabalhos apontam para a importância desses peptídeos antioxidantes metabolizados principalmente na transição do meio aquático para o ambiente terrestre, onde a exposição ao ar atmosférico e raio ultravioleta B (UVB), acarreta na produção dessas moléculas antioxidantes^{26,27}. Em serpentes, esses peptídeos e proteínas são pouco relatados, pois geralmente em trabalhos científicos, exceto os peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) bem consagrados no campo da pesquisa e os antimicrobianos, suas moléculas estão mais associadas a alguma desordem celular, comprometendo o funcionamento do organismo em contato.

O veneno desses animais, são fontes de biomoléculas que merecem nossa atenção, a Alternagina-C (ALT-C) uma proteína isolada do veneno da serpente

Rhinocerophis alternatus, apresentou resultados interessantes num estudo *in vivo*, onde foi capaz de aumentar as atividades de enzimas antioxidantes hepáticas, como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, diminuindo o dano oxidativo basal aos lipídios e proteínas no fígado dos peixes da espécie *Hoplias malabaricus*²⁸. Outro exemplo e de grande importância para o estudo devido sua distribuição espacial, são as serpentes do gênero *Bothrops sp.*, a espécie *B. jararaca* bem como a *Bothrops moojeni*, são encontradas em matas de galeria, matas ciliares além de áreas abertas adjacentes e úmidas, encontram-se distribuídas por países como o Brasil, Paraguai e Argentina²⁹.

Um peptídeo de baixo peso molecular (LMWF) isolado de uma fração do veneno de uma *B. jararaca in vitro*, foi capaz de conferir capacidade neuroprotetora em células do hipocampo, quando induzidos ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (H₂O₂), demonstrando que o LMWF reduz as expressões de argininosuccinato sintase (AsS) e superóxido dismutase (SOD1), sugerindo que essa fração promove neuroproteção e a viabilidade das células de hipocampo por atenuação do estresse oxidativo³⁰.

Inúmeras espécies de serpentes são encontradas espalhadas pelo território nacional, a região do Delta do Parnaíba é uma delas, a região é caracterizada como um arquipélago localizado no encontro das águas do Rio Parnaíba com o Oceano Atlântico, entre o litoral do Piauí e do Maranhão. Ao todo, o Delta é formado por mais de 70 ilhas, que ocupam um espaço de cerca de 2.700 km², correspondente à cidade de Parnaíba, no Piauí, sendo cerca de 80 % do território alocado em solo maranhense³¹ (**Figura 1A**). Do ponto de vista geomorfológico é uma área dinâmica e, sob a ótica ecológica se caracteriza pela presença de endemismos e alta biodiversidade com vegetação e fauna exuberante³², onde é possível encontrar espécies de serpentes como a *B. moojeni* (**Figura 1B**).

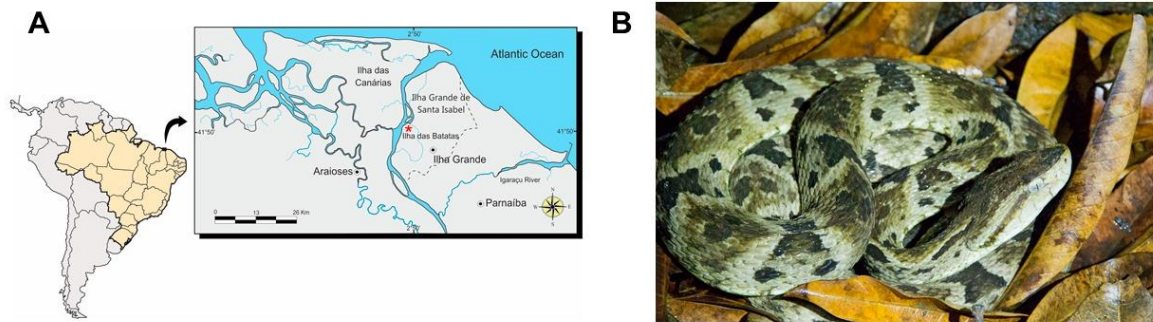


Figura 1. (A) Imagem da Região do Delta do Parnaíba, em **(B)** espécie de *B. moojeni*.

Assim sendo, o estudo de moléculas como as catelicidinas e a triptofilina BmT-2 (FPWLLS-NH₂) identificado no veneno da *Bothrops moojeni* proveniente da região do Delta do Parnaíba, entre os Estados do Piauí e Maranhão, pode ser uma alternativa viável para a caracterização de novas biomoléculas de interesse a saúde, visto que seu veneno é potencialmente rico em macromoléculas. A caracterização e o isolamento dessas moléculas com capacidade antiparasitária e/ou neuroprotetora, é de suma importância para a prospecção de novos fármacos, tornando-se uma alternativa no combate a microrganismos patogênicos a saúde humana como para doenças neurodegenerativas.

OBJETIVO GERAL

Sintetizar, purificar e caracterizar peptídeos bioativos identificados nos venenos de *Bothrops atrox* e *Bothrops moojeni* assim como determinar espectro de atividade antibacteriana, antileishmania e efeitos antioxidante.

OBJETIVO ESPECÍFICO

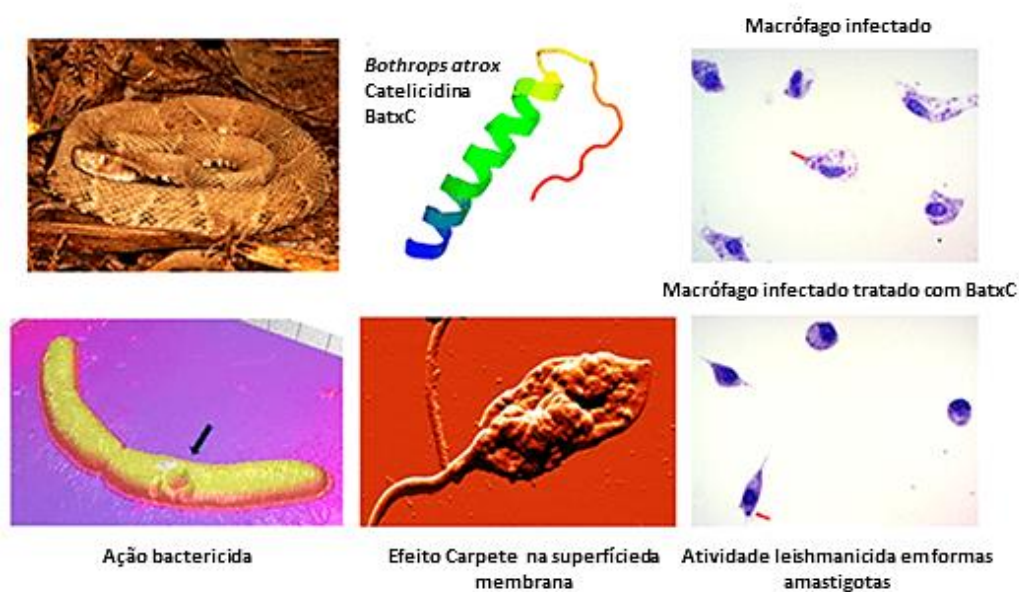
- Sintetizar, purificar e caracterizar peptídeos encontrados em serpentes *Bothrops atrox* e *Bothrops moojeni*;
- Avaliar atividade bacteriana contra estirpes gram-negativas e gram-positivas;
- Realizar ensaios antiparasitários contra formas promastigota e amastigota de *Leishmania (L.) amazonensis*;
- Avaliar a citotoxicidade in vitro dos peptídeos sintéticos em culturas celulares;
- Determinar os efeitos causados pelos peptídeos por técnicas avançadas de microscopia de força atômica (MFA);
- Avaliar os efeitos antioxidantes in vitro para ABTS, ORAC e proteção a quebra do DNA;
- Apontar as interações eletrostáticas por técnica de dinâmica molecular com campo reativo;
- Realizar ensaios antioxidantes, em células SK-N-BE(2) por Citometria de Fluxo e quantificar a expressão da via NRF2 e SOD(2) em Neuro2a.

Capítulo I

Artigo publicado no periódico Journal of Natural Products 2021

DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00153>.

Impact Factor: 4.05 (2020) / Discipline: Biochemistry.



Compreensão dos mecanismos e atividades leishmanicidas e bactericidas, de um peptídeo relacionado as catelicidinas encontrados em uma serpente Sul-Americana (*Bothrops atrox*).

Anderson Dematei^{1,2}, João B. Nunes^{2,3}, Daniel C. Moreira², Jéssica A. de Jesus⁴, Márcia D. Laurenti⁵, Ana C. A. Mengarda⁶, Maria Silva Vieira^{7,8}, Constança Pais do Amaral⁹, Marco M. Domingues⁹, Josué de Moraes⁶, Luiz F. D. Passero^{4,5}, Guilherme Brand³, Lucinda J. Bessa¹⁰, Reinhard Wimmer¹¹, Selma A.S. Kuckelhaus², Ana M. Tomás^{7,8,12}, Nuno C. Santos⁹, Alexandra Plácido¹⁰, Peter Eaton¹⁰, José Roberto S. A. Leite^{1,2,*}

¹Núcleo de Medicina Tropical, NMT, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília;

²Centro de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada, NuPMIA, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil;

³Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas, LSAB, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil;

⁴Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil;

⁵Departamento de Patologia, Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil;

⁶Centro de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, NPND, Universidade de Guarulhos, Guarulhos, Brasil;

⁷Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, i3S, Universidade do Porto, Porto, Portugal;

⁸Instituto de Biologia Molecular e Celular, IBMC, Universidade do Porto, Porto, Portugal;

⁹Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal;

¹⁰LAQV/REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal;

¹¹Departamento de Química e Biociência, Universidade de Aalborg, Aalborg, Dinamarca;

¹²Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, Portugal;

¹³The Bridge, Laboratórios Joseph Banks, Escola de Química, Universidade de Lincoln, Lincoln, Reino Unido.

***Autor Correspondente:** José Roberto de Souza de Almeida Leite, PhD. Address: Universidade de Brasília, UnB, Faculdade de Medicina. Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte. 70910900. Brasília, DF, Brasil. Phone number: +556131071891. E-mail: jrsaleite@gmail.com and jrleite@pq.cnpq.br.

RESUMO

Venenos de serpentes são importantes fontes de moléculas bioativas, incluindo aquelas com atividades antiparasitárias. As catelicidinas são uma classe de peptídeos bioativos que são produzidas por uma variedade de organismos. A batroxidina (BatxC) é uma catelicidina encontrada no veneno (*Bothrops atrox*). No presente trabalho, BatxC e dois análogos sintéticos, BatxC(C-2.15Phe) e BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 foram avaliados quanto à sua atividade microbicida. Todos os três peptídeos mostraram uma atividade de amplo espectro sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Os dados de CD e NMR indicaram que os três peptídeos mudaram sua estrutura após interação com membranas, formando estrutura em α -hélice. Estudos com modelos de membrana biomimética demonstraram que os peptídeos exercem um efeito de permeabilização em membranas procarióticas levando à deformação da morfologia celular, o que foi confirmado por microscopia de força atômica (MFA). As moléculas consideradas neste trabalho exibiram atividade bactericida e leishmanicida em baixas concentrações, com os dados de MFA sugerindo a formação de poros na membrana como mecanismo de ação. Esses peptídeos são valiosos protótipos de drogas a serem investigados e eventualmente usados para tratar infecções bacterianas e protozoárias.

Palavras-chave: Peptídeos Antimicrobianos, serpentes, atividade antileishmania, extrusão em membrana.

1. INTRODUÇÃO

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são conhecidos pela grande importância na natureza como uma das primeiras linhas de defesa imune inata de alguns animais³³, apresentam características como potencial terapêutico de combate a vírus, fungos, parasitas, bactérias entre outros microorganismos³⁴. Para além de mastócitos, neutrófilos, e outras células fagocitárias leucocitárias, os PAMs, em especial os catiônicos, são protagonistas na linha de frente contra patógenos exercendo um papel essencial no auxílio à fagocitose e atividade imunomodulatória como modulação da produção de citocinas³⁵. Prováveis mecanismos de ação desses peptídeos, como a ruptura da membrana do patógeno por diversos modos como nos modelos “*carpet-like*”, “*toroidal*”, “*barrel-stave*” e até a inibição do DNA e de funções proteicas³⁶ contribuem no controle de micro-organismos invasores.

A busca por esses PAMs vem sendo cada vez mais ampliada e atualmente são conhecidas mais de 5.000 biomoléculas destas classes incluindo naturais e/ou sintéticas³⁷. Alguns PAMs apresentam atividade contra bactérias gram-negativas, gram-positivas e estirpes multirresistentes (MR), o que demonstra seu potencial para substituir os antibióticos convencionais^{38,39}.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) vem alertando para a necessidade da produção de novos fármacos para combater as bactérias que atualmente apresentam resistência aos antibióticos. Essa preocupação é principalmente relacionada a bactérias multirresistentes específicas, incluindo *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e uma diversidade de *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Serratia* spp. e *Proteus* spp.), que atualmente representam uma séria ameaça nos hospitais e entre os pacientes em geral⁴⁰.

A catelicidina LL-37, é um dos principais PAMs encontrado em humanos nos fluidos biológicos como suor e saliva, sendo um peptídeo helicoidal anfipático, com 37 resíduos de aminoácidos exibindo um amplo espectro de atividade⁴¹. A família de peptídeo de catelicidina é composta por moléculas com a mesma sequência que a proteína catelina no domínio N-terminal e sequência C-terminal variável, podendo ser caracterizado de acordo com sua atividade antimicrobiana⁴². Sua estrutura

secundária, varia de folhas- β com pontes dissulfeto intramoleculares a α -hélices anfipáticas com afinidade por membranas bacterianas carregadas negativamente.

Quando peptídeos e membranas bacterianas interagem, o efeito antimicrobiano é muitas vezes imediato, lisando a membrana através de vários mecanismos de permeabilização da membrana⁴³. Inúmeras moléculas com essas características são descritas em diversos estudos⁴⁴, sendo répteis^{45,46} e anfíbios^{47,48} excelentes representantes na natureza como fonte de biomoléculas com essa finalidade. As catelicidinas apresentam atividades antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo para todas as estirpes, os valores apresentados em torno de 30 $\mu\text{g/mL}$ para concentração mínima inibitória (CIM)⁴⁹. Além disso, outros estudos indicam que as catelicidinas são eficientes no controle antiviral e atividade antiinflamatória⁵⁰.

A leishmaniose é uma importante doença parasitária negligenciada que ocorre em todo o mundo com uma prevalência de 12 milhões de casos. Com isso estima-se que mais de 350 milhões de pessoas vivem em áreas risco de transmissão⁵¹. Existem poucas opções para tratar pacientes com leishmaniose; os antimoniais pentavalentes são o fármaco de primeira classe empregado para tratar todas as formas clínicas de leishmaniose. Por causa dos efeitos colaterais graves associados ao tratamento com o antimonial pentavalente⁵², muitos esforços têm sido feitos para desenvolver intervenções farmacológicas alternativas, incluindo o uso de peptídeos. Os efeitos específicos das catelicidinas na leishmaniose têm sido mal descritas; no entanto, este grupo de peptídeos está implicado na defesa do hospedeiro contra *Leishmania*^{53,54}. Por exemplo, LL-37 recombinante humano (hrLL37) elimina as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania aethiopica* e *Leishmania major* induzindo apoptose do parasita⁵⁵.

Os estudos mencionados ressaltam a versatilidade das catelicidinas em termos de atividade e fonte biológica. Além disso, a bioatividade de muitos peptídeos desta família permanece em grande parte inexplorado. Por exemplo, poucos estudos têm investigado a atividade das catelicidinas de venenos de serpentes, que podem conter peptídeos promissores. Este é o caso do batroxidina (BatxC), a catelicidina encontrada na glândula de veneno de *Bothrops atrox*, que

demonstrou eliminar todas as formas de desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi* com alta seletividade¹⁷. Até onde sabemos, não há relato sobre a possível atividade leishmanicida de BatxC.

Neste estudo, a atividade antibacteriana de BatxC e dois análogos sintéticos, BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 e BatxC-(C-2.15Phe), foi avaliada contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, incluindo isolados multirresistentes (MDR). Além disso, o efeito leishmanicida contra *Leishmania (Leishmania) amazonensis* também foi avaliada em promastigotas e formas intracelulares amastigotas. Após esses experimentos, o mecanismo de ação dos peptídeos foi inferido através de microscopia de força atômica (MFA) e modelos miméticos de membrana, usando difração circular (CD) e fluorescência e ressonância magnética nuclear (RMN) para entender melhor sua interação com a superfície celular. A citotoxicidade contra duas linhagens celulares de mamíferos também foi avaliada para inferir o potencial de seletividade terapêutica.

2. SEÇÃO EXPERIMENTAL

2.1. Síntese e Caracterização

Síntese peptídica. Os peptídeos utilizados nos ensaios neste trabalho foram BatxC (KRFKKFFKKLKNSVKKRVKKFFRKPRVIGVTFPF-NH₂; massa molecular = 4.257,41 kDa), BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 (KRFKKFFKKLKNSVKKRVKFFFRKPRVIGVTFP-NH₂; massa molecular = 4.128,65 kDa) e BatxC-(C-2.15Phe) (KRFKKFFKKLKNSVKKRVKFFFRKPRVIGVTFPF-NH₂; massa molecular = 4.275,76 kDa) todos sintetizados pelo método de síntese em fase sólida (SPPS) FMOC/tBu, utilizando resina Rink Amide (Sigma) 0,7 mmol/g e DIC/Oxima^{®56}. Os peptídeos sintetizados foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) numa coluna C₁₈ de fase reversa (250x20 mm I.D., 15 µm, Shim-Pack PREP-ODS). Para confirmar a presença das moléculas purificadas (**ANEXO I**), com análise de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF Ultraflex III Extreme Bruker Daltonic no modo refletor, positivo (**ANEXO II**).

BatxC e análogos, designer dos peptídeos e alinhamento da sequência.

O portal de recursos de bioinformática ExPASy (www.expasy.org/tools), hospedando o software FASTA3 (versão 3 do EBI, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fastaf/>), foi acessado para pesquisar peptídeos semelhantes a BatxC em todos os bancos de dados de proteínas disponíveis (**FIGURA 2**). Depois, os resultados foram enviados para Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para alinhamento de múltiplas sequências. Ambas as sequências sintéticas são exibidas na **FIGURA 2**. Todos os peptídeos sintéticos nomes foram dados de acordo com a Comissão Conjunta IUPAC-IUB sobre Regras de Nomenclatura Bioquímica⁵⁷.

Previsão de características físico-químicas *in silico*. Os parâmetros físico-químicos dos peptídeos foram calculados usando o programa ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>). A hidrofobicidade média ($\langle H \rangle$) foi calculada usando a escala de hidrofobicidade de consenso de Eisenberg e Weiss⁵⁸. O programa HeliQuest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) foi utilizado para calcular os momentos hidrofóbicos (μH) e as projeções das rodas helicoidais⁵⁹. As previsões do modelo estrutural tridimensional de peptídeos maduros foram geradas usando PEP-FOLD 3.5 para representar a estrutura 3D⁶⁰.

2.2. Ensaios de atividade antibacteriana

Determinação da Concentração Mínima Inibitória. Para medir a atividade antibacteriana, os peptídeos foram testados contra cepas de referência, duas Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212) e duas bactérias Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853). Além disso, eles também foram testados contra isolado clínico Sa1 MDR (um *S. aureus* resistente à meticilina, MRSA), Pa1 (uma *P. aeruginosa* MDR) e EC1 (uma *E. coli* MDR). Os CIM foram determinados pela técnica de microdiluição em caldo, seguindo a Protocolo do Clinical and Laboratory Standards Institute⁶¹. Estoque soluções de 10 mg/mL em água foram diluídas em série em Caldo Mueller-Hinton (MHB2, Sigma-Aldrich) para alcançar as concentrações variando de 0,5 a 512 $\mu\text{g/mL}$. Um inóculo bacteriano foi preparado em MHB2 e padronizado para obter uma concentração de 5×10^5 UFC/mL. O CIM foi definido como a concentração mais baixa do composto que inibiu o crescimento visível.

2.3. Atividade Antileishmania e Integridade da membrana

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) a 2×10^6 promastigotas/poço foram incubados em placas de cultura de 96 poços em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativos, 0,25 mM HEPES, estreptomicina 10 µg/mL, penicilina 100 UI/mL, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de vitaminas, 1% de piruvato e 1% 2-mercaptoetanol (R10) com BatxC e os peptídeos análogos em um faixa de 0 a 50 µM. Anfotericina B injetável (Crystalia Laboratory, Brasil) foi diluído em água estéril, e foi utilizado como droga padrão de controle na faixa de 0,001 a 100 µg/mL. O grupo controle negativo foi cultivado apenas em meio e solução dos ensaios. Os parasitas foram incubados durante 24 h a 25°C, lavados com 200 µL de cloreto de sódio 0,9% (v/v) três vezes com centrifugação a 1.200 g, 10 min a 4°C, seguido pela adição de MTT (3-(4,5-brometo de dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, 10 mg/mL, Sigma-Aldrich, EUA). Quatro horas depois, 50 µL de dodecil de sódio a 10% sulfato (SDS) foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas por 18 h e lido em leitor de ELISA (Promega, EUA) em 595 nm. A concentração efetiva de 50% (EC₅₀) foi estimada usando Software Graph Pad Prism 5.0 (**ANEXO V**).

A fim de analisar a integridade da membrana celular de parasitas tratados com BatxC e peptídeos análogos, foi avaliado a coloração de ácido nucleico por SYTOX Green® (Thermo Fisher, EUA). Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (2×10^6 promastigotas/poço) foram incubados em placas de cultura de 96 poços em R10 com o EC₅₀ das moléculas estudadas. Como controle positivo, os parasitas foram incubados com Triton X-100, que é um detergente aquoso não iônico capaz de permeabilizar as membranas celulares, permitindo uma entrada maciça da sonda SYTOX Green® nas células. As placas foram lidas a cada 20 min, durante 120 min. Outra leitura foi realizada em 24 h de incubação. As placas foram lidas em uma fluorescência leitor (Promega, EUA) com filtro de emissão de 530 nm e excitação a 490 nm.

2.3. Infecção em macrófago e tratamento

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5 macrófagos) foram cultivados em R10 em lamínulas redondas em placa de 24 poços por 1 h e infectados com *L. (L.) amazonensis* na proporção de 10 parasitas por 1 macrófago peritoneal, a 35°C e 5% de CO₂. Após 24 h de cultura, BatxC nas concentrações (0,70, 0,47 e 0,23 μM), BatxC(C-2,14Phe)des-Phe1 (1,94, 0,97, e 0,48 μM), e BatxC(C-2,15Phe) (0,93, 0,47 e 0,23 μM) foram adicionado em cada poço (n=3). Anfotericina B em $\text{EC}_{50} = 0,1 \mu\text{M}$ foi usado como controle positivo. As lamínulas redondas foram secas à temperatura ambiente, fixado em metanol e corado por Giemsa. o índice infecção de infecção (II) foi então estimado de acordo com:

$$\text{II} = \% \text{ Macrófagos Infectados} \times \frac{\text{Amastigotas Internalizadas}}{\text{Total Macrófagos}}$$

2.4. Análise da morfologia por microscopia de força atômica

Na análise de MFA, os CIMs para cepas de *E. coli* ATCC 25922 e valores do EC_{50} para *L. (L.) amazonensis* foram usados. Durante as observações, o concentrações de peptídeos utilizadas foram as seguintes: BatxC 0,47 μM contra *E. coli* e BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 61,98 μM e BatxC(C 2.15Phe) a 59,81 μM contra *L. amazonensis*. Para fixação, 2,5% de glutaraldeído foi usado em tampão Na-cacodilato 100 mM (pH 7,4). As células foram suspensas em lamínulas revestidas com poli-L-lisina (PLL) e deixadas secar por 60 minutos em temperatura ambiente, com as placas cobertas para evitar a evaporação. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes: primeiro com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e depois com água (Sigma Pure água), por 5 min cada, e seca à temperatura ambiente até a análise. Os efeitos dos peptídicos nas células promastigotas de leishmania foram observados em um microscópio TT-AFM (AFM Workshop, EUA) em modo de contato intermitente (“vibração” ou “modo de toque”) com sondas de silício (ACT, AppNano) e uma frequência de ressonância de cerca de 300 kHz. As imagens foram analisadas com o software Gwyddion 2,47.

2.5. Estudos estruturais e interação peptídica em membranas biomiméticas

Preparação de vesículas lipídicas. Vesículas unilamelares grande (LUVs) de cerca de 100 nm foram utilizadas para o método de extrusão como descrito anteriormente⁶² (Cheng e London, 2011). Os lipídios usados para os ensaios de membrana foram 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), colesterol (Chol) e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-(fosfo-rac-(1-glicerol)) (POPG) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, EUA). A composição de lipídios utilizada foi POPC:Chol (70:30) e POPC:POPG (80:20) a 15 mM de concentração total de lipídios, para imitar uma membrana celular de mamíferos e membrana bacteriana, respectivamente. Para a formação do filme lipídico, ambas as misturas foram dissolvidas em clorofórmio, secas sob um fluxo de gás nitrogênio e deixado secar sob vácuo durante a noite. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com uma solução de 100 mM 5,(6)-carboxifluoresceína (CF) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em PBS a 7.4 pH e submetido a oito ciclos de congelamento-descongelamento. As misturas lipídicas com CF encapsulado foram então extrudados 21 vezes através de um poro de 100 nm na membrana usando uma extrusora Avestin (Ottawa, Ontário, Canadá). Os tamanhos de LUVs foram confirmados por dispersão dinâmica de luz usando um Malvern Zetasizer Nano (Malvern, Reino Unido).

Vazamento Induzido por Peptídeo. Os vazamentos induzidos por peptídeos foram quantificados através de medidas de espectroscopia de fluorescência, monitorando a liberação de CF encapsulado em LUVs, usando um Varian Cary Espectrofotômetro de fluorescência Eclipse (Mulgrave, Austrália). Através de cromatografia de exclusão molecular (coluna EconoPac 10 DG, Bio-Rad, Richmond, CA, EUA) o corante livre restante foi removido da solução de amostra de lipossomas. As medições de intensidade de fluorescência foram feitas continuamente por 60 min a 25°C com comprimentos de onda de 492 a 517 nm de excitação e emissão. LUVs com concentração de 0,5 mM foram adicionados inicialmente para verificar se não havia auto vazamento e, 5 minutos depois, os peptídeos foram adicionados. Após 55 min, Triton X-100 (10%, v/v) foi adicionado para romper os lipossomas, liberar o corante encapsulado restante e medir a fluorescência total. A porcentagem de vazamento de CF foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\%Vazamento = \frac{F - F_0}{F_{100} - F_0} \times 100$$

onde F_0 é a intensidade de fluorescência CF medida após 5 min sem adição de peptídeo, F é a intensidade de fluorescência medida após a adição do peptídeo, e F_{100} é a intensidade de fluorescência medida após adicionar Triton X-100 10% para atingir a ruptura total da vesícula.

Estudos Estruturais de ECD e RMN. Os peptídeos foram dissolvidos em 30 mM em tampão fosfato preparado com água Milli-Q e o pH do soluções foi ajustado para 6,4. A concentração final de peptídeo foi de 1 mM e 3-(trimetilsilil)propionico-2,2,3,3-d4 sal de sódio do ácido (TSP-d4) foi adicionado para atingir uma concentração de 0,1 mM. Espectros de ECD e NMR foram registrados, dodecil fosfaditilcolina deuterada (DPC-d38) foi adicionada à 150 mM, e os espectros ECD e NMR foram registrados novamente. O dicroísmo circular foi medido em um Espectrômetro de CD Chirascan Plus (Fotofísica Aplicada). A amostra avaliada numa temperatura mantida em 295 K. Para amostras com DPC, a média 16 espectros foram calculados, enquanto para amostras em água, foram calculadas a média de 32 espectros. Para amostras em DPC, foi utilizada uma cuvete com trajeto de 0,1 mm; para amostras em água, foi utilizada uma cuvete com um trajeto de 0,5 mm. Para BatxC, no entanto, foi usada uma cubeta com um caminho de 0,2 mm, e 16 espectros foram registrados, tanto na presença quanto na ausência do DPC. Todos os espectros de RMN foram registrados em um Espectrômetro de RMN Bruker AVII-600 MHz equipado com uma sonda CPP-TCI de 5 mm. Os espectros foram registrados a uma temperatura de 310 K. Para amostras em água, espectros ^1H RMN foram registrados usando excitação-esculpida por supressão em água⁶³.

2.5. Ensaio de citotoxicidade

Os peptídeos BatxC, BatxC(C-2.15Phe), e BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 foram avaliados usando células J774 e a linhagem de células de queratinócitos humanos HaCat, com série 1:2 diluições de 0,78 a 200 μM . As células J774 (2×10^6 células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços em R10 com os

peptídeos na faixa de 1,56 a 200 µg/mL, a 37 °C e 5% de CO₂, por 24 h. As células eram lavadas três vezes com PBS em pH 7,2 e centrifugado a 123 g por 10 minutos, a 4°C. Seguindo estas etapas de lavagem, foi avaliado a viabilidade das células com o reagente PrestoBlue adicionado e incubado a 37°C com 5% de CO₂ por 2 h. A intensidade de fluorescência foi registrada com excitação e emissão de comprimentos de onda 535 e 615 nm, respectivamente.

As células HaCat foram cultivadas usando DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,1 mg/mL de gentamicina (Vitrocell). O ensaio de citotoxicidade foi realizado como descrito anteriormente^{64,65}. Resumidamente, as células foram semeadas e deixadas aderir a placas de 96 poços contendo DMEM por 24 h a 37°C em 5% de CO₂, posteriormente os peptídeos foram adicionados ao meio de cultura. Após 48 h, MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado aos poços e as células foram incubadas por 3 h antes das leituras. A placa foi então lida a 595 nm, usando um Espectrofotômetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA). O ensaio foi realizado em duplicata e repetido três vezes. Os valores foram expressos como porcentagem do controle e CC₅₀⁶⁶.

2.5. Análise Estatística

Os resultados foram avaliados usando o teste Bartlett's para variâncias iguais e o teste de Kolmogorov-Smirnov para distribuição da análise comparativa. Valores EC₅₀ e CC₅₀ foram realizados com um intervalo de confiança de 95%, apresentado como média±desvio padrão (DP), foram calculados usando uma curva de regressão não linear⁶⁷. Análise estatística dos efeitos dos peptídeos em amastigotas intracelulares foi feito aplicando ANOVA para um teste multivariado de análise Student–Newman–Keuls. O software estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, EUA), e os resultados foram considerados estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1. Síntese Química e Análise de Sequência de BatxC e análogos sintéticos

Os peptídeos BatxC, anteriormente identificado a partir do veneno de *Bothrops atrox* (**Figura 1A**), BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 e BatxC(C-2.15Phe), foram sintetizados por síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS), purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), e tiveram suas massas moleculares confirmadas por MALDI-TOF/TOF (**Figura 1B**). Sequências múltiplas, alinhamento desses peptídeos e cinco outras catelicidinas produzidas por cobras como lutzicina, Na_CATH, Oh_CRAMP, Pt_CRAMP2 e Bf-CRAMP revelaram regiões com sequência conservada⁶⁸.

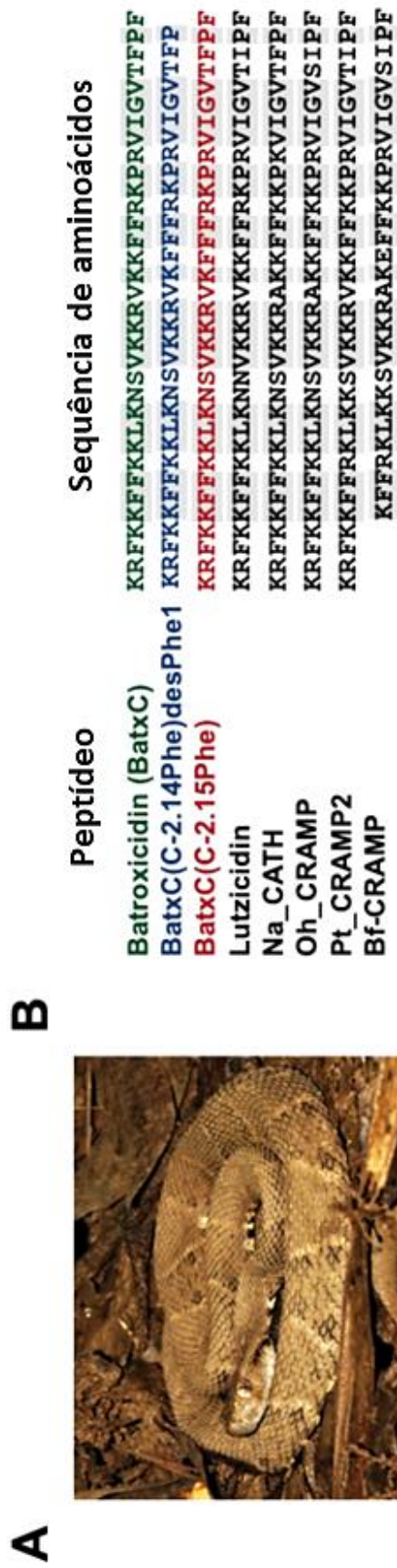


Figura 1. Serpente da América do Sul e Peptídeos relacionados a e catelicidinas. **(A)** Fotografia representativa de uma espécie de *Bothrops atrox* (foto: Reuber Brandão, Ilha do Marajó, Pará, Brasil). **(B)** Estrutura primária do peptídeo batroxicidina (BatxC) e análogos sintéticos utilizados nesse trabalho. Alinhamento de múltiplas seqüências de catelicidinas descritas na literatura. BatxC de *Bothrops atrox*⁶⁸ (Falcao et al. (2014) (este trabalho)); BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1, análogo sintético de BatxC (este trabalho); BatxC(C-2.15Phe), outro análogo sintético de BatxC (este trabalho); lutzicidina de *Bothrops lutz*⁶⁸; Na_CATH de *Naja atra*¹⁷⁰; Oh_CRAMP de *Ophiophagus hannah*⁶⁸; Pt_CRAMP2 de *Pseudonaja textilis*⁶⁸; Bf-CRAMP de *Bungarus fasciatus*¹⁷¹. O sombreamento cinza destaca 100% de identidade.

3.2. Efeitos dos peptídeos na proliferação e membrana bacteriana

Os peptídeos mostraram valores de CIM semelhantes contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*) e cepas Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*). Isto é, os CIMs contra *S. aureus* ATCC 29213 e Sa1 (um *S. aureus* resistente à meticilina, SARM) foram consideravelmente menor para BatxC-(C-2.14Phe)des-Phe1 e BatxC-(C-2.15Phe), em comparação com BatxC. Em contrapartida encontramos valores de CIM abaixo de 5 µM para todas as cepas para cada peptídeo, com a exceção de *E. faecalis* ATCC 29212, que estava abaixo de 10 µM (**TABELA 1**). Esses resultados mostram que o BatxC e seus análogos sintéticos apresentam atividade antibacteriana de amplo espectro. O menor valor de CIM, foi de 0,48 µM, registrado para BatxC contra *E. coli* 25922.

Muitas catelicidinas têm alta eficiência antimicrobiana, como demonstrado pela crotalina (Ctn) contra *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, com CIMs de 0,78 e 1,56 µM, respectivamente⁶⁹. Esses valores são semelhantes aos obtidos para BatxC: 0,48 e 0,94 µM, respectivamente. O efeito antimicrobiano de BatxC e Ctn também foram avaliados contra MDR isolados clínicos, com CIMs iguais a 8 e 8 µM e 4 e 16µM para *E. coli* 2101123 e *E. coli* 1812446, respectivamente⁷⁰. BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 foi muito eficaz contra *E. coli* ATCC 25922 e o isolado MDR de *E. coli*, EC1, com um CIM de 0,48 µM, o que indica que este peptídeo pode ser particularmente ativo contra cepas de *E. coli* (**TABELA 1**).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana representada pela CIM.

Estirpes	CIM (µM)		
	BatxC	BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1	BatxC-(C-2.15Phe)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,47	0,48	0,93
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,94	0,97	1,87
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	7,51	7,75	7,48
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	7,51	3,87	3,74
Sa1 (MRSA) ^a	7,51	1,94	1,87
Pa1 (multirresistente) ^b	0,94	0,94	4
EC1 (multirresistente) ^c	0,94	0,48	0,94

Abreviações: ^aSa1 (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina), ^bPa1 (*Pseudomonas aeruginosa* multiressistente) e ^cEC1 (*Escherichia coli* multiressistente).

A morfologia celular desempenha um papel essencial na sua fisiologia. No entanto, o conhecimento científico sobre o efeito dos peptídeos antimicrobianos na

morfologia da célula bacteriana é limitado. Não é totalmente entendido como as células respondem estruturalmente e mecanicamente a uma ação externa, ou como a elasticidade celular varia em microrganismos com ou sem agentes externos, como PAMs.

Neste contexto, a microscopia de força atômica é a uma excelente ferramenta para estudos de superfície celular⁷¹. Por meio do MFA foi possível observar a deformação de células *E. coli* ATCC 25922 induzida por 0,47 μ M de BatxC (**FIGURA 2**). Várias depressões circulares ao longo da superfície bacteriana podem ser notadas, sendo algumas maiores e outras menores, que estavam ausentes no controle negativo, embora a forma geral da célula não foi alterada (**FIGURA 2A**).

Em cepas de *E. coli*, através de observações de MFA, peptídeos antimicrobianos (BP100 e PepR-Phytopathogen) causam deformações de membrana seguidas por lise através de mecanismos semelhantes a tapetes⁷². BatxC(C-2.14Phe)-des-Phe1 e BatxC(C-2.15Phe) promovem alterações através da membrana em concentrações de 0,12 e 0,23 μ M, respectivamente. Nessas concentrações, as bactérias sofrem grandes modificações em suas estruturas, principalmente as células bacilares (**FIGURA 2C e D**). Ocellatin-PT7, um peptídeo de uma rã sul-americana, *Leptodactylus pustulatus*, também causa deformações em *E. coli* ATCC 25922, embora em uma concentração mais alta (190 μ M), ocasionando parcialmente ruptura da membrana⁷³. Ao agir contra bactérias Gram-negativas, os peptídeos podem se movimentar através da membrana externa, atravessando camada de glicopeptídeos e membrana interna migrando para o citoplasma⁷⁴.

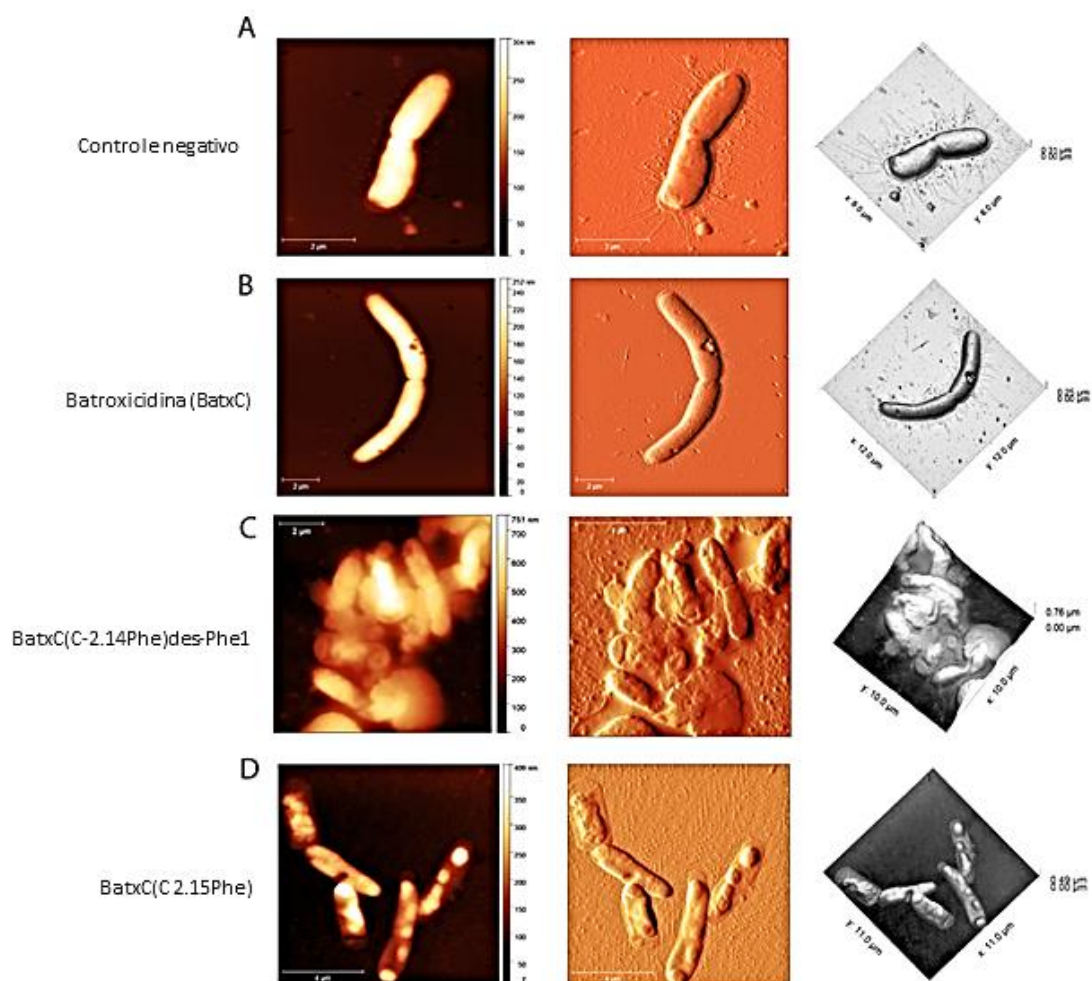


Figura 2. Imagens representativas de microscopia de força atômica de *E. coli* ATCC 25922. **(A)** Controle negativo (bactérias não tratadas) e bactérias tratadas e **(B)** tratadas com BatxC 0,47 μM , **(C)** BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 com 0,12 μM e **(D)** BatxC(C-2.15Phe) 0,23 μM . A coluna da esquerda mostra os dados de altura para cada amostra, enquanto a coluna do meio é uma imagem de amplitude. A coluna da direita mostra visualizações 3D com sombra clara dos dados de altura.

3.3. Efeitos dos peptídeos na viabilidade celular e membrana de *Leishmania*

Os peptídeos BatxC, BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 e BatxC(C 2.15Phe) induziram um efeito leishmanicida contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, com EC_{50} (concentração efetiva: a concentração de uma droga que dá metade da resposta máxima) valores de 4,90, 8,86 e 6,74 μM , respectivamente **(FIGURA 3A)**.

Embora os estudos que analisam a ação leishmanicida das batroxicidinas sejam escassos, algumas proteínas de venenos de serpentes têm demonstrado exercer potente atividade leishmanicida. Por exemplo, L-aminoácido oxidase (LAAO), produzida por *Crotalus durissus* e *Bothrops moojeni*, exibe potente H₂O₂-dependente para atividade leishmanicida^{75,76}. Além disso, outras proteínas de veneno de cobra, como giroxina, crotamina e crotoxina, também apresentam efeitos leishmanicidas, sugerindo que proteínas e peptídeos de veneno de serpentes podem ser valiosos agentes antileishmania⁷⁷. O peptídeo BnSP-7, do veneno de *Bothrops pauloensis*, tem um IC₅₀ (concentração onde 50% das células ficam inviáveis) de 58,7 µg/mL contra formas de parasitas promastigotas⁷⁸, aproximadamente 4,28 µM, que se assemelha às nossas descobertas para BatxC de *Bothrops atrox* (4,90 µM). No entanto, o peptídeo p-Acl de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, pertencente à mesma classe de inibidores da PLA2, tem EC₅₀ de 50,98 µM⁷⁹, ressaltando que o mecanismos de ação destas moléculas são diferentes, os inibidores como p-Acl têm ação enzimática. Esses valores são notadamente superiores aos de BatxC (4,90 µM), BatxC(C-2,14Phe)des Phe1 (8,86 µM) e BatxC(C-2,15Phe) (6,74 µM). Por isso, existem diferenças na *Leishmania* spp. para promastigota em concentrações inibitórias, de acordo com as moléculas e as fontes do veneno de serpente, mesmo dentro da família das catelicidinas.

A avaliação dos efeitos da integridade na membrana de *Leishmania*, foram realizados por ensaios SYTOX Green® (**FIGURA 3B**). Esta sonda entra nas células após a ruptura da membrana e torna-se fluorescente após a interação com o DNA⁸⁰ (**FIGURA 3C**). Verificamos que os três peptídeos alteraram a membrana celular do parasita ao longo do tempo, com BatxC(C-2.15Phe) sendo o mais ativo na alteração da integridade da membrana do parasita em ambas as concentrações testadas (EC₅₀ e 2×EC₅₀) (**FIGURA 3D**). Em outros estudos, foi demonstrado que as catelicidinas ou moléculas semelhantes a catelicidina, como BMAP-28, um PAM bovino, afeta a viabilidade de *Leishmania major* e foi associado a danos na membrana celular⁸¹, sugerindo que esta classe de peptídeos pode interagir com a membrana de *Leishmania* e induzir a morte.

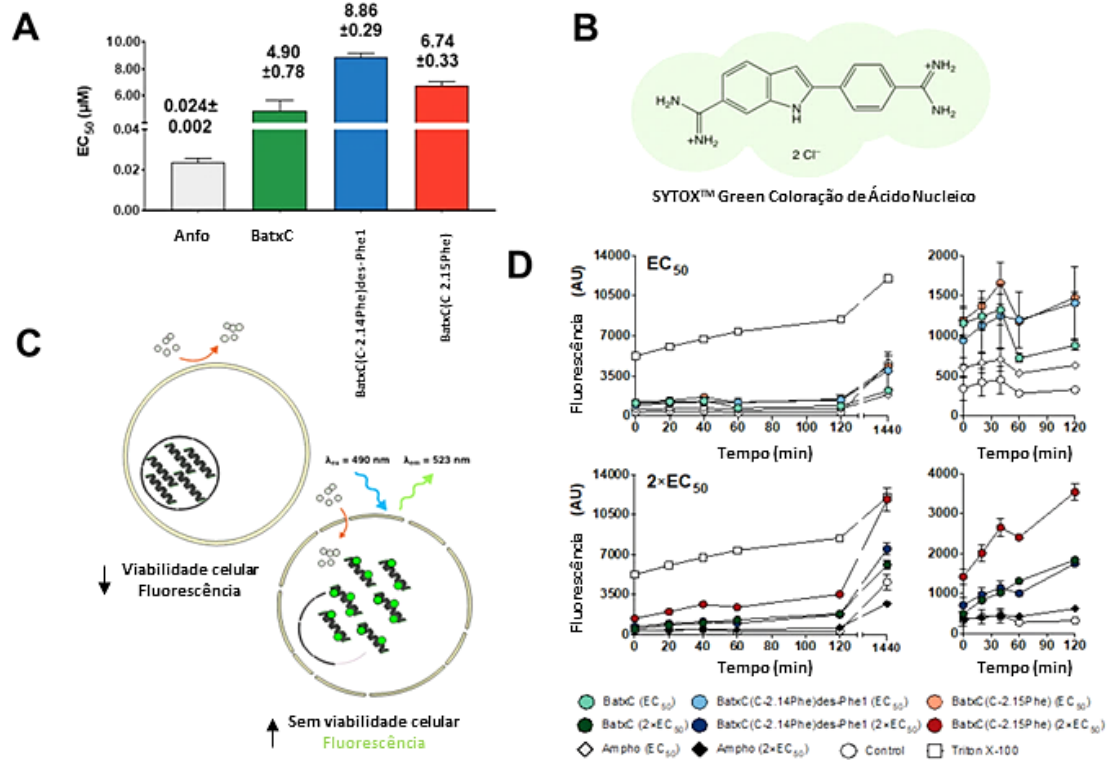


Figura 3. (A) Atividades leishmanicida e integridade da membrana celular induzidas por batroxicidinas em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* incubada com peptídeos e anfotericina B (Ampho), e os respectivos valores de concentração efetiva de 50% (EC₅₀) estimados por 24 h. **(B)** Estrutura SYTOX Green® **(C)** Esquema simplificado do mecanismo de ação da sonda SYTOX Green® **(D)** *L. (L.) amazonensis* na forma promastigota foram incubadas com os peptídeos na EC₅₀ ou em 2×EC₅₀, a integridade da membrana do parasita foi analisada usando SYTOX Green®. Os resultados são expressos com absorbância média±desvio padrão (DP) de experimentos independentes (n=3).

A análise de microscopia de força atômica (MFA) revelou que o controle das células não tratadas, não apresentavam alterações morfológicas e a estrutura flagelar, foi preservada (**FIGURA 4A**). O tratamento com BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 (61,98 μM) e BatxC(C-2.15Phe) (59,81 μM) resultou em evidências de grandes mudanças morfológicas, incluindo deformações morfológicas com padrões enrugados (**Figura 4B e C**).

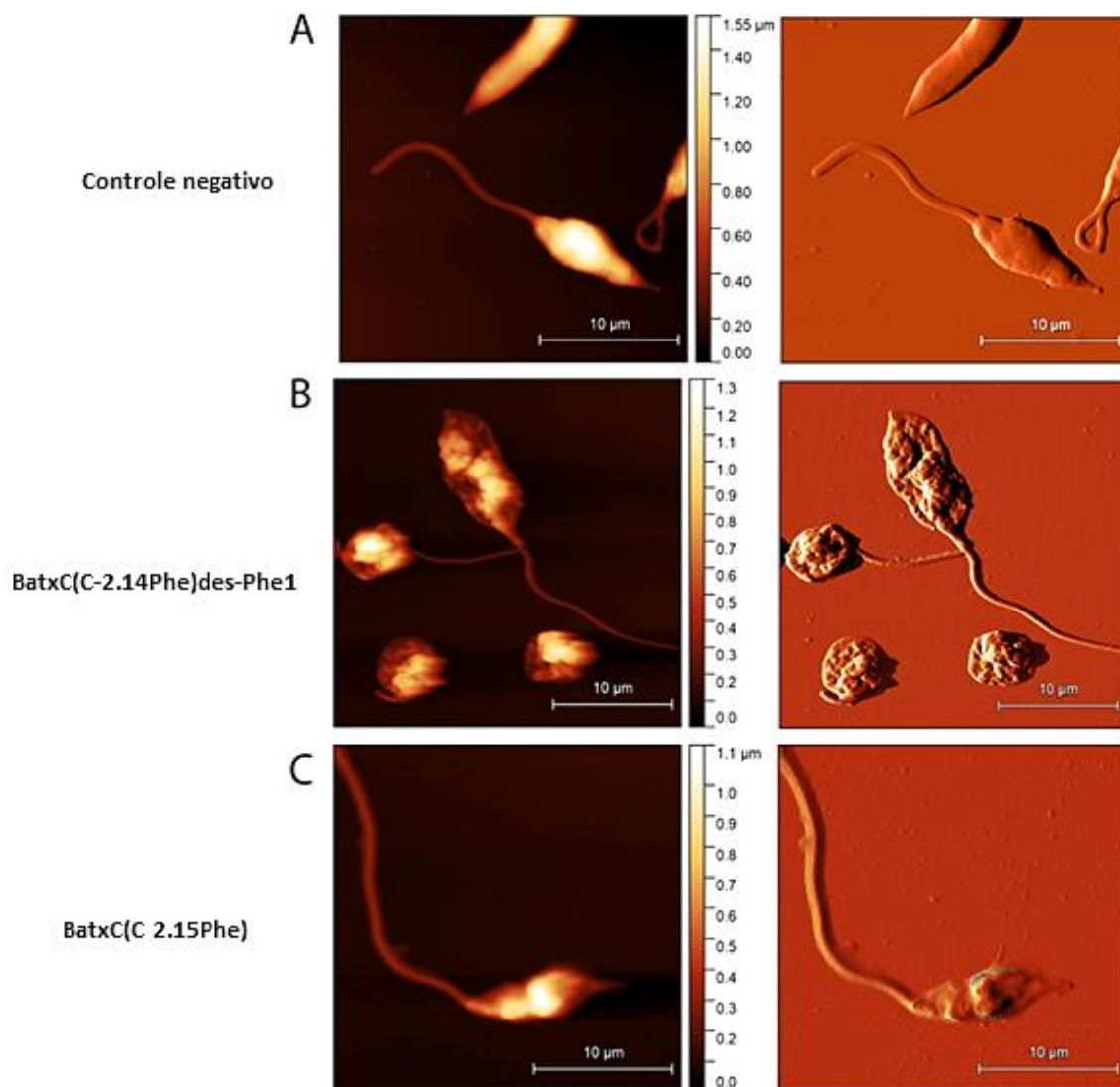


Figura 4. Caracterização morfológica por microscopia de força atômica de promastigotas de *L. amazonensis*: controle de promastigotas **(A)** e tratados com **(B)** BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 61,98 μM e **(C)** BatxC(C-2.15Phe) 59,81 μM . As imagens da esquerda são dados da altura; imagens da direita são amplitude dados.

Essas concentrações, que são superiores aos resultados do EC_{50} , foram escolhidas para demonstrar o efeito sobre a membrana do parasita, que pode estar associada à danos na membrana, sugerindo que os peptídeos têm a capacidade de interagir e danificar a membrana celular. Essas imagens indicam que os análogos de BatxC podem representar excelentes peptídeos leishmanicidas, com grande impacto sobre as membranas desses protozoários. BatxC e seus análogos diminuiriam significativamente o índice de infecção, de forma dose-dependente,

sendo altamente ativo na eliminação de amastigotas intracelulares em macrófagos em concentrações micromolares (**FIGURA 5A**). Para MØ peritoneal (macrófagos) tratados com BatxC, BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 e BatxC(C 2.15Phe) nas mesmas concentrações, a média parasitária, carga por macrófago foi avaliada, com um controle médio de $5,07 \pm 0,27$. Entre os três peptídeos estudados, o melhor dos resultados foram de $1,96 \pm 0,11$ para amastigotas por macrófago (**FIGURA 6B e C**).

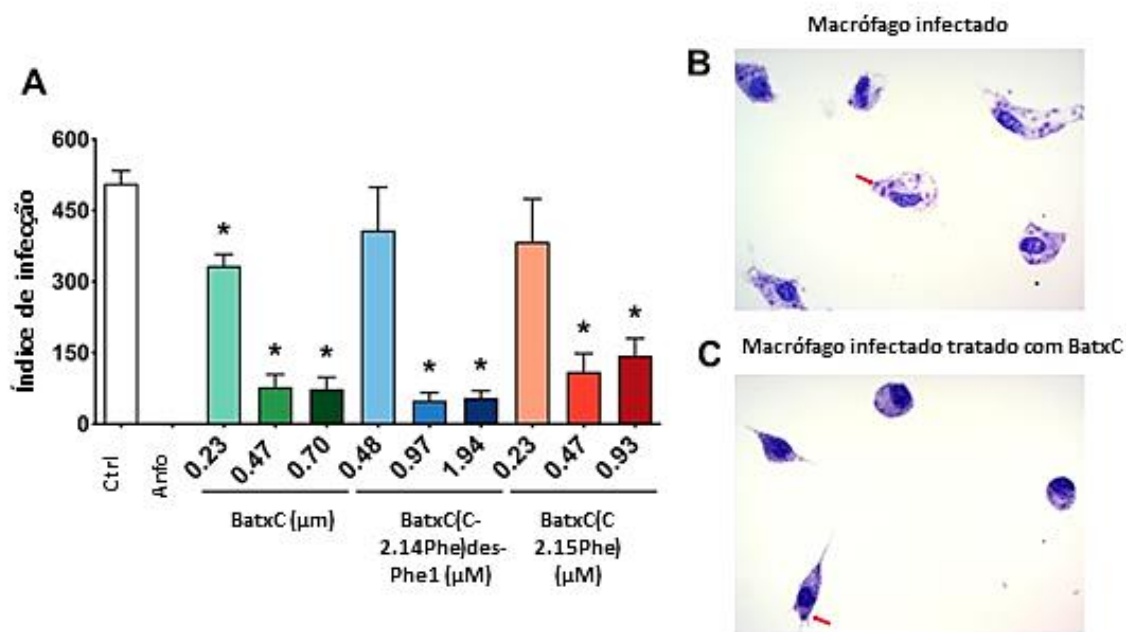


Figura 5. Ensaios antileishmania em amastigotas. **(A)** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e então tratados com diferentes concentrações de peptídeos ou anfotericina B (Ampho); após 24 h as células foram coradas com Giemsa 10% e os respectivos índices de infecção foram determinados. **(B)** Macrófagos infectados (controle positivo) e **(C)** macrófagos tratados com 0,70 µM BatxC. Setas vermelhas indicam as amastigotas no citoplasma dos macrófagos. Ampliação de 100x. *Estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

Estudos em macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* sugerem que o potencial leishmanicida desta classe de moléculas pode estar intimamente relacionada à sua atividade imunomoduladora. Isso foi sugerido pela pequena eficácia das concentrações testadas, que estavam na faixa sub/micromolar. Dentro além de propriedades bactericidas diretas, catelicidinas e

outros peptídeos semelhantes a catelicidina podem desencadear respostas específicas de defesa, incluindo atividades imunomoduladoras, bem como modulação da expressão de quimiocinas em respostas pró e anti-inflamatórias. Através desse experimento, a atividade antileishmania pode estar relacionada com a expressão desses mediadores, que devem ser investigados mais especificamente em outros estudos e protocolos abordados para BatxC.

Além disso, a promoção da cicatrização de feridas e a inibição da apoptose celular também foram previamente descritos⁸². A catelicidina-PP tem potente atividade anti-inflamatória por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (NO, TNF- α e IL-6) induzidas por LPS em células de macrófagos peritoneais de camundongos (MPMs)⁸³. Além disso, várias catelicidinas aumentam a expressão de quimiocinas em células murinas RAW 264.7⁸⁴. Finalmente, em estudos recentes usando PSN-1 (filoseptina, um PAM isolado da pele de anfíbios secreções)⁸⁵, atividade antileishmania contra amastigotas em macrófagos infectados foram relacionadas à modulação de marcadores como óxido nítrico e TNF- α . Exploração adicional desses mecanismos imunomoduladores relacionados ao BatxC e seus análogos sintéticos em estudos futuros são necessários para melhor compreender o mecanismo de ação intracelular.

3.4. Estudos estruturais de interação com modelos de membranas biomiméticas

A relação entre estrutura-função em peptídeos antimicrobianos relacionados à catelicidinas (CRAMP) ainda está sob investigação. Barros et al. (2019)⁸⁶ comentou que apesar da atividade antimicrobiana e anti-*Trypanosoma cruzi* já descrito para BatxC, nada se sabe sobre seu mecanismo de ação contra microrganismos e não há estudos sobre sua estrutura na literatura. Para preencher essa lacuna, nós estudamos BatxC e dois análogos sintéticos por ECD (electronic dichroísmo circular) e RMN na presença e ausência de micelas DPC (Dodecil Fosfatidilcolina) que serviram como membrana mimética (**FIGURA 6**).

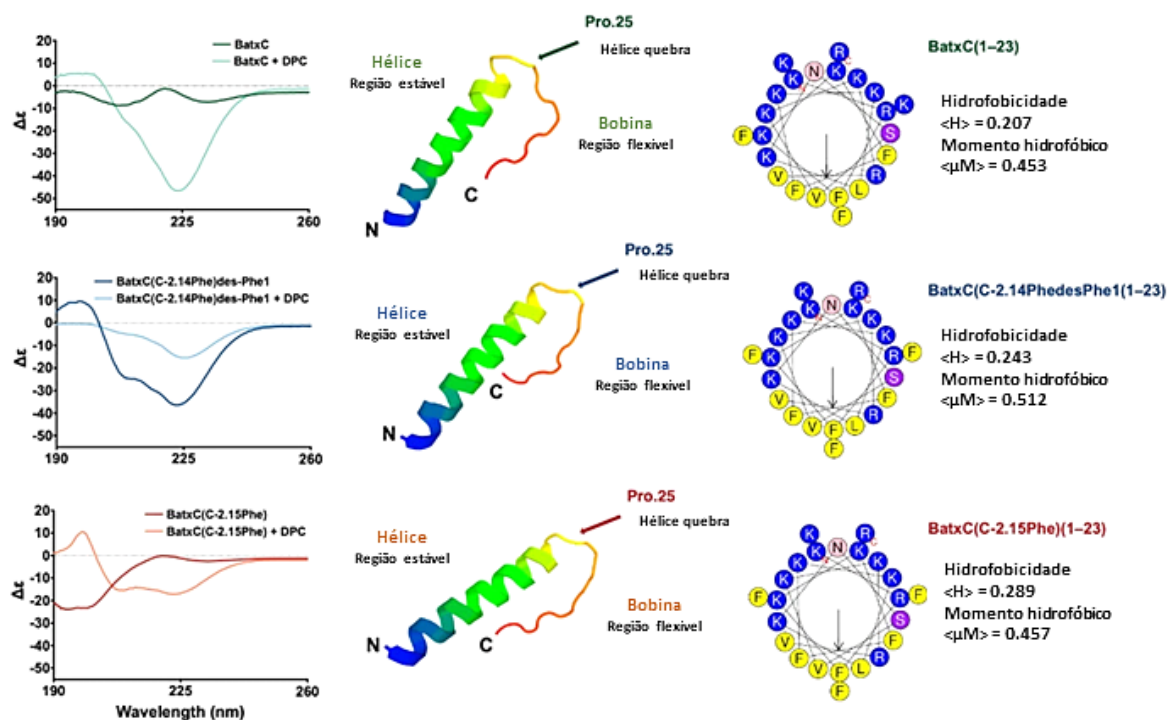


Figura 6. Dicroísmo circular e modelos estruturais *in silico* de BatxC e análogos sintéticos. Espectros ECD de BatxC e seus análogos sintéticos em solução aquosa e na presença de DPC (Dodecil Fosfocolina). Estrutura *in silico* para BatxC e seus análogos sintéticos: modelos de estrutura tridimensional gerados pelo PEP-FOLD 3.5⁵⁹ (Shen *et al.*, 2014) e projeções de roda helicoidal, com o fragmento 1-23 da sequência de aminoácidos, corresponde a estrutura α -hélice, juntamente com seus dados de hidrofobicidade (H) e momento hidrofóbico (μH)⁶⁰.

Os espectros ECD de BatxC e BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 não nos permitiu identificar claramente o padrão dos elementos secundários dos peptídeos, em solução aquosa quanto na presença das micelas DPC, BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 exibe um espectro de dicroísmo circular, com um grande pico negativo em torno de 223 nm e um “ombro” negativo em 209 nm. BatxC exibe quase nenhum sinal ECD na ausência de DPC, mas exibe um forte pico negativo em 223 nm na presença de DPC. Em contraste, BatxC(C-2.15Phe) exibe uma estrutura randômica em água e uma estrutura α -helicoidal na presença de Micelas DPC.

A **FIGURA 7** mostra a região amida/aromática do ¹H-RMN, espectros dos três peptídeos, na ausência e na presença de DPC. Como muitos outros peptídeos bioativos, a mudança química e a dispersão de N^H é fraca na ausência de um lipídio ou detergente. Após a adição do detergente anfílico em DPC, o produto químico

de dispersão de deslocamento de sinais de amida, aumenta muito, o que é indicativo da formação de estrutura secundária estável dos elementos, corroborados pelos dados do CD.

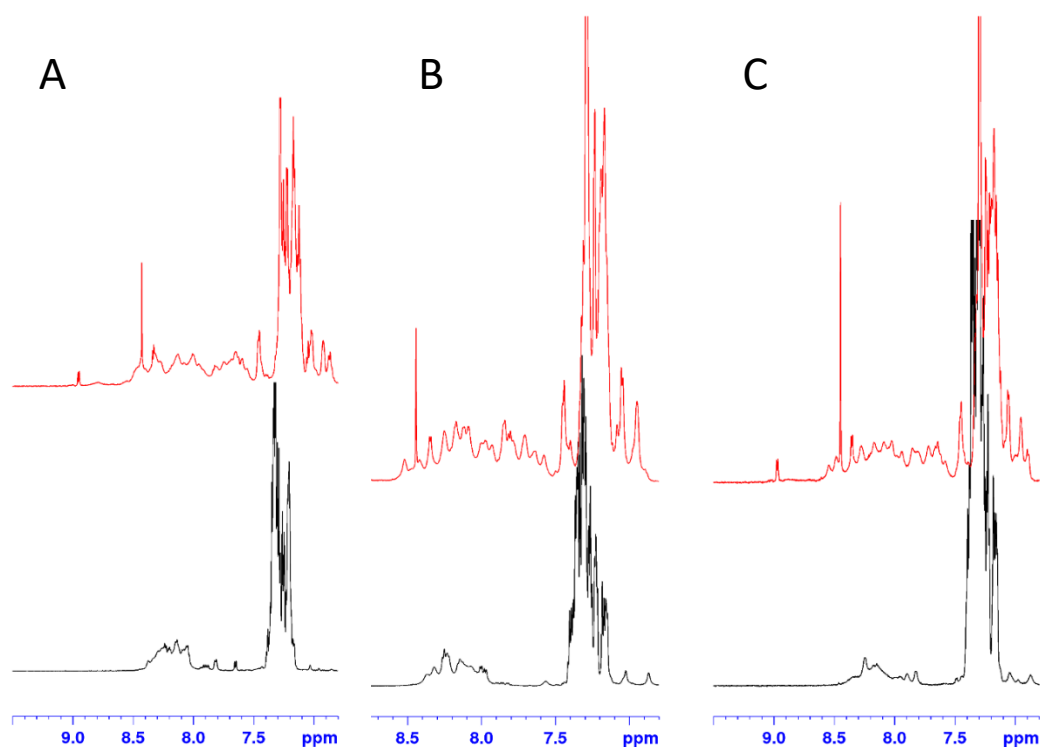


Figura 7. N^H /aromático região dos espectros de 1H -RMN de BatxC e análogos sintéticos em solução aquosa na ausência (**preto**) e na presença (**vermelho**) de DPC. **(A)** BatxC; **(B)** BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1); **(C)** BatxC(C-2.15Phe).

O peptídeo Ctn em seu comprimento total adota uma estrutura hélice-Pro-espiral em um ambiente semelhante a membrana (Dodecil Fosfocolina) e estudos de RMN também mostraram que o Ctn(1-14) adota uma α -hélice anfipática bem definida, enquanto Ctn(15-34) permanece não estruturado⁸⁷. Curiosamente, no entanto, as propriedades antibacterianas e anticancerígenas do Ctn natural, foram retidos apenas no fragmento não estruturado, Ctn(15-34), mostrando que a correlação da adoção da estrutura secundária e a eficácia biológica nem sempre é fácil de interpretar. Esses achados, juntamente com a literatura atual sobre PAMs, suportam a hipótese de que a flexibilidade estrutural pode desempenhar um papel fundamental na função dessas moléculas⁸⁸.

Experimentos de extrusão em membrana foram realizados para avaliar a desestabilização ou ruptura devido à ação do BatxC e análogos. Os efeitos

peptídicos nas vesículas lipídicas foram avaliados através de medições de vazamento por fluorescência de carboxifluoresceína. O impacto da concentração em sistemas miméticos simples de membranas celulares eucarióticas, POPC:Chol (70:30) e bactérias membranas, POPC:POPG (80:20), também foi medido. Os resultados evidenciam um efeito maior para BatxC em 0,47 μM , com aproximadamente 50% de vazamento para POPC:POPG e 35% para POPC/Chol (**FIGURA 8A**). BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 a 0,48 μM também exibiu um maior impacto no POPC:POPG do que em POPC:Chol (35% e 30% de fuga, respectivamente; **FIGURA 8B**). BatxC(C-2.15Phe) a 0,94 μM apresentou um efeito mais forte: 60% de vazamento para ambas as composições de membrana (**FIGURA 8C**).

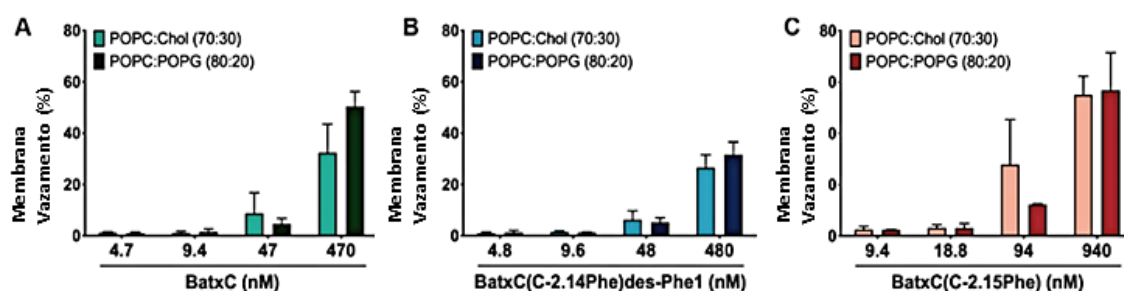


Figura 8. Vazamento em membrana (%), avaliação de ruptura de POPC:Chol (70:30) e POPC:POPG (80:20) vesículas unilamelares grandes (LUVs). Concentrações crescentes em **(A)** BatxC, **(B)** BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 e **(C)** BatxC(C-2.14Phe) usadas a partir de 1/100 de suas CIMs correspondentes contra *E. coli*.

As concentrações utilizadas referem-se às suas CIMs (**TABELA 1**) obtido para *E. coli* ATCC 25922. Esses ensaios também fornecem dados sobre concentrações inferiores às CIMs, mostrando a capacidade do peptídeo de causar ruptura dos lipídios das vesículas estudadas mesmo em concentrações 10 vezes menores do que seus respectivos CIMs. Além disso, os efeitos sobre o modelo mimético em membranas eucarióticas corroboram com resultados de citotoxicidade em células de mamífero (**TABELA 2**). Esses achados juntamente com as imagens obtidas pelo MFA, mostrando que o peptídeo, CIM, não rompeu completamente a membrana, mas sim, formou poros em regiões por toda a superfície celular, e causando pequenas distorções em *E. coli* ATCC 25922 (**FIGURA 3B**).

Estudos anteriores com crotalidina evidenciaram a incapacidade de perturbar bicamadas POPC puras, não induzindo o vazamento de carboxifluoresceína nessas membranas zwitteriônicas. No entanto, para concentrações acima de 2,17 μM , foi capaz de alterar a carga negativa das vesículas POPC:POPS (80:20). Características catiônicas e anfipáticas da família peptídica catelicidina podem ser os fatores que explicam sua maior interação com vesículas carregadas negativamente quando comparado com membranas neutras^{89,90}. No entanto, dependendo das concentrações utilizadas, dificilmente será observada seletividade, pois o peptídeo induziu o vazamento em ambas as composições de membrana.

3.5. Ensaio de citotoxicidade com células de mamíferos

Nos ensaios com macrófagos de camundongo J774, BatxC, BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 e BatxC(C-2.15Phe) mostraram concentrações citotóxicas (CC_{50}) para inibição do crescimento celular de 1,60, 3,51 e 2,14 μM (**TABELA 2**), aumentando para 21,74, 34,07 e 29,40 μM , em queratinócitos humanos (HaCaT), respectivamente. Como se pode notar, os resultados do CC_{50} para as culturas de células J774 foram bastante baixas. Os valores CC_{50} contra os macrófagos J774 estão próximos da CIM dos peptídeos, que poderia limitar a aplicação futura dessas moléculas como drogas antileishmania contra promastigotas. No entanto, os valores de CC_{50} contra HaCaT são maiores.

Experimentos *in vivo* devem ser conduzidos, uma vez que as condições de cultivo e a escolha das linhagens pode ter um impacto na ação farmacológica. Uma variedade de estudos avaliando os efeitos citotóxicos de PAM de serpentes contra *Leishmania* spp. estão disponíveis na literatura. Por outro lado, BmatTX-IV, uma molécula encontrada em *Bothrops matogrossensis*, exibiu efeitos citotóxicos em fibroblastos murinos a uma concentração de 81,2 $\mu\text{g/mL}$ (aproximadamente 6 μM)⁹¹, e a BmajPLA2-II, encontrada no veneno de *Bothrops marajoensis*, mostrou uma CC_{50} acima de 150 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem celular humana HepG2⁹². Toxicidade induzida por peptídeos de serpente, como para muitas outras moléculas, pode ter variações moleculares, celulares, em órgãos e organismos. Alterações metabólicas e oxidativas, aumento do estresse^{93,94}, morte celular por

apoptose^{95,96} e necrose⁹⁷ são todos mecanismos de ação observados em estudos semelhantes.

Tabela 2. Ensaio de citotoxicidade em linhagens celulares padrão (Média±DP; n=3)

Peptídeos	CC ₅₀ (µM)	
	MØ J 774	HaCaT
BatxC	1,60±0,11	21,74±4,83
BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1	3,51±0,74	34,07±6,37
BatxC(C-2.15Phe)	2,14±0,20	29,40±13,38

4. CONCLUSÃO

Este estudo mostra que o peptídeo BatxC e dois variantes sintéticos BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 e BatxC(C 2.14Phe) são bactericidas e leishmanicidas altamente eficientes em concentrações micromolares. Com base nestes ensaios, as interações entre as moléculas e membranas dos parasitas e bactérias foram demonstradas. As avaliações preliminares do mecanismo de ação desses peptídeos, realizado com sistemas de membranas biomiméticas, sugerem maior seletividade de BatxC e seus análogos sintéticos para membranas procarióticas do que para células de mamíferos, dependendo da faixa de concentração. Além do efeito direto antileishmania sobre as membranas do parasita, um efeito imunomodulador é observado em MØ peritoneal BALB/c, levando a morte da forma amastigota de *L. amazonensis*. Estes achados sugerem que os peptídeos podem ser uma alternativa para futuros tratamentos contra a leishmaniose tegumentar. Mesmo assim, mais estudos são necessários para entender melhor os possíveis mecanismos de ação antibacteriana e leishmanicida para redução da carga parasitária.

5. AGRADECIMENTOS

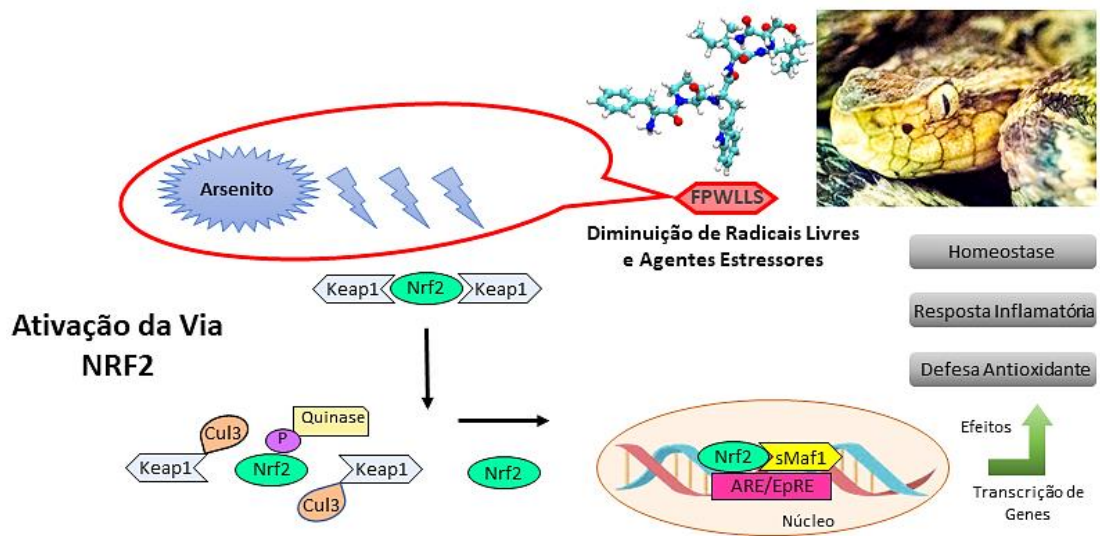
Este trabalho foi apoiado pela Fundação o de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF, Brasil, número de concessão 00193.00001937/2018-83). A.D. agradece ao Conselho Nacional Brasileiro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (142099/2018-0). O trabalho foi apoiado pela FCT (PTDC/BII-BIO/31158/2017). A.P. é bolsista de pós-doutoramento do mesmo projeto. A.C.M. e J.M. agradecem à Fundação o de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, números de bolsas 2016/22488-3 e 2019/25905-2; 2018/24077-6), Brasil. C.P.A. reconhece a bolsa FCT-MCTES PD/BD/136860/2018. Agradecemos também o Projeto Norte-01-0145-FEDER-000012 [Programa estruturado em bioengenharia terapias para doenças infecciosas e regeneração de tecidos, apoiado pelo Programa Operacional Regional Norte Portugal (NORTE 2020), no âmbito da Parceria PORTUGAL 2020 Acordo, através do Programa Europeu de Desenvolvimento Regional Fundo (FEDER)]. *Biopropectum*, Lda (Parque Tecnológico da Universidade do Porto (UPTEC), Porto, Portugal) é reconhecida pela gestão do projeto e apoio logístico na recepção da amostra em Portugal. Os autores agradecem a Wanessa Feliz Cabral (NuPMIA/UnB/Brasil) por seu suporte técnico nas análises RP-HPLC que tornam as Informações de Apoio deste artigo. A.C.M e J.M. agradecem a Fundação o de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (bolsa FAPESP números 2016/22488-3 e 2019/25905-2; 2018/24077-6) e HC-FMUSP, Brasil.

Capítulo II

Artigo submetido no periódico Journal of Natural Products (JNP) 2022

Impact Factor: 4.05 (2020) / Discipline: Biochemistry.

Submetido 01/04/2022



Efeito antioxidante e neuroprotetor da primeira triptofilina identificada em veneno de serpente (*Bothrops moojeni*)

Anderson Dematei^{1,2}, Samuel Ribeiro Costa³, Daniel C. Moreira², Eder Barbosa^{2,3}, Lucas F. Friaça Albuquerque², Andreeanne G. Vasconcelos², Tiago Nascimento⁴, Pedro Costa Silva⁴, Amandda É. Silva-Carvalho⁵, Felipe Saldanha-Araújo⁵, Mariana Camargo Silva Mancini⁶, Luis Gustavo Saboia Ponte⁶, Rosangela Maria Neves Bezerra⁶, Fernando Moreira Simabuco⁶, Augusto Batagin-Neto⁷, Guilherme Brand³, Tatiana Karla S. Borges², Peter Eaton^{8,9}, José Roberto S. A. Leite^{1,2,*}

¹Núcleo de Medicina Tropical, NMT, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB Brasília;

²Centro de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada, NuPMIA, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Brasil;

³Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas, LSAB, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil;

⁴Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Biotec, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, UFDPAr, Parnaíba, PI, Brasil;

⁵Laboratório de Farmacologia Molecular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil;

⁶Laboratório Multidisciplinar em Alimentos e Saúde (LabMAS), Faculdade de Ciências Aplicadas, UNICAMP;

⁷Instituto de Ciências e Engenharia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Itapeva

⁸LAQV/REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal;

⁹The Bridge, Laboratórios Joseph Banks, Escola de Química, Universidade de Lincoln, Lincoln, Reino Unido.

***Autor correspondente:** José Roberto de Souza de Almeida Leite, PhD. Address: Universidade de Brasília, UnB, Faculdade de Medicina. Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte. 70910900. Brasília, DF, Brasil. Phone number: +556131071891. E-mail: jrsaleite@gmail.com and jrleite@pq.cnpq.br.

RESUMO

A região do Delta do Parnaíba, no nordeste do Brasil, é rica em biodiversidade, incluindo a presença da serpente brasileira (*Bothrops moojeni*). Neste estudo, isolamos, caracterizamos e sintetizamos um peptídeo (BmT-2) pertencente à família das triptofilinas, sendo a primeira vez que um peptídeo dessa classe é identificado em veneno de uma serpente.

Para realizar aplicações biotecnológicas na área da saúde, testamos se o BmT-2 tinha efeitos citotóxicos e atividade antioxidante em um conjunto de experimentos que incluíram ensaios *in vitro* e celulares. Descobrimos que BmT-2 tinha atividade de eliminação de radicais para derivados de ABTS• e AAPH. O BmT-2 protegeu a fluoresceína, moléculas de DNA e os glóbulos vermelhos humanos dos radicais livres gerados pela decomposição térmica do AAPH. A nova triptofilina também foi considerada segura em testes citotóxicos, onde (até 0,4 mg/mL) não causou hemólise de hemácias humanas e não causou perda significativa de viabilidade celular com $CC_{50} > 1,5$ mM contra células Sk-N-BE(2). BmT-2 preveniu a regulação positiva de Nrf2 induzida por arsenito em neuroblastos Neuro-2a e a supergeração induzida por PMA de espécies reativas de oxigênio a espécies reativas de nitrogênio em células de neuroblastoma Sk-N-BE(2). Por fim, cálculos de estrutura eletrônica e simulações de dinâmica molecular atomística reativa completa, revelaram que resíduos aromáticos em BmT-2 contribuem significativamente para as propriedades antioxidantes intrínsecas da molécula. Nosso estudo apresenta um novo peptídeo classificado na família das triptofilinas, que foi relatado anteriormente apenas em anfíbios. Apesar dos resultados promissores sobre sua atividade antioxidante e baixa citotoxicidade, os mecanismos de ação do BmT-2 ainda precisam ser melhor elucidados. Estudar essa classe de moléculas é de grande interesse para a saúde, pois esses peptídeos demonstram potencial para tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas associadas ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Triptofilina, *Bothrops moojeni*, atividade neuroprotetora, antioxidante, peptídeo bioativo.

1. INTRODUÇÃO

As serpentes são amplamente distribuídas e encontradas em quase todas as regiões do planeta com aproximadamente 3.400 espécies com distribuição no globo terrestre⁹⁸. Em muitos casos, o ambiente onde esses animais vivem requer adaptações fisiológicas e morfológicas especializadas para sua sobrevivência⁹⁹. O sistema imune inato desses animais é composto por uma variedade de células e moléculas que atuam como primeira linha de defesa inespecífica contra patógenos, incluindo peptídeos antimicrobianos (PAMs), sistema complemento e leucócitos^{100,101}.

As catelicidinas, por exemplo, são peptídeos antimicrobianos com caráter catiônico devido à presença de resíduos carregados positivamente (lisina, arginina e histidina), apresentando estrutura anfifílica, variando de 10 a 50 resíduos de aminoácidos^{102,103}. Esses PAMs têm sido extensivamente estudados e possuem notável atividade antimicrobiana¹⁰⁴. De fato, os peptídeos antimicrobianos relacionados à catelicidina encontrados no veneno de *Bothrops atrox* são excelentes antimicrobianos, atuando contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas⁸⁶, bem como contra *Leishmania amazonensis*¹⁰⁵.

Diversas proteínas, enzimas e peptídeos em venenos de serpentes possuem especificidade para diferentes receptores em tecidos animais¹⁰⁶, causando efeitos fisiopatológicos. Por exemplo, o polipeptídeo neurotóxico α -bungarotoxina encontrado no veneno de *Bungarus multicinctus* atua bloqueando os receptores nicotínicos de acetilcolina, resultando em paralisia¹⁰⁷. A fosfolipase A2 (PLA2), encontrada no veneno de várias espécies de serpentes, exerce efeitos miotóxico¹⁰⁸, neurotóxico¹⁰⁹, hemolítico¹¹⁰ e pró-inflamatório¹¹¹. Apesar desses efeitos tóxicos, venenos de cobras, assim como outros de outros animais venenosos, são uma fonte viável de agentes farmacológicos e levam ao desenvolvimento de novos compostos terapêuticos.

Humanos e outros organismos aeróbicos produzem espécies reativas como produtos oxigênio-dependente de acordo com seu modo de vida. A vida na Terra desenvolveu vários mecanismos para controlar espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) enquanto as usava como elementos chave de sinalização celular¹¹². Sob condições basais/saudáveis, o

metabolismo redox (ou seja, a interação entre RS e sistemas antioxidantes) é mantido em equilíbrio. No entanto, várias circunstâncias podem perturbar esse equilíbrio, levando ao desequilíbrio redox e estresse oxidativo, que, em última análise, se manifesta como dano oxidativo excessivo às biomoléculas, incluindo DNA e proteínas¹¹³.

O estresse oxidativo está associado a doenças crônicas renais¹¹⁴, cardíacas¹¹⁵ e pulmonares¹¹⁶, além de doenças neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer (DA), Huntington (HD) e esclerose lateral amiotrófica²¹. O amplo envolvimento da interrupção da sinalização redox e do estresse oxidativo em patologias humanas motivou o desenvolvimento de terapias voltadas ao metabolismo redox, um campo denominado medicina redox¹¹⁷.

Poucos estudos descobriram novas moléculas não tóxicas com características antioxidantes de origem animal. Por exemplo, dois estudos recentes destacam as secreções da pele dos anfíbios como fonte de peptídeos antioxidantes. A Antioxidina-I (TWYFITPYIPDK), um peptídeo encontrado na secreção da pele de *Physalaemus nattereri* e mais 3 anfíbios da biodiversidade brasileira, exibe atividade neuroprotetora e micróglia humana atenuando a produção de EROs induzida por hipóxia¹¹⁸. A salamandrina-I (FAVWGCADYRGY), um peptídeo encontrado na secreção da pele de *Salamandra salamandra*, apresenta atividade sequestradora de radicais *in vitro* contra radicais ABTS [2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico)] e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato)¹¹⁹.

E mais recente ainda, um peptídeo encontrado em anfíbio com importante atividade antioxidante e da classe das triptofilinas, o PaT-2 (FPPWL), identificado e isolado da secreção cutânea produzida por *Pithecopus azureus* foi capaz de diminuir a produção de EROs e ERNs em células nervosas de BV2 e SK-N-BE(2) quando induzida ao estresse oxidativo por PMF¹²⁰. Este peptídeo tem o pormenor de ser o primeiro peptídeo que é produzido na pele do animal na transição/água terra, ressaltando uma hipótese de sua produção para o animal para enfrentar estresse ambiental como radiação ultravioleta.

No caso de serpentes, a fração rica em peptídeos de baixo peso molecular (LMWF) obtida do veneno de *B. atrox* anulou a regulação positiva da argininosuccinato sintase (AsS), superóxido dismutase (SOD1) e biomarcadores de apoptose em cultura primária de células de hipocampo estimuladas por H₂O₂³⁰.

Além disso, Bj-PRO-5a (EKWAP) e Bj-PRO-7a (EDGPIPP), peptídeos originalmente encontrados no veneno de *Bothrops jararaca*, aumentam a viabilidade de células de neuroblastoma humano sob estresse oxidativo induzido por H₂O₂¹²¹. Assim, o veneno de cobra se destaca como uma fonte relativamente pouco explorada de peptídeos antioxidantes.

Neste estudo, identificamos e caracterizamos pela primeira vez um peptídeo pertencente à família das triptofilinas em veneno de serpente.

O peptídeo (FPWLLS-NH₂), denominado BmT-2, foi identificado do veneno bruto de *Bothrops moojeni* (espécie da região nordeste do Brasil) depois de sucessivas etapas de purificação via CLAE. A capacidade antioxidante do peptídeo foi avaliada pelos métodos de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e ABTS, além de ensaios de dano ao DNA. Possíveis mecanismos associados à reatividade local e interações relevantes em solução foram avaliados por meio de cálculos de estrutura eletrônica e simulações de dinâmica molecular com campo reativo (DMCR). Entretanto, foi também avaliado a atividade hemolítica e o potencial anti-hemólise induzida por AAPH em eritrócitos humanos. Além disso, a citotoxicidade e o potencial neuroprotetores foram avaliados em células de neuroblastoma humano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico

Um espécime adulto de *Bothrops moojeni* (**Figura 1**) foi capturado em outubro de 2018 (estação de primavera), na região do Delta do Parnaíba. A região está localizada na Ilha das Batatas (Latitude 2°53'0,24"S; Longitude 41°54'0,11"W), entre os estados do Maranhão e Piauí. A licença para coleta da amostra foi concedida pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) (N° AE5F104). O veneno deste espécime foi extraído, congelado e liofilizado.

2.2 Purificação, identificação e caracterização de BmT-2

O extrato de veneno bruto liofilizado foi dissolvido (3 mg/mL) em água ultrapura e separado por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (CLAE) usando uma coluna analítica RP-C18 (4,6 × 250 mm, 5 µm, Shim-pack VP-ODS) em um sistema RP-HPLC (Shimadzu®). As frações foram eluídas sob um gradiente linear de água e acetonitrila, ambas contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA). O gradiente foi ajustado de 5 a 60% por 65 minutos e 75%-95% para os 5 minutos finais, com vazão de 1 mL/min. A absorbância foi monitorizada a 216 nm e 280 nm. As frações foram coletadas manualmente e concentradas a 30°C durante a noite (Labconco, CentriVap Acid-Resistant Concentrator System, 7983013). Em seguida, 1 µL de cada fração cromatográfica foi dissolvido em matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (1:3, v/v) e aplicado na placa MALDI para avaliar moléculas de baixo peso molecular através do tempo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz de Espectrometria de Massa (MALDI TOF/TOF MS). Para tanto, utilizou-se um espectrômetro de massas UltraFlex III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) no modo refletor de íons positivos e controlado com o software FlexControl. Foi realizada recromatografia da região B total com concentração de amostra de 40 µg/mL e corrida com fluxo de 10 mL/min (**Figura 1C**). As amostras isoladas e secas foram submetidas a nova análise por MALDI-TOF/TOF, e o peptídeo de interesse foi confirmado e selecionado. Determinado sequenciamento de aminoácidos foi realizado pelo método automatizado de degradação de EDMAN em um sequenciador de peptídeos de proteína PPSQ-23 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

2.3 Síntese e caracterização de BmT-2

A massa monoisotópica de BmT-2 (FPWLLS-NH₂), [M+H]⁺ = 761,466 foi sintetizada por síntese de peptídeos em fase sólida – SPPS, usando a estratégia Fmoc/tBu e uma resina de amida de pista (Novabiochem®) 0,15 mmol/g como suporte sólido (100-200 mesh)¹²². O peptídeo foi purificado por HPLC (**ANEXO III**) e sua massa molecular foi confirmada por MALDI TOF/TOF (**ANEXO IV**) de acordo com o protocolo descrito por Dematei *et al.*¹⁰⁵. A abundância isotópica foi prevista pelo Compass Isotope Pattern (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

2.4 Análise *in silico*

A estrutura inicial do peptídeo BmT-2 foi projetada por meio de modelagem de homologia com o auxílio do MPI Bioinformatics Toolkit^{123,124}. A sequência foi amidada no C-terminal e protonada no N-terminal (NH₃⁺). A estrutura molecular foi então totalmente otimizada no quadro da teoria funcional da densidade (DFT) usando a base funcional de troca-correlação B3LYP^{125,126} e 6-311G(d,p) definida em todos os átomos. Os cálculos foram conduzidos em água simulada através do modelo contínuo polarizável (PCM)¹²⁷.

A reatividade química local da sequência foi avaliada através de índices de Fukui condensados para átomos (IFCAs)¹²⁸ com o objetivo de identificar sítios moleculares reativos. Esses parâmetros já foram usados anteriormente para avaliar as propriedades antioxidantes de peptídeos com sucesso^{120,119}, permitindo a identificação dos átomos propensos a interagir efetivamente com nucleófilos (f⁺), eletrófilos (f⁻) ou radicais livres (f⁰). Os IFCAs foram estimados por meio de diferenças finitas das populações atômicas obtidas pelo método de partição de Hirshfeld, conforme descrito em outro lugar^{129,130}.

As propriedades antioxidantes do BmT-2 também foram avaliadas por meio de mapas doador-aceptor (MDA)¹³¹ e comparadas com outros antioxidantes bem conhecidos, incluindo sequências peptídicas curtas (calculadas como zwitterions) L-carnonise, glicil-L-histidil-L-lisina (GHK) e glutathione, e o peptídeo antioxidante recentemente relatado salamandrina-I¹¹⁹. As estruturas foram otimizadas considerando as geometrias iniciais provenientes de outros estudos do grupo^{120,119} utilizando uma abordagem DFT/B3LYP/6-311G(d,p)/PCM(água). Apenas cálculos de ponto único foram realizados para a salamandrina-I (sem otimização de geometria em relação à referência [¹²⁰]).

Simulações de dinâmica molecular com campo reativo (DMCR) também foram conduzidas para avaliar detalhes sobre as interações peptídeo-peptídeo e peptídeo-AAPH. Para isso, a estrutura do modelo BmT-2 foi colocada em contato com moléculas de AAPH em água. Uma caixa quadrada de 50 x 50 x 50 Å foi projetada com 5 peptídeos e 5 moléculas de AAPH (não degradado). O número de moléculas de água foi estimado a partir da densidade do solvente a 300K. O sistema foi deixado evoluir à temperatura ambiente em um conjunto NVT por 0,2 ns para avaliar as interações mais relevantes (dado o pequeno tamanho do sistema,

ele atinge o equilíbrio térmico logo após 0,01 ns (consulte Material Suplementar para detalhes). Condições de contorno periódicas (PBC) foram aplicadas para todas as direções. As simulações DMCR foram realizadas usando o campo de força ReaxFF¹³², conforme implementado no pacote computacional LAMMPS^{133,134}, considerando um passo de tempo de 0,05 fs. Um campo de força reativo foi escolhido para permitir a simulação de dissociação de AAPH e também avaliar possíveis reações químicas que possam ocorrer no sistema.

2.5 Medição da capacidade de eliminação de radicais

ABTS. Uma solução estoque de 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS) radical (ABTS•) foi preparada incubando ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (140 mM) por 16 h em temperatura ambiente e protegido da luz. O estoque ABTS• foi diluído para atingir um valor de absorvância de $0,700 \pm 0,020$ nm a 734 nm em uma cubeta de 1 centímetro. A solução peptídica reagiu com ABTS• por 6 min à temperatura ambiente antes de ler a 734 nm após 6 minutos de reação. Várias diluições de uma solução Trolox (12,5-200 μ M) foram usadas para construir uma curva de referência. Os resultados da atividade de eliminação de radicais são expressos como equivalentes de Trolox por grama de peso seco do peptídeo (μ mol Trolox/g de Peso Seco - DW).

ORAC. O ensaio de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) baseia-se na capacidade de uma determinada molécula retardar a perda de fluorescência emitida pela fluoresceína em um meio reacional contendo um sistema gerador de radicais livres¹³⁵. Neste ensaio, a fluoresceína perde sua fluorescência com o passar do tempo devido ao dano oxidativo e as moléculas antioxidantes retardam a taxa de perda de fluorescência. O ensaio ORAC foi realizado conforme descrito anteriormente¹³⁶. Os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox por grama de peso seco do peptídeo (μ mol Trolox/g de DW).

2.6 Danos ao DNA induzidos por AAPH

A quebra do DNA plasmidial causada por radicais livres foi avaliada conforme descrito por Yampakdee *et al.*¹³⁷. O ensaio foi ajustado com 2 μ L de BmT-2 (a 1 ou 4 mg/mL) misturado com plasmídeos superenrolados (pcDNA, a 125

ng/uL) e AAPH 30 mM. O meio reacional foi incubado a 37°C por 1 h no escuro. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com SYBR safe (1:20.000). A densidade de banda foi quantificada usando o software ImageJ.

2.7 Estudos em eritrócitos humanos

Atividade hemolítica. O ensaio de atividade hemolítica de BmT-2 foi testado utilizando hemácias humanas (RBCs)/O⁺ coletadas em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 1,8 mg/mL) conforme descrito anteriormente por Sousa *et al.*, 2020¹³⁸, com algumas modificações. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Universidade de Brasília (CEUA), sob o número 47/2019. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 292 x g e os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 37°C, após o que os pellets foram ressuspensos e diluídos em PBS. A suspensão de RBC foi ajustada para 5% das células e 80 µL desta suspensão foram adicionados a 20 µL de BmT-2 em diferentes concentrações (0,25–1,6 mg/mL). A mistura de ensaio foi incubada a 37°C por 1 h, seguida pela adição de 100 µL de PBS e centrifugação por 5 minutos a 1.000xg. O sobrenadante foi lido a 550 nm em um leitor de microplacas SpectraMax® Plus 384 (Molecular Devices, EUA). O experimento foi feito em triplicata. A ausência de hemólise (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foi avaliada tratando RBC com PBS (pH 7,4) e 0,1% (v/v) triton X-100, respectivamente. A porcentagem de hemólise foi calculada da seguinte forma: $[(Abs_{peptideo} - Abs_{PBS}) / (Abs_{TritonX} - Abs_{PBS})] \times 100^{138}$.

Inibição da hemólise induzida por AAPH. A suspensão de hemácias humana foi ajustada para 3% de células para o ensaio. Em microplacas de 96 poços, 80 µL de hemácias (a 3%) foram adicionados, então 20 µL de BmT-2 (0,25-1,6 mg/mL), PBS (controle negativo) ou 0,6 mM trolox (controle positivo) foram adicionados aos poços que contêm os glóbulos vermelhos. Em seguida, a placa foi incubada sob agitação suave a 37°C por 20 minutos. Imediatamente após a incubação, 100 µL de dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) (AAPH) foram adicionados a uma concentração final de 60 mM. A placa foi incubada novamente sob agitação por 3 h a 37°C. A placa foi centrifugada a 4.700 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para outra placa para leitura no

espectrofotômetro ajustado em 550 nm para quantificação da atividade hemolítica. Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração hemolítica média (CH₅₀) considerando o controle positivo como 100% de hemólise¹³⁹.
Atividade hemolítica (%) = $\frac{Abs_{amostra} - Abs_{salina}}{Abs_{AAPH} - Abs_{salina}} \times 100$.

2.8 Análise do teor de proteínas antioxidantes em células Neuro2a submetidas ao estresse oxidativo induzido por arsenito

Uma linhagem de células de neuroblastoma de camundongo (Neuro2a) foi cultivada em meio Ham (F-12) modificado de Eagle Dulbecco (1:1) (Thermo Scientific) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina/estreptomicina (Thermo Scientific). N2a foram submetidos à diferenciação de neuritos (qualquer filamento ou crescimento em formato de ponta apresentado por células neurais em cultura de tecido ou células embrionárias) por incubação com meio contendo 2% de FBS por 48 h antes do tratamento com 25 µM de arsenito e 100 µM de peptídeo por 3 h. As células foram mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de dióxido de carbono. As células foram obtidas na Faculdade de Ciências Médicas (Universidade de Campinas, UNICAMP). Os experimentos não foram randomizados/cegos.

2.9 Western blotting

As células Neuro2a foram tratadas com 100 µM de peptídeo por 3 h combinado ou não com 25 µM de arsenito por também 3 h. Western blotting foi realizado conforme descrito anteriormente (Mancini et al., 2021 e Amaral et al., 2016)^{140,141}. Foram utilizados os seguintes anticorpos adquiridos da Cell Signaling: anti-Nrf2 (#12721), anti-SOD2 (#13141), anti-β-actina (#4970).

2.10 Citotoxicidade em células SK-N-BE(2)

Para os ensaios de citotoxicidade com o BmT-2, células SK-N-BE (2) foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 3×10^5 células/poço e incubadas por 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações variando de 0 a 600 µg/mL do peptídeo (BmT-2) diluído em DMEM. O ensaio foi

realizado em triplicata e as placas foram incubadas por 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Após o período de incubação, 10 µL de uma solução de MTT diluída em DMEM (5 mg/mL) foi adicionado a cada poço e as placas foram incubadas novamente por 2 h a 37°C. Subsequentemente, 50 µL de uma solução de 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) foram adicionados a cada poço para dissolver os cristais de formazan produzidos pelas células metabolicamente ativas. A placa foi então lida a 595 nm, usando um Epoch Microplate Spectrofotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA). O ensaio foi realizado em triplicata. Os valores foram expressos em porcentagem do controle e CC₅₀⁶⁶ (**ANEXO VI**).

2.11 Medição intracelular de EROs e ERNs em células SK-N-BE(2)

EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) foram quantificadas com sondas fluorescentes intracelulares em SK-N-BE(2) (*Homo sapiens*, tecido cerebral; neuroblasto, CRL-2271-ATCC) conforme descrito anteriormente Barbosa et al., 2021¹²⁰. As células foram tratadas com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma Aldrich, EUA) para induzir a superprodução de ERO e ERN. A produção intracelular de ERO foi medida usando DCFHDA (Sigma Aldrich, EUA) e ERN foi medida usando DAF-FM (Sigma Aldrich, EUA). A célula (SK-N-BE(2)) foram aderidas à placa por 2 h (1,0 x 10⁵ poços de células) e depois submetidas aos seguintes tratamentos: apenas meio (DMEM); PMA 100 nM; 100 nM de PMA + 50 µM de peptídeo; 100 nM de PMA + 100 µM de peptídeo; peptídeo de 50 µM apenas; ou apenas 100 µM de peptídeo¹⁴¹. A duração do tratamento foi de 60 minutos. Após os respectivos tempos de incubação, as sondas (5 µM DAF-FM e 10 µM DCFHDA) foram adicionadas de acordo com as instruções do fabricante. A produção de ERO e ERN foi avaliada por citometria de fluxo (FACSCalibur; BD Bioscience) com a excitação ajustada em 488 nm. A emissão foi detectada no canal FL-1 (515–545 nm). Dez mil eventos foram registrados para cada amostra e os dados foram analisados usando FlowJo v. 10.7.

2.12 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 8 (2365 Northside, CA, EUA). O valor de CC_{50} utilizou um intervalo de confiança de 95%, apresentado como média \pm desvio padrão (DP), calculado por uma curva de regressão não linear. Os dados de hemólise e estresse oxidativo são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) de três experimentos separados. As comparações estatísticas entre os grupos foram analisadas com ANOVA de uma via. Vários testes pós-hoc de comparação entre os grupos foram realizados pelo teste de Bonferroni. A diferença entre os grupos controle e tratado foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

A herpetofauna desempenha um papel fundamental, seja como presa ou predador, na cadeia alimentar da comunidade global de biodiversidade. O Brasil possui a terceira fauna de répteis mais rica do mundo com 795 espécies documentadas até os dias de hoje, das quais 218 espécies vivem em áreas de restinga e 24% dos répteis identificados se encontram no entorno do Delta do Parnaíba¹⁴². Os répteis têm baixas exigências de fatores ambientais, principalmente umidade, pois sua pele coberta de escamas evita a evapotranspiração.

Esta importante característica fisiológica permite que esses animais alternem entre ambientes úmidos e secos. A região do Delta do Parnaíba, no nordeste do Brasil, é uma área de transição entre a caatinga e a floresta tropical, terminando na área de vegetação costeira, um mosaico de diferentes habitats com temperaturas variando de 22 a 33°C e uma estação seca prevalente¹⁴³. O veneno de *Bothrops moojeni* (**Figura 1A e B**) é uma rica fonte de moléculas de interesse para a saúde, com potencial para se tornarem novos medicamentos^{144,145}.

O veneno coletado do espécime de *B. moojeni* foi fracionado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e as frações resultantes foram analisadas por espectrometria de massa (MS/MS) levando ao isolamento e

identificação de alguns de seus componentes. O cromatograma total resultou na separação de aproximadamente 51 frações com absorvância em 216 e 280 nm (**Figura 1C**). Selecionamos uma região deste cromatograma do veneno bruto original (marcado sob a linha verde na **Figura 1C**) de ~35 min a ~45 min e o fracionamos em recromatografia RP-HPLC, isso resultou em 8 frações distintas, que foram então submetidas à espectrometria de massa.

Um peptídeo, posteriormente denominado BmT-2, foi identificado na fração com tempo de retenção de 23,6 min. O espectro MS/MS deste peptídeo, obtido por espectrometria de massa de ionização por dessorção a laser assistida por Matrix – tempo de voo (MALDI/TOF), permitiu a determinação de sua estrutura primária como FPWL(I)L(I)S-NH₂ (**Figura 1D**). Uma confirmação final dos resíduos isobáricos foi obtida com o método de sequenciamento de degradação de EDMAN.

Com base em sua sequência primária, BmT-2 foi classificado como da família das triptofilinas, que foram primeiramente isoladas da secreção cutânea do anfíbio *Phyllomedusa rohdei*¹⁴⁶. As regiões conservadas nas estruturas primárias das triptofilinas são usadas para classificá-las em três grupos.

A maioria das triptofilinas apresenta um resíduo de triptofano (Trp/W) na posição 2 do C-terminal e um ou 2 resíduos de prolina nas posições 2 e 3 do N-terminal¹⁴⁷. O BmT-2 se enquadra no grupo tipo 2 desta classe de peptídeos, que inclui peptídeos de diferentes tamanhos, baixo peso molecular, compostos por aproximadamente 6 resíduos de aminoácidos, geralmente amidados e com resíduos paralelos de triptofano (Trp) e prolina (Pro) no carboxi terminal. Isso nos permitiu concluir que descobrimos um novo peptídeo pertencente a um grupo de moléculas que foi descrito anteriormente apenas em anfíbios. Em resumo: a nomenclatura se refere a “Bm” nome da espécie da serpente; “T-2”, triptofilina do grupo 2.

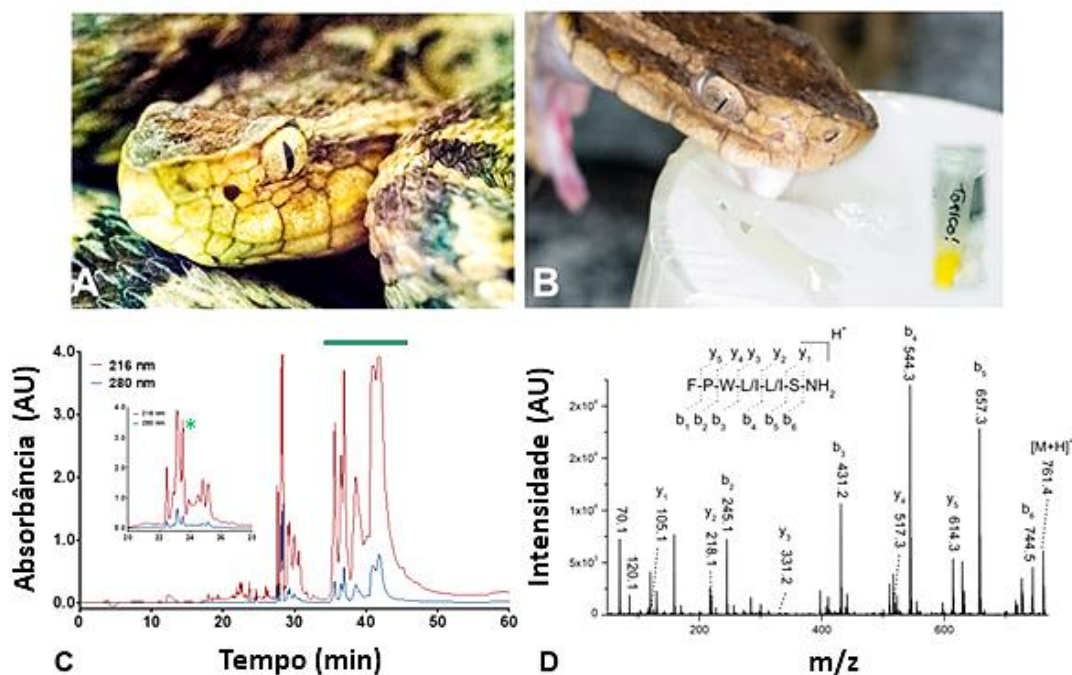


Figura 1. *Bothrops moojeni* (Figura 1, A e B). Perfil cromatográfico do extrato do veneno obtido da serpente *B. moojeni* (C). (D) Espectro de ionização/dessorção obtido por espectrometria de massa assistida por matriz – tempo de voo (MALDI-TOF). (Fotos: Peter Eaton).

Recentemente foi reportado que uma triptofilina secretada por glândulas da pele de *Pithecopus azureus* no momento larval que antecede a mudança para o ambiente terrestre possui atividade antioxidante em ensaios em células em modelos de microglia humana e de camundondos¹²⁰. Desta forma, decidimos testar a atividade antioxidante deste novo peptídeo encontrado em veneno de cobra, BmT-2. Iniciamos medindo sua atividade de eliminação de radicais *in vitro* com ensaios baseados em produtos químicos. A capacidade antioxidante do BmT-2 contra o radical ABTS• foi de 795,94±19,88 µM/g. Resultado semelhante foi observado quando o BmT-2 foi utilizado para proteger a fluorescência dos radicais livres derivados do AAPH, quando apresentou atividade antioxidante de 673,72±5,96 µM/g.

Poucos estudos exploraram a potencial atividade antioxidante das triptofilinas. Um desses estudos investigou a atividade de eliminação de radicais de vários peptídeos de triptofilina L secretados pelas glândulas dorsais da pele de

*Litoria rubella*¹⁴⁸. Dois desses peptídeos, S-P-W-L (OH) e F-P-W-L (NH₂), apresentaram forte atividade antioxidante em relação ao radical ABTS•¹⁴⁸.

A citotoxicidade do BmT-2 foi analisada avaliando sua atividade hemolítica contra hemácias humanas (hemácias; tipo O⁺). Em qualquer concentração testada (de 12,5 a 400 µg/mL), o peptídeo não rompeu as membranas celulares (**Figura 2A**). Em outro conjunto de experimentos com hemácias, avaliamos o efeito protetor do BmT-2 contra a hemólise induzida por AAPH. O peptídeo protegeu eficazmente as hemácias da hemólise quando presente em concentrações de 25 a 400 µg/mL (**Figura 2B**). Vale ressaltar que os resultados mais expressivos foram encontrados para as concentrações de 50 e 100 µg/mL, que demonstraram atividade protetora superior a 75% (**Figura 2B**).

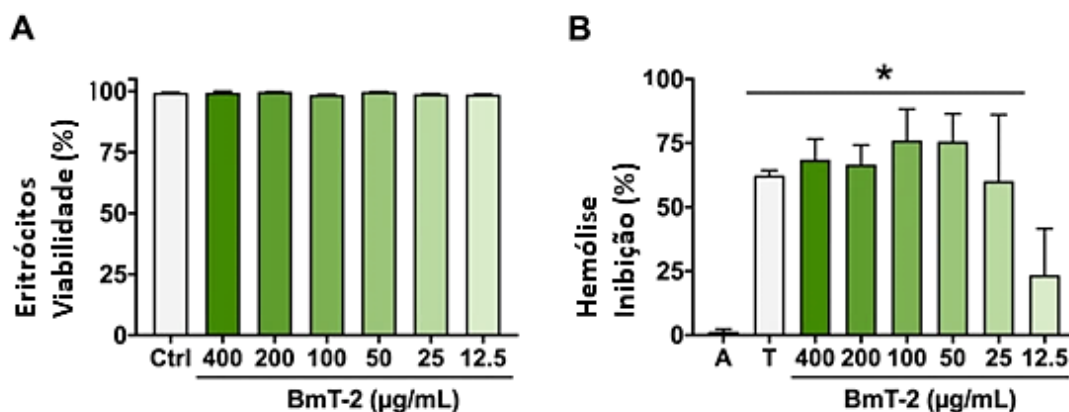


Figura 2. Experimentos com glóbulos vermelhos humanos (RBCs). **(A)** Atividade citotóxica de BmT-2 em hemácias humanas. O grupo controle (Ctrl) continha apenas eritrócitos e DMEM (controle negativo). **(B)** Efeito anti-hemolítico do BmT-2. O asterisco (*) representa diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em comparação com o controle negativo de eritrócitos humanos tratados apenas com AAPH (grupo A). Trolox foi usado como controle positivo (grupo T) Resultados expressos como média±SEM, N=3.

Demais triptofilinas, como AcT-3 (EGKPYWPPPFLPE) e PsT-1 (KPPWVPV) identificadas em secreções de *Phyllomedusinae* ssp., tiveram suas propriedades hemolíticas avaliadas contra eritrócitos de cavalo. Ambos os peptídeos não apresentaram efeito hemolítico em concentrações entre 10 e 160 µM^{149,150}. Embora os eritrócitos utilizados nos estudos citados não sejam de origem

humana, os resultados são semelhantes aos obtidos no presente estudo, pois observamos os melhores níveis de proteção contra hemólise entre as concentrações de 100 a 50 µg/mL do peptídeo.

Além da atividade hemolítica, também avaliamos o potencial citotóxico do BmT-2 contra a linhagem celular SK-N-BE(2) (neuroblastoma humano). O ensaio de viabilidade celular MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) demonstrou que a metade da concentração citotóxica máxima (CC₅₀) de BmT-2 foi de 1.733±15,33 µM. Este resultado indicou que BmT-2 seria citotóxico para células de neuroblastoma SK-N-BE(2) apenas em concentrações milimolares.

Em seguida, ensaios de dano ao DNA foram conduzidos para avaliar o potencial do BmT-2 para proteger o DNA do dano oxidativo *in vitro*. O dano ao DNA em um sistema de reação contendo AAPH foi confirmado por níveis aumentados da banda correspondente ao DNA linear e níveis diminuídos da banda correspondente ao DNA em seu envelhecimento nativo (**Figura 3**). A 4.000 ppm, BmT-2 preveniu significativamente a degradação do DNA induzida por AAPH para sua forma linear (**Figura 3C**). No geral, os resultados dos ensaios de eliminação de radicais *in vitro* convergem para o potencial antioxidante do peptídeo.

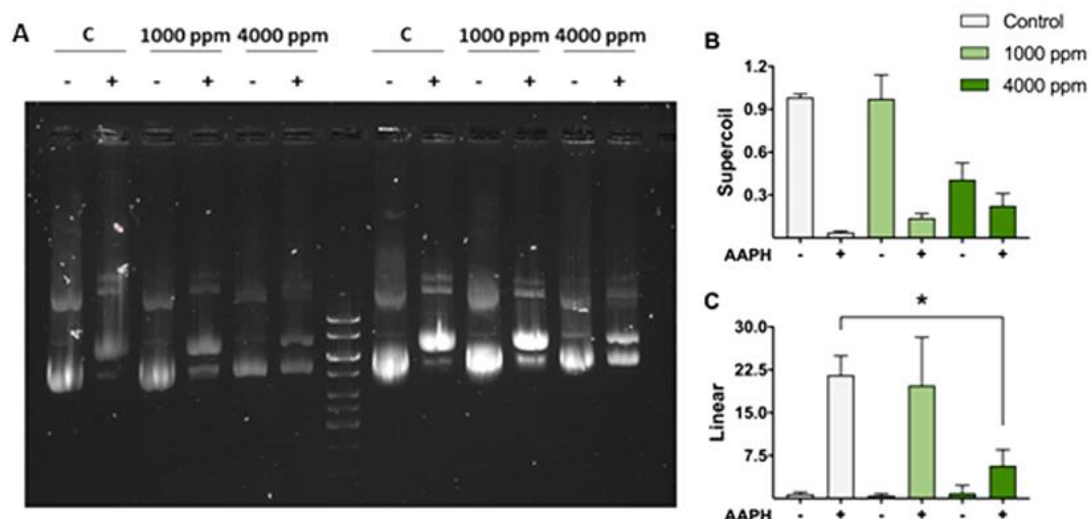


Figura 3. (A) BmT-2 protege o DNA contra danos oxidativos induzidos por AAPH *in vitro*. **(B)** Níveis normalizados de bandas enoveladas de plasmídeo; **(C)** Níveis normalizados de bandas lineares de plasmídeo. Painel mostra duas réplicas técnicas. Os dados foram analisados usando ANOVA de uma via seguida pelo teste

post hoc de Bonferroni. O asterisco (*) denota uma diferença estatisticamente significativa; $p < 0,05$, $N=2$.

Uma importante abordagem para estudar as propriedades antioxidantes de compostos é a determinação de sítios ativos que são capazes de interagir com radicais livres e espécies carregadas. Para tanto, foi realizada uma análise comparativa envolvendo o peptídeo BmT-2 e outros antioxidantes comuns. A **Figura 4** ilustra o IFCA e PEM de BmT-2 (**Figura 4A**) e seu MDA comparativo (**Figura 4B**) em relação aos compostos antioxidantes Trolox, Melatonina, Vitaminas C e E, Glutathiona, GHK, L-carnosina e Salamandrina I.

As estruturas coloridas representam a distribuição dos valores IFCA/PEM na estrutura do BmT-2. As cores vermelha e azul representam, respectivamente, sítios reativos (carregados negativamente) e não reativos (carregados positivamente), enquanto os valores intermediários são definidos de acordo com uma escala RGB¹¹⁹.

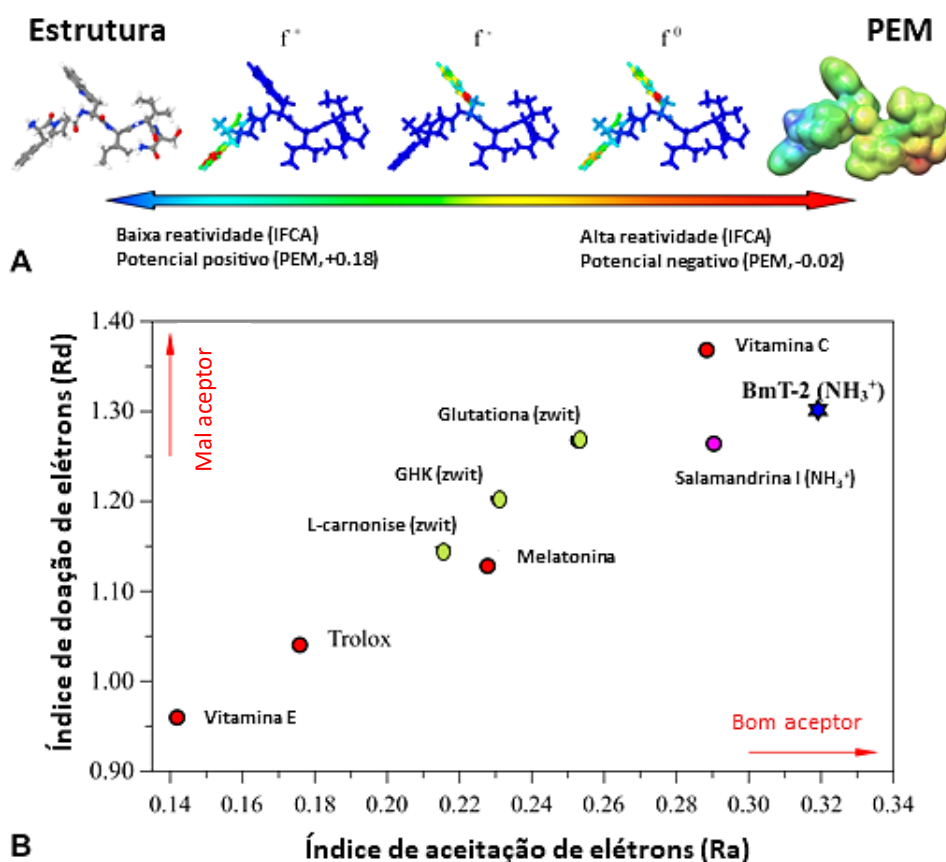


Figura 4. Descritores de reatividade local para BmT-2: **(A)** IFCA em relação a nucleófilos (f^+), eletrófilos (f^-), radicais livres (f^0) e PEM (potencial eletrostático

molecular). **(B)** Mapa doador-aceptor: índices BmT-2 (estrela) em relação a outros antioxidantes (círculos).

Nota-se que BmT-2 apresenta alta reatividade em aminoácidos aromáticos, ou seja, Phe é dominante para reações com agentes nucleofílicos, enquanto Trp domina a reatividade em relação a agentes eletrofílicos. Também foi possível notar a partir de f0 que Phe e Trp possuem reatividades semelhantes em relação aos radicais livres. Em geral, o potencial eletrostático é dominado por sítios terminais. Considerando o mapa doador-aceptor (MDA), o BmT-2 pode ser definido como um bom aceptor de elétrons e um mau doador de elétrons (principalmente em relação ao Trolox e à Vitamina E), sendo muito semelhante à Salamandrina-I e à Vitamina C.

Com o objetivo de avaliar as interações efetivas envolvendo BmT-2, simulações de dinâmica molecular com campo reativo (DMCR) foram realizadas para sequências de BmT-2 na presença de moléculas de água e AAPH. A **Figura 5** ilustra alguns representativos instantâneos obtidos durante tais simulações. Os resultados evidenciam a existência de interações π - π significativas entre os resíduos Phe e Trp de peptídeos adjacentes, que são estáveis ao longo da simulação (ver **Figura 5A**). Além disso, é possível notar uma ação efetiva de Phe e Trp com AAPH degradado (obtido durante a evolução do DMCR), envolvendo interação co-facial e ligações de hidrogênio para Phe-AAPH e Trp-AAPH, respectivamente.

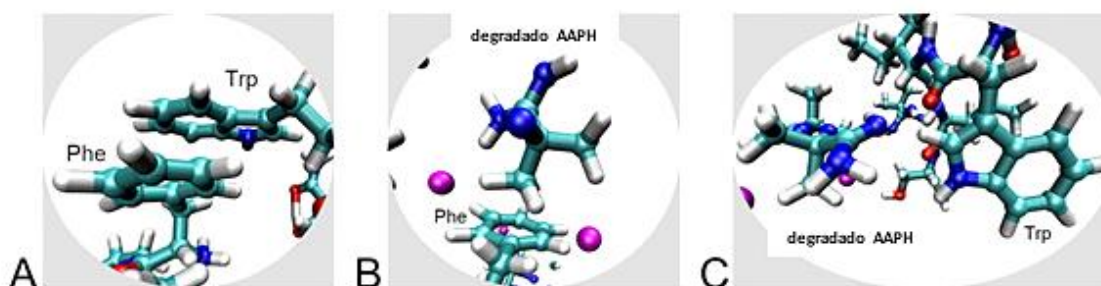


Figura 5. Interações relevantes identificadas por simulações DMCR: **(A)** Empilhamento Phe-Trp π - π ; **(B)** Interação entre Phe e AAPH degradado e **(C)** Interação entre Trp e AAPH degradado.

De acordo com sua definição, IFCA descrevem interações moleculares envolvendo deformação espacial dos orbitais de fronteira (DEOFs), que são conhecidos como processos “*soft-soft*”^{151,128,152}. Por outro lado, efeitos eletrostáticos, conhecidos como interações “*hard-hard*”¹⁵³, são descritos pelos PEMs. Uma vez que ambas as interações significativas apresentadas na **Figura 5** ocorrem em centros reativos identificados pelo IFCA, é possível propor que a atividade biológica de BmT-2 seja governada principalmente por interações “*soft-soft*”, possivelmente envolvendo processos de transferência de carga. Em particular, o bloqueio dos centros ativos de Phe e Trp devido a interações π - π (**Fig. 5A**) o que poderia explicar a atividade reduzida de BmT-2 em soluções muito concentradas (ver **Fig. 2**).

O fator nuclear 2 relacionado ao fator eritróide 2 (Nrf2) é um importante fator de transcrição contra o estresse oxidativo¹⁵⁴. A via KEAP1-NRF2 é a principal resposta protetora contra estresses oxidativos e eletrolíticos. Em condições homeostáticas, KEAP1 faz parte de uma ubiquitina ligase E3 responsável pela estrita regulação da atividade do fator de transcrição NRF2, levando-o à ubiquitinação e degradação dependente de proteassoma¹⁵⁵.

O estresse causado por EROs e/ou ERNs ativa um mecanismo molecular facilitado pelas cisteínas do sensor em KEAP1, permitindo que NRF2 escape da ubiquitinação. O acúmulo de NRF2 na célula possibilita sua translocação para o núcleo, onde prossegue com seu programa de transcrição antioxidante mediado por fatores de pré-transdução^{57,58}.

Para analisar o potencial antioxidante do peptídeo, células Neuro2a foram tratadas com arsenito, um conhecido indutor de EROs¹⁵⁶. Três horas após o tratamento com arsenito, encontramos níveis mais elevados de NRF2 (**Figura 6**), um fator de transcrição que controla a expressão de várias enzimas antioxidantes por ligação ao elemento de resposta antioxidante, confirmando o estresse oxidativo. Após incubação com 100 μ M de BmT-2, o tratamento com arsenito não aumentou os níveis de NRF2, o que indica que o peptídeo foi eficiente em conter o estresse oxidativo gerado pelo composto químico (**Figura 6B**). Em seguida, medimos os níveis de proteína de superóxido dismutase-2 (SOD2), um antioxidante sob controle de NRF2. Um padrão semelhante foi observado na mesma concentração de peptídeo, embora nenhuma significância estatística tenha sido obtida (**Figura 6C**). A SOD-2 é uma enzima antioxidante com função de desintoxicação contra EROs.

Localiza-se na matriz mitocondrial e está envolvido na modulação de diversos processos celulares^{157,158}.

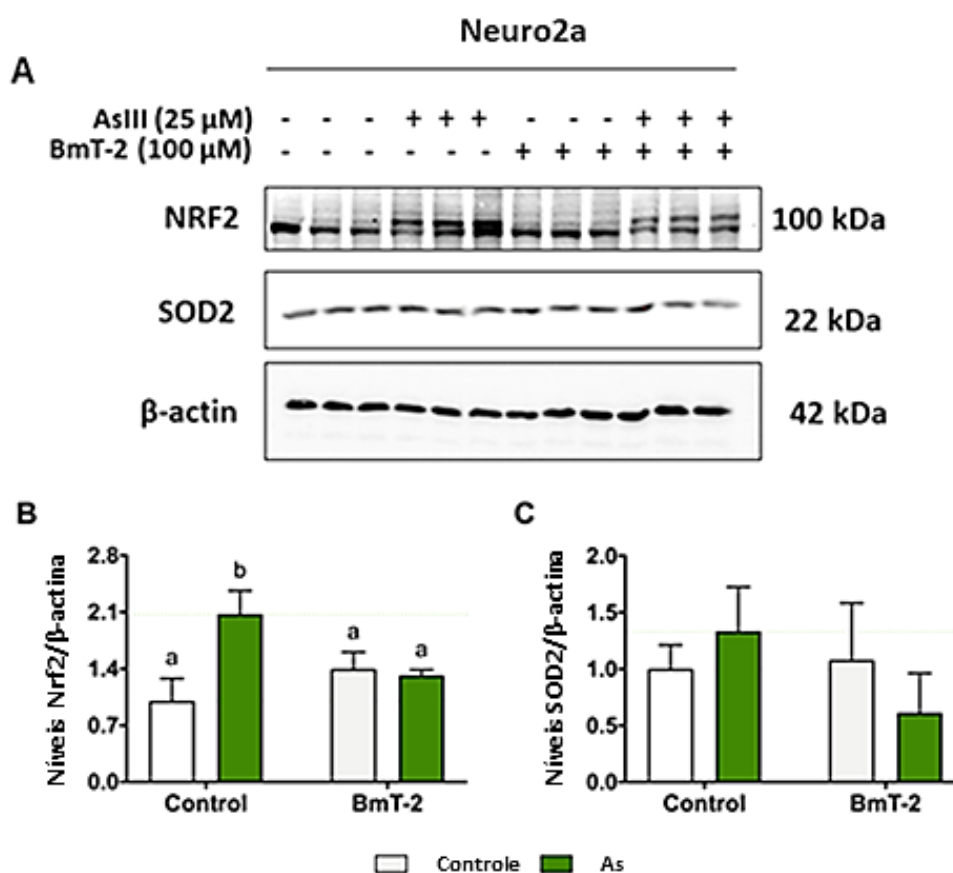


Figura 6. BmT-2 apresenta potencial antioxidante em células Neuro2a. **(A)** Análise de *Western blot* para NRF2, SOD2 e β -actina em extratos celulares totais de células Neuro2a tratadas com arsenito, BmT-2 ou sua combinação; **(B)** Níveis normalizados de NRF2; **(C)** Níveis normalizados de SOD2. Os dados foram analisados com ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Bonferroni. A exibição de letras compactas indica que os grupos que não compartilham letras são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$), $N = 3$.

A produção excessiva ou descontrolada de ERO pode resultar em danos celulares e várias condições patológicas neurodegenerativas. O NRF2, um fator de transcrição relacionado à ativação de genes de proteção celular, é um alvo terapêutico atraente para prevenir doenças neurodegenerativas¹⁵⁹ uma vez que os marcadores de dano celular (proteínas, enzimas e ácidos nucleicos) derivados de

espécies reativas de oxigênio (ERO) têm sido associados a danos cerebrais e diversas doenças, como Alzheimer¹⁶⁰, Parkinson^{161,162}, Huntington¹⁶³ e esclerose lateral amiotrófica¹⁶⁴.

A composição bioquímica neuronal é particularmente suscetível a EROs, pois é envolta por lipídios insaturados, que são instáveis à peroxidação e modificação oxidativa. As duplas ligações desses ácidos graxos insaturados são áreas cruciais para a ação dos radicais livres, potencialmente desencadeando uma cascata que danifica os ácidos graxos insaturados^{165,166}.

Alguns peptídeos derivados de fontes animais possuem propriedades antioxidantes neuroprotetoras relevantes. O peptídeo potencializador de bradicinina-10C (BPP), encontrado no veneno de *B. jararaca*, demonstrou efeito protetor contra a toxicidade induzida por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células SH-SY5Y (CRL-2266) ATCC, na concentração de 0,1 µg/mL¹⁶⁷.

Um grande número de moléculas antioxidantes é secretado pelos anfíbios¹⁶⁸. Por exemplo, Ocellatin-K1 (1-16) e Ocellatin-K1 (1-21), identificados na secreção cutânea de *Leptodactylus vastus*, minimizaram a produção de estresse oxidativo (EROs) induzido por lipopolissacarídeos no hipocampo de camundongos¹⁶⁹.

Por fim, validamos ainda mais a atividade antioxidante de BmT-2 em células de cultura usando citometria de fluxo após a marcação de Sk-N-BE(2) estimuladas com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) com sondas fluorescentes. Descobrimos que BmT-2 demonstrou uma redução significativa nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (**Figura 7**).

As espécies reativas de oxigênio/nitrogênio contribuem para o dano celular neuronal em doenças neurodegenerativas, modulando a função de biomoléculas. O tratamento da linha celular de neuroblastoma humano Sk-N-BE(2) com 50 e 100 µM de BmT-2, reduziu significativamente os níveis de ERO (**Figura 7B**). Para ERN, por sua vez, uma redução significativa foi observada apenas a 100 µM de BmT-2 (**Figura 7C**).

As espécies reativas envolvidas na neurodegeneração incluem peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânion superóxido (O²⁻) e hidroxila altamente reativa (OH•), bem como espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), que podem causar efeitos deletérios à neurônios por doenças exógenas e endógenas²⁰. Moléculas antioxidantes podem interromper ou reduzir as reações em cadeia de oxidação

responsáveis pelo dano celular, geralmente envolvendo processos complexos de desativação de radicais livres, mecanismos de transferência de carga e/ou reações químicas⁵⁹.

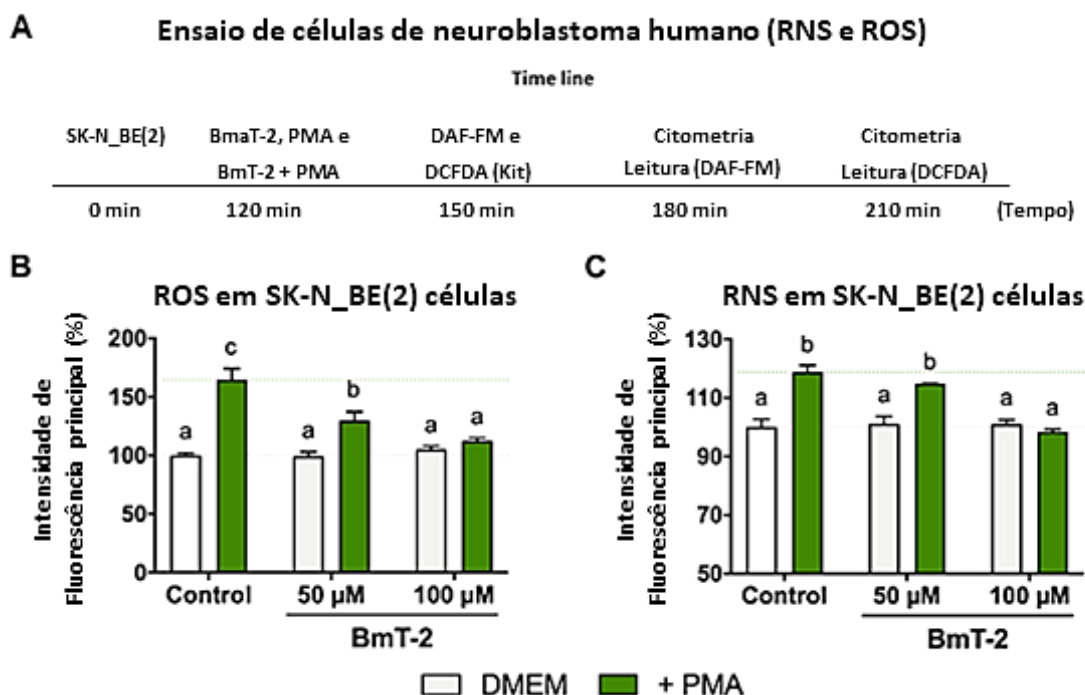


Figura 7. BmT-2 mostrando propriedades antioxidantes e neuroprotetoras. **(A)** Cronograma do ensaio. **(B)** A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e **(C)** espécies reativas de nitrogênio foram induzidas por forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) em células Sk-N-BE(2), que foram tratadas com 50 e 100 µM de BmT-2. Controles: DMEM (controle negativo) e DMEM + PMA (controle positivo). A exibição de letras compactas indica que os grupos que não compartilham letras são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

4. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o peptídeo BmT-2 encontrado no veneno de *B. moojeni* é a primeira triptofilina identificada e totalmente caracterizada em serpentes e possui atividade antioxidante *in vitro* e inibindo o estresse oxidativo em células em cultura do sistema nervoso (neuroblasto). Os ensaios ABTS, ORAC,

danos no DNA e hemólise induzida por AAPH demonstraram que ele possui capacidade de eliminação de radicais. O peptídeo também apresentou baixa toxicidade contra hemácias humanas (RBCs)/O⁺ e células de neuroblastoma.

Estudos *in silico* indicaram a relevância dos resíduos aromáticos do BmT-2 em suas propriedades antioxidantes permitindo uma melhor compreensão do mecanismo referente às suas atividades. Isso como perspectiva permitirá o direcionamento de modificações químicas para aumentar a atividade de um futuro fármaco.

O peptídeo também pode modular a ativação de NRF2 induzida por arsenito em Neuro-2a e mitigar a superprodução de EROs e ERNs, induzida por PMA em células Sk-N-BE(2). Apesar de nossos resultados promissores, ainda são necessários mais estudos para entender os mecanismos de ação subjacentes aos efeitos antioxidantes do BmT-2, especialmente em circunstâncias *in vivo*.

5. AGRADECIMENTOS

A.D. agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de pesquisa e reserva técnica a este projeto. A.B.-N. agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (bolsas 420449/2018-3 e 428211/2018-6) pelo apoio financeiro. Esta pesquisa também contou com recursos fornecidos pelo Núcleo de Computação Científica (NCC/GridUNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

CONCLUSÃO FINAL

Em resumo, o trabalho desenvolvido com os peptídeos sintetizados a partir dos estudos sobre serpentes, demonstrou ser uma ótima fonte de biomoléculas de interesse da saúde que podem ser direcionadas futuramente para o desenvolvimento de fármacos, onde o veneno desses animais, representam misturas complexas de substâncias bioativas como proteínas e peptídeos com as mais diversas funções farmacológicas, bioquímicas e fisiológicas.

No processo de desenvolvimento desse estudo, o trabalho corrobora para potencializadoras moléculas com atividade antibacteriana, antileishmania e antioxidante. Os efeitos citotóxicos apresentados para os peptídeos BatxC, BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1, BatxC(C 2.15Phe) e BmT-2 foram baixos em concentrações micromolares (μM), proporcionando efeitos bactericidas e leishmanicidas (promastigota e amastigota) e efeitos antioxidantes, apontando relevâncias para tratamentos de doenças negligências, bem como, neuroprotetora de interesse a saúde pública.

Os estudos desenvolvidos no primeiro capítulo dessa tese, demonstrou que os peptídeos sintéticos BatxC, BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1, BatxC(C 2.15Phe) tiveram um efeito positivo em membranas de bactérias e *L. amazonensis*. Através dos experimentos realizados e confirmação por Microscopia de Força Atômica (MFA) conseguimos demonstrar que esses peptídeos atuam diretamente na membrana desses microorganismos, devido ao seu potencial catiônico confirmado por ensaios *in silico* realizados para determinar sua conformação estrutural. Outro aspecto importante observado foi o fato da diminuição de amastigotas interiorizadas em macrófagos peritoneais de BALB/c, conseguimos demonstrar que nossos peptídeos sintéticos conseguem reduzir em concentrações micromolares a carga parasitária no interior desses macrófagos. O mecanismo para tal feito ainda necessita ser elucidado, porém os resultados apresentados foram estatisticamente significativos para $p < 0,05$ para os 3 peptídeos testados.

O segundo capítulo, a partir da descrição da primeira triptofilina encontrada no veneno de uma serpente (*B. moojeni*), o peptídeo BmT-2 testado, apresentou através de estudos *in vitro* (ABTS, ORAC e quebra do DNA) potencial antioxidante, para além de conseguir em concentração de 50 e 100 μM reduzir o estresse

oxidativo a partir da diminuição de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) em células SK-N-BE(2) e diminuir a expressão NRF2 e SOD2 em células Neuro2a, demonstrando ser um agente diminuidor de estresse e vias metabólicas. Conseguimos demonstrar através dos ensaios de quebra de DNA, que numa concentração de 4000 ppm do peptídeo, ele protege a quebra na forma linear (desenrolada), com resultados expressos significativamente de $p < 0,05$. Para além disso inferimos seu valor citotóxico, onde concluímos que para obter um efeito tóxico para células, o peptídeo BmT-2 precisaria estar em concentrações milimolares (mM), o que é constatado através dos ensaios com células SK-N-BE(2). Em eritrócitos humanos, para além da confirmação de não toxicidade do peptídeo, demonstramos que o mesmo foi capaz de proteger as células contra a hemólise induzida por PMA, com resultados significativos para $p < 0,05$ entre as concentrações de 25 a 400 $\mu\text{g/mL}$ do peptídeo.

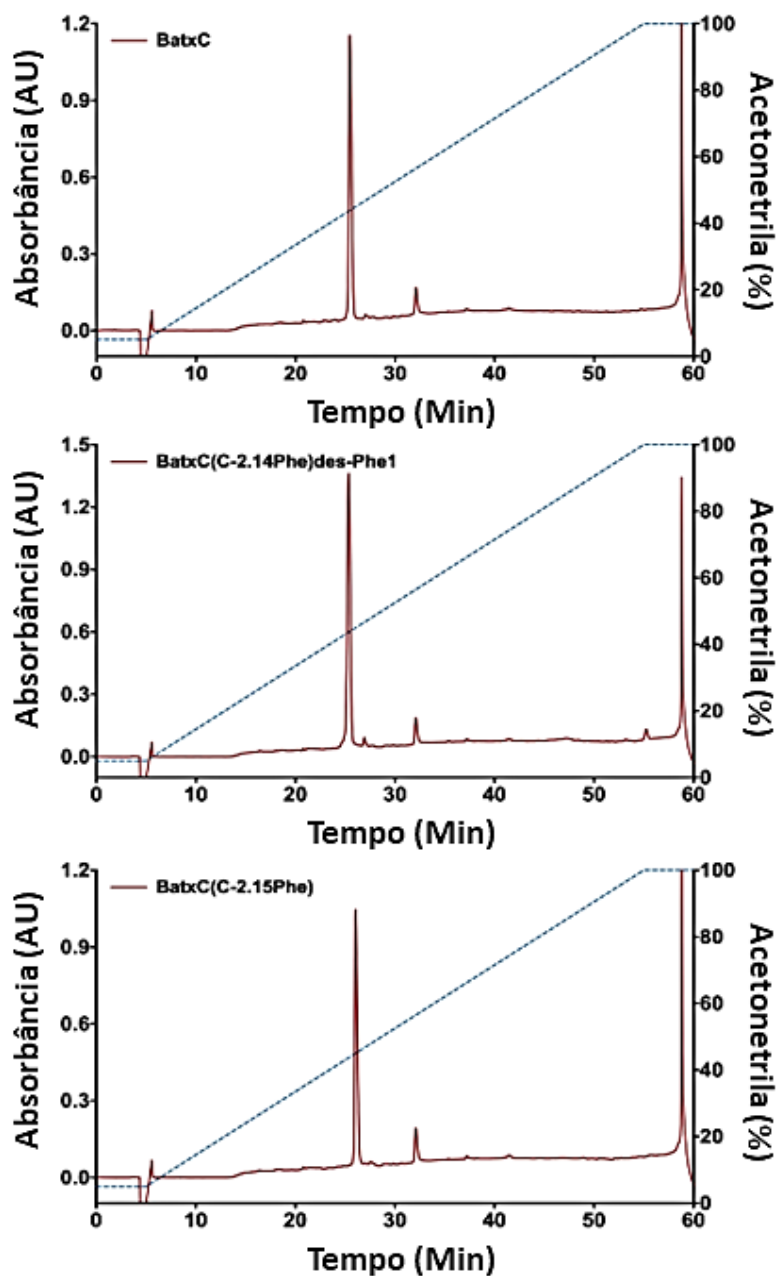
Os efeitos produzidos a partir dos estudos com BmT-2, sugere que através de sua relação eletrostática e seu resíduo aromático estrutural, o peptídeo BmT-2 é um bom doador de elétrons o que quimicamente correlaciona com os possíveis fatores potencializadores dos efeitos antioxidantes produzidos experimentalmente.

A identificação de novas moléculas a partir do veneno de serpentes, demonstrou ser eficaz com os métodos empregados, mesmo assim a análise das estruturas e emprego dessas moléculas, demandam maiores esforços para entendimento dos possíveis mecanismos de ação desses peptídeos. Planejar os passos a seguir, compreende um esforço para uma possível sequência promissora de estudos desses peptídeos, assim sendo, um passo para futuros fármacos de interessa a saúde humana.

ANEXOS

Anexo I

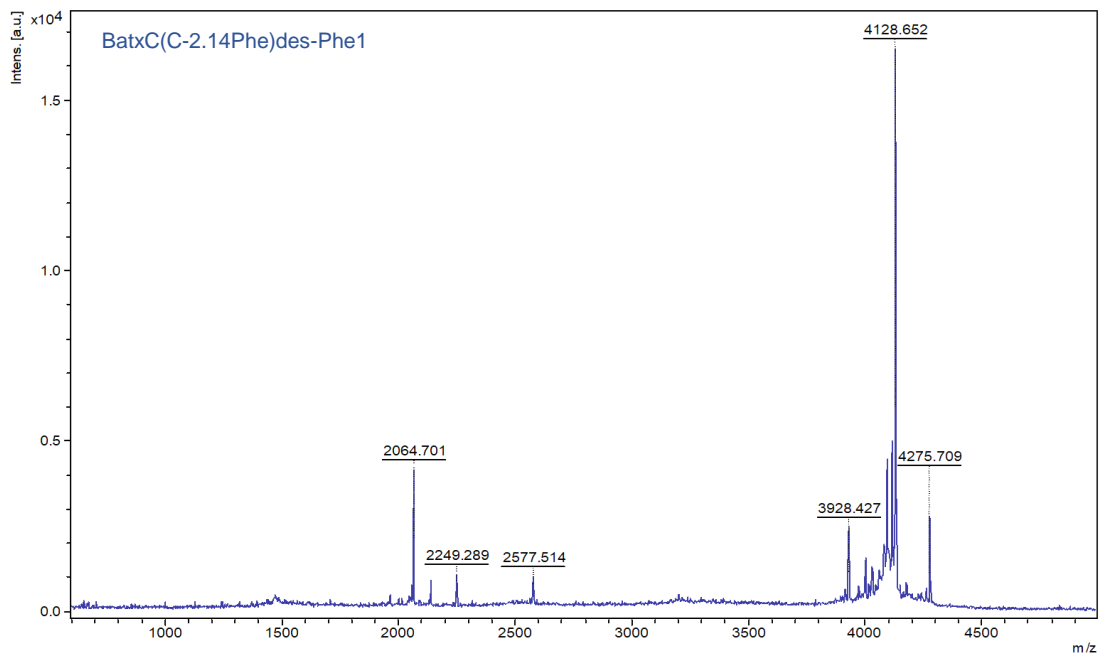
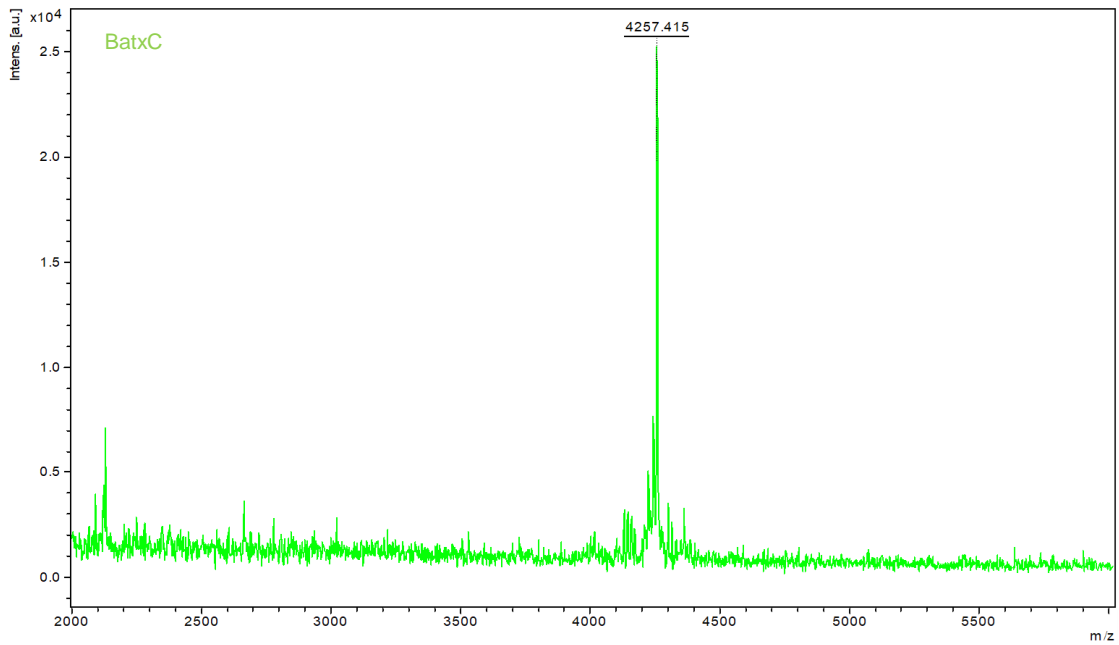
Purificação dos peptídeos sintéticos BatxC, BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 e BatxC(C-2.15Phe)

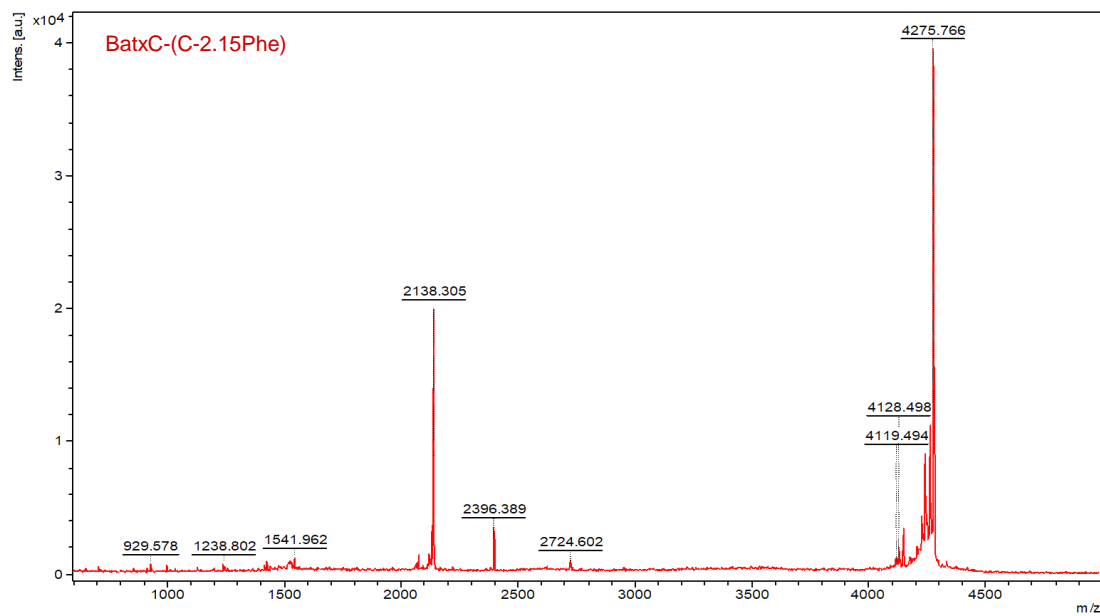


Cromatogramas analíticos na coluna RP-HPLC C18 do BatxC e análogos de peptídeos sintéticos. $\lambda = 216 \text{ nm}$

Anexo II

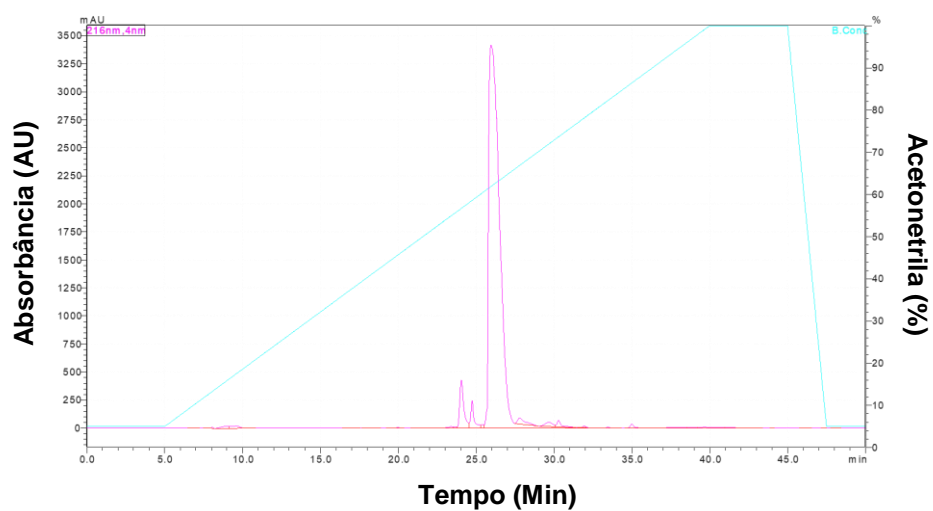
Confirmação por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF) dos peptídeos BatxC, BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 e BatxC-(C-2.15Phe) de acordo com a relação massa/carga





Anexo III

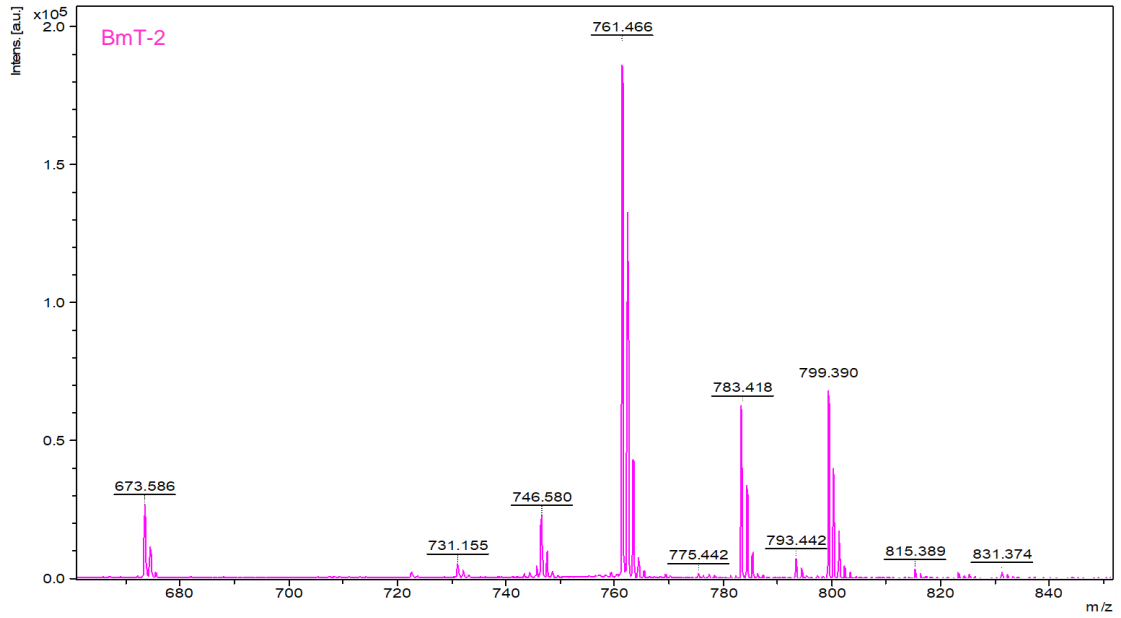
Purificação do peptídeo sintético BmT-2 (triptofilina)



Cromatograma analítico na coluna RP-HPLC C18 do BatxC e análogos de peptídeos sintéticos. $\lambda = 216 \text{ nm}$

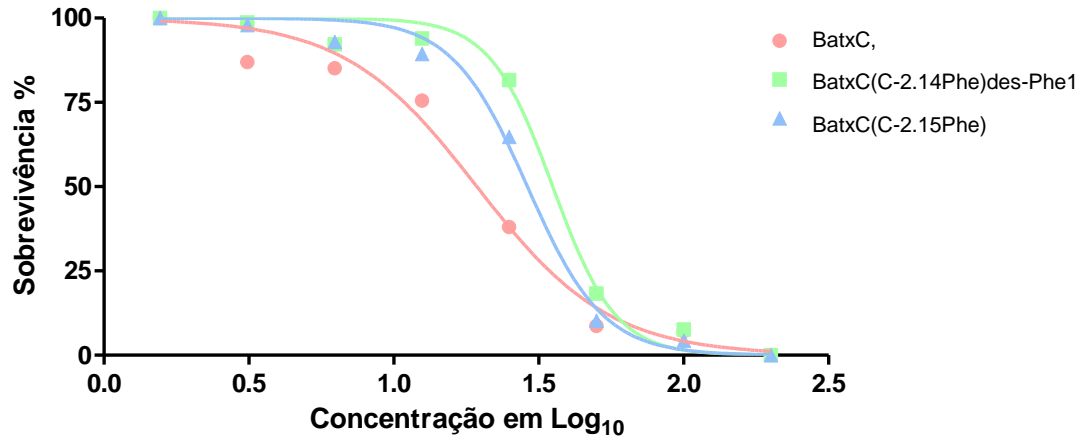
Anexo IV

Confirmação por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF) dos peptídeos BmT-2 de acordo com a relação massa/carga



Anexo V

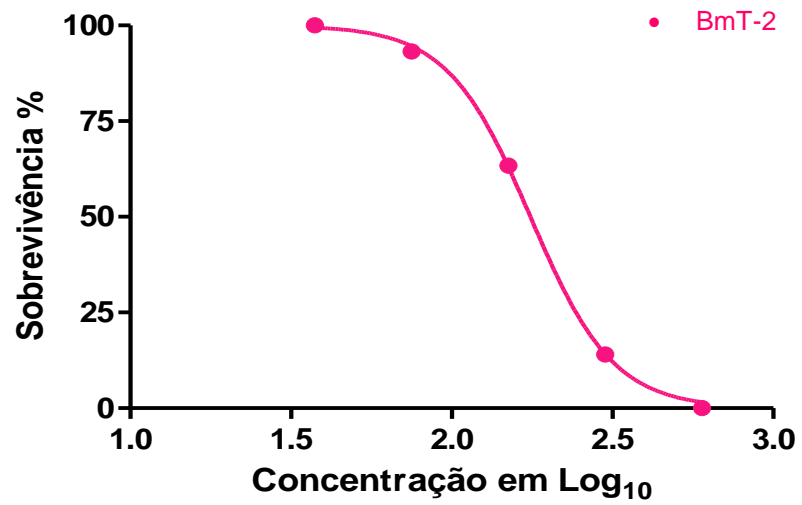
Ensaio de viabilidade celular contra promastigotas de *L. amazonensis* dos peptídeos BatxC, BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1 e BatxC(C-2.15Phe)



Os resultados são expressos como média de absorbância de MTT \pm desvio padrão (SD) de experiências independentes (n=2).

Anexo VI

Ensaio de citotoxicidade para o peptídeo BmT-2 em células SK-N-BE(2)



Os resultados são expressos como média de absorvância de MTT \pm desvio padrão (SD) de experiências independentes (n=3).

Anexo VII

Licença CGEN para acesso patrimônio genético do material biológico estudado.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO
Cadastro de Acesso Nº AE5F104

Tipo de Usuário: **INDEPENDENTE**
Responsável pelo cadastro: **80478352115**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
O acesso foi realizado antes de 17/11/2015 ou obteve autorização de acesso antes de 17/11/2015? **Não, sem solicitação de autorização em tramitação**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**
Estas atividades são baseadas em acesso realizado anteriormente?: **Não**
Este cadastro está vinculado a cadastro anterior de remessa? **Não**

Patrimônio Genético

Título da Atividade: **Prospecção de Peptídeos Bioativos a partir do veneno de Bothrops moojeni da região do Delta do Parnaíba.**
Título da Atividade em inglês: **Prospecting of Bioactive Peptides from Bothrops moojeni venom from the Parnaíba Delta region.**
Resumo da atividade (incluindo objetivos e resultados esperados ou obtidos, conforme o caso) **Purificar e caracterizar peptídeos antimicrobianos com ação antiparasitária a partir do veneno da Bothrops Moojeni coletada na região nordeste do Brasil. Coleta de material biológico e constituição do banco de veneno. Isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos por técnicas de cromatografia de alta eficiência associadas com espectrometria de massa. Sequenciamento dos peptídeos bioativos identificados. Síntese química em fase sólida de peptídeos selecionados. Ensaio biológicos antileishmania in vitro. Ensaio de citotoxicidade in vitro a células de mamíferos. Uso de técnicas avançadas de microscopia como microscopia de força atômica, fluorescência e MEV para estudos de mecanismos de ação.**
Resumo não sigiloso da Atividade em Inglês **The study of Bothrops moojeni venom from the Parnaíba Delta region, in the states of Piauí and Maranhão, may be a viable alternative for the characterization of new antimicrobial peptides. The extraction and isolation of new molecules of health interest and with antiparasitic capacity is of paramount importance for the identification of new drugs, becoming an alternative in the fight against microorganisms pathogenic to human and veterinary health.**
Palavra(s)-chave: **Peptídeos antimicrobianos, Bothrops moojeni, Biotecnologia, antiparasitário.**
Palavra(s)-chave em inglês: **Antimicrobial peptides, Bothrops moojeni, biotechnology, antiparasitic**
Período das Atividades: **01/03/2018** **Ainda não iniciado ou em execução**

Equipe

Nome Completo	Documento	Instituição	Nacionalidade
Jose Roberto de Souza de Almeida L	***.783.521-**	Universidade de Brasília	Brasil
Anderson Dematei	***.612.918-**	Universidade de Brasília	Brasil
Samuel Ribeiro Costa	***.427.311-**	Universidade de Brasília	Brasil
Guilherme Dotto Brand	***.052.091-**	Universidade de Brasília	Brasil
João Bueno Nunes	***.761.518-**	Universidade Brasília	Brasil

Sobre o Componente do Patrimônio Genético Acessado

O acesso ao patrimônio genético será realizado em área indispensável à segurança nacional ou águas jurisdicionais brasileiras, plataforma continental e zona econômica exclusiva:

Não

Tipo de Componente:

Fauna

Nome Científico:

Bothops moojeni

Reino:

Animalia

Filo/Divisão:

Cordata

Classe:

Reptilia

Ordem:

Squamata

Família:

Viperidae

Nome(s) popular(es):

Calçara

Trata-se de variedade tradicional local ou crioula ou raça localmente adaptada ou crioula?

Não**Sobre a Procedência Do Patrimônio Genético**

Procedência da amostra:

In situ

UF:

MA

Município:

Araloses

Latitude:

2° 53" 0.24' S

Longitude:

41° 54" 0.11' W

Bioma:

Catinga

Data da coleta

20/10/2017

Parceria com Instituição Nacional

CNPJ **06.517.387/0001-34** Nome **Universidade Federal do Piauí**
Estado **PI** Município **Parnaíba** CEP **64202-020** Endereço **Av. São Sebastião, nº 2819 - N**
Contato **Anderson Guzzi** Telefone **+5586999822290** Email **guzzi@ufpi.br**

Esta instituição possui acionistas controladores ou sócios **N**
que são pessoas naturais ou jurídicas estrangeiras?

Parceria com Instituição sediada no exterior

Nome **Universidade de Lisboa**
Estado **Lisboa** Município **Lisboa** CEP **1649-028** Endereço **Avenida Professor Egas Moniz**
Contato **Peter Eaton** Telefone **+351 21 799 9411** Email **pete.eaton@gmail.com**

Resultados Obtidos**Outros resultados**

Tipo de Resultado: **Resultados de Pesquisa**

Resumo dos resultados obtidos: **Uma tese de doutorado com foco neste projeto identificou alguns peptídeos no veneno que ainda esta a ser caracterizados.**

Data do Cadastro: **29/04/2018 17:09:13**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisCen em **10:51** de **18/05/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

Anexo VIII

Projeto FAPDF de mobilidade internacional aprovado que permitiu a realização de experimentos no IMM/Lisboa e na Universidade do Porto na Faculdade de Ciências (FCUP).



SECRETARIA DE ESTADO DE ECONOMIA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
FUNDAÇÃO DE APOIO À PESQUISA



7	25614.91.50199.29082018	Aline de Souza Navegantes	8th Academic International Conference on Social Sciences and Humanities	Cambridge/Inglaterra	R\$	10.000,00
8	25507.91.27722.30082018	Aline Gomes da Silva Pinto	II Encontro Conjunto Brasil-Espanha (RSME-SEMA-SBM-SBMAC)	Cádiz/Espanha	R\$	10.000,00
9	25761.91.52678.30082018	Amanda Cristina de Araújo	International Plant & Animal Genome XXVII	San Diego/EUA	R\$	8.940,00
10	25682.91.34103.30082018	Amanda Marina Andrade Medeiros de Carvalho	Eleventh Congress of the European Society for Research in Mathematics Education (CERME11)	Utrecht/Holanda	R\$	10.000,00
11	25318.91.29714.16082018	Ana Carolina Cardoso de Sousa	Conference on Cyber-Physical and Human Systems	Miami/EUA	R\$	7.820,00
12	25552.91.39942.28082018	Ana Clara Vieira da Fonseca	Visita Técnica à Università degli Studi di Perugia	Perugia/Itália	R\$	9.999,90
13	25414.91.32971.30082018	Ana Flávia Belchior de Andrade	AAFS 71st Annual Scientific Meeting	Baltimore/EUA	R\$	10.000,00
14	25531.91.52591.29082018	Anderson de Figueiredo Matias	VII Colóquio internacional sobre literatura brasileira contemporânea: contrabando literários, resistências epistêmicas	Copenhague/Dinamarca	R\$	10.000,00
15	25618.91.51038.30082018	Anderson Dematei	Visita Técnica à Faculdade de Medicina Lisboa	Lisboa/Portugal	R\$	9.825,60
16	25599.91.29217.29082018	Andréa de Souza Lobo	CODESRIA: AFRICA AND THE CRISIS OF GLOBALISATION	Dakar/Senegal	R\$	9.980,00

Anexo IX

Artigo internacional publicado referente ao capítulo 1

Mechanistic Insights into the Leishmanicidal and Bactericidal Activities of Batroxicidin, a Cathelicidin-Related Peptide from a South American Viper (*Bothrops atrox*)

Anderson Dematei, João B. Nunes, Daniel C. Moreira, Jéssica A. Jesus, Márcia D. Laurenti, Ana C. A. Mengarda, Maria Silva Vieira, Constança Pais do Amaral, Marco M. Domingues, Josué de Moraes, Luiz F. D. Passero, Guilherme Brand, Lucinda J. Bessa, Reinhard Wimmer, Selma A. S. Kuckelhaus, Ana M. Tomás, Nuno C. Santos, Alexandra Plácido, Peter Eaton, and José Roberto S. A. Leite*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00153>

Read Online

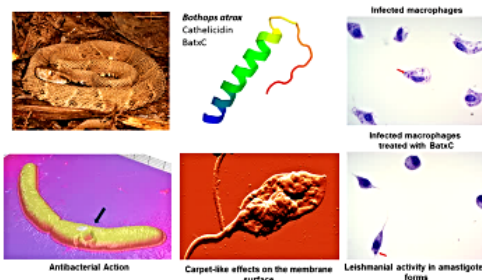
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Snake venoms are important sources of bioactive molecules, including those with antiparasitic activity. Cathelicidins form a class of such molecules, which are produced by a variety of organisms. Batroxicidin (BatxC) is a cathelicidin found in the venom of the common lancehead (*Bothrops atrox*). In the present work, BatxC and two synthetic analogues, BatxC(C-2.15Phe) and BatxC(C-2.14Phe)des-Phe1, were assessed for their microbicidal activity. All three peptides showed a broad-spectrum activity on Gram-positive and -negative bacteria, as well as promastigote and amastigote forms of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. Circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) data indicated that the three peptides changed their structure upon interaction with membranes. Biomimetic membrane model studies demonstrated that the peptides exert a permeabilization effect in prokaryotic membranes, leading to cell morphology distortion, which was confirmed by atomic force microscopy (AFM). The molecules considered in this work exhibited bactericidal and leishmanicidal activity at low concentrations, with the AFM data suggesting membrane pore formation as their mechanism of action. These peptides stand as valuable prototype drugs to be further investigated and eventually used to treat bacterial and protozoal infections.



Anexo X

Artigo internacional submetido referente ao capítulo 2

Submitted to Journal of Natural Products

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Antioxidant and neuroprotective effects of the first tryptophyllin found in snake venom (*Bothrops moojeni*)

Journal:	<i>Journal of Natural Products</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Dematei, Anderson; University of Brasilia Costa, Samuel; University of Brasilia Moreira, Daniel; University of Brasilia, Barbosa, Eder; University of Brasilia Albuquerque, Lucas; University of Brasilia Vasconcelos, Andreanne; University of Brasilia Nascimento, Tiago; Universidade Federal do Delta do Parnaiba, Research Center on Biodiversity and Biotechnology (Biotec) Silva, Pedro; Universidade Federal do Delta do Parnaiba Silva-Carvalho, Amandda ; University of Brasilia Saldanha-Araújo, Felipe ; University of Brasilia Mancini, Mariana; State University of Campinas Ponte, Luiz; State University of Campinas Bezerra, Rosangela; State University of Campinas Simabuco, Fernando; State University of Campinas, Batagin-Neto, Augusto ; UNESP Campus Experimental de Itapeva Brand, Guilherme; Universidade de Brasilia, Chemistry Borges, Tatiana ; University of Brasilia Eaton, Peter; University of Lincoln Leite, José Roberto; University of Brasilia

SCHOLARONE™
Manuscripts

Anexo XI

Artigo internacional publicado como co-autor durante o Doutorado

PROCEEDINGS B

royalsocietypublishing.org/journal/rspb

Research



Cite this article: Barbosa EA *et al.* 2021 The peptide secreted at the water to land transition in a model amphibian has antioxidant effects. *Proc. R. Soc. B* **288**: 20211531. <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1531>

Received: 5 July 2021
Accepted: 18 October 2021

Subject Category:

Biological applications

Subject Areas:

Biochemistry, cellular biology, physiology

Keywords:

Amphibia, antioxidant peptide, MALDI mass spectrometry imaging, oxidative stress, *Pithecopus azureus*, tryptophyllin

Author for correspondence:

Jose Roberto S. A. Leite
e-mails: jrleite@pq.cnpq.br, jrleite@gmail.com

The peptide secreted at the water to land transition in a model amphibian has antioxidant effects

Eder Alves Barbosa^{1,8,†}, Alexandra Plácido^{9,10,†}, Daniel C. Moreira², Lucas Albuquerque³, Anderson Dematei^{2,4}, Amanda É. Silva-Carvalho⁵, Wanessa F. Cabral², Sonia N. Bão⁶, Felipe Saldanha-Araújo⁵, Selma A. S. Kuckelhaus², Tatiana K. Borges³, Camila C. Portugal¹¹, Renato Socodato¹¹, Cátia Teixeira¹⁰, Filipe Camargo D. A. Lima¹², Augusto Batagin-Neto¹³, Antônio Sebben⁷, Peter Eaton^{10,14}, Paula Gomes¹⁰, Guilherme D. Brand¹, Joao B. Relvas¹¹, Massuo J. Kato¹⁵ and Jose Roberto S. A. Leite^{9,2}

¹Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas, Instituto de Química, ²Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA), Faculdade de Medicina, ³Laboratório de Imunologia Celular, NuPMIA, Faculdade de Medicina, ⁴Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Núcleo de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, ⁵Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Ciências da Saúde, ⁶Laboratório de Microscopia e Microanálise, Instituto de Ciências Biológicas, and ⁷Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

⁸Laboratório de Espectrometria de Massa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil

⁹Bioprospectum, Lda, UPTec, Porto, Portugal

¹⁰LAQV/REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, and ¹¹Glial Cell Biology Lab, Instituto de Investigação e Inovação em Saúde and Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Porto, Portugal

¹²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Matão, Brazil

¹³São Paulo State University (Unesp), Campus of Itapeva, Itapeva, Brazil

¹⁴The Bridge, School of Chemistry, Joseph Banks Laboratories, University of Lincoln, Lincoln, UK

¹⁵Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ORCID EAB, 0000-0002-7613-4414; AP, 0000-0003-2706-7777; DCM, 0000-0003-1961-7281; LA, 0000-0001-7164-2850; AD, 0000-0003-4270-3567; AES-C, 0000-0001-6875-4608; WFC, 0000-0002-0765-0546; SNB, 0000-0002-9873-3098; FS-A, 0000-0002-4200-0821; SASK, 0000-0001-7677-772X; TNB, 0000-0002-6813-6276; CCP, 0000-0002-1093-6545; RS, 0000-0002-6882-5020; CT, 0000-0001-9506-3781; FCDAL, 0000-0001-7062-5450; AB-N, 0000-0003-4609-9002; PE, 0000-0003-1821-1992; PG, 0000-0002-6018-4724; GDB, 0000-0002-1615-0009; JBR, 0000-0001-7636-0924; MJR, 0000-0002-3315-2129; JRSAL, 0000-0002-1096-3236

In addition to the morphophysiological changes experienced by amphibians during metamorphosis, they must also deal with a different set of environmental constraints when they shift from the water to the land. We found that *Pithecopus azureus* secretes a single peptide ($[M + H]^+ = 658.38$ Da) at the developmental stage that precedes the onset of terrestrial behaviour. *De novo* peptide and cDNA sequencing revealed that the peptide, named PaT-2, is expressed in tandem and is a member of the tryptophyllins family. *In silico* studies allowed us to identify the position of reactive sites and infer possible antioxidant mechanisms of the compounds. Cell-based assays confirmed the predicted antioxidant activity in mammalian microglia and neuroblast cells. The potential neuroprotective effect of PaT-2 was further corroborated in FRET-based live cell imaging assays, where the peptide prevented lipopoly-saccharide-induced ROS production and glutamate release in human microglia. In summary, PaT-2 is the first peptide expressed during the ontogeny of *P. azureus*, right before the metamorphosing froglet leaves the aquatic environment to occupy terrestrial habitats. The antioxidant activity of PaT-2, predicted by *in silico* analyses and confirmed by cell-based assays,

[†]These authors contributed equally to this study.

Anexo XII

Artigo de Revisão internacional publicado como co-autor durante o Doutorado



Mini-Review

Bioprospection of antimicrobial peptides extracted from amphibians: applicability and pharmacological innovation

Francisca Andreia de Sousa Moraes¹, Ádine Gabriely Teles de Sousa Barros², Carlos Eduardo da Silva Meneses², Francisco Assis dos Santos Moreira², Anderson Dematei^{3,4}, Alexandra Plácido⁴, Jose Roberto S. A. Leite^{3,*}

1. Centro Universitário Uninovafapi, Teresina, PI, Brazil;
 2. Centro Universitário Santo Agostinho, UNIFSA, Teresina, PI, Brazil;
 3. Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada, NuPMIA, Faculdade de Medicina, FM, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil;
 4. Núcleo Medicina Tropical, NMT, Faculdade de Medicina, FM, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Brazil;
 5. LAQV/REQUIMTE, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, FCUP, Universidade do Porto, Porto, Portugal.
- *Correspondence: jrsaleite@gmail.com and jrleite@pq.cnpq.br Tel: +55 61 31071891.

Received: 07 Feb 2019; Accepted: 30 May 2020; Published: 28 June 2020.

Abstract: Background: The antimicrobial peptides (AMPs) are mostly derived from the skin secretion of amphibians, which stand out for presenting a wide range of activities against bacteria, fungi, viruses and protozoa. The present study aimed to catalogue the applicability of bioprospection of antimicrobial peptides extracted from amphibians for the development of new drugs in terms of pharmacological innovation; 2) Methods: this is an integrative review, with descriptive and cross-sectional content. The study was carried out by searching scientific articles, in the following databases: BVS, SciELO, Lilacs, Pubmed and Medline. The articles included in this study approached bioprospecting and pharmacological innovation aspects, pointing out to specific information about peptides found on the skin secretion of amphibians; 3) Results: The first reported study about AMPs from South America enabled the discovery of four new peptides identified from the skin of the Patagonian frog *Pleurodema thaul*, one of these denominated Thaulin-I, and its main antimicrobial activity was observed against *Escherichia coli*. The antiviral activity of the AMPs was observed by the study that demonstrated the action of Dermaseptin 01 (DS-01) against *Dengue virus* type 2, *Herpes simplex virus* type 1 and *Vaccinia virus*; 4) Conclusions: Consequently, it is possible to infer the eminent possibility of bioprospection of antimicrobial peptides extracted from the skin secretions of several species of amphibians and their applicability to research and innovation in health.

Key words: Antimicrobial activity; Amphibians; Bioprospecting; Innovation

APÊNDICE A

Congressos



Encontro Internacional
de Inovação em Saúde
do Distrito Federal

Da Pesquisa Científica à Tecnologias Imersivas

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS QUE:

Anderson Dematei

Participou do **Encontro Internacional de Inovação em Saúde do Distrito Federal**, que ocorreu entre os dias 18 à 20 de Outubro de 2018, na Faculdade de Medicina, FM, *Campus Darcy Ribeiro* da Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, Brasil, perfazendo um total de 30 horas.

Brasília, DF, 20 de Outubro de 2018.

Dr. José Roberto S. A. Leite
Faculdade de Medicina
Presidente da Comissão Científica

Dr. Rodrigo Gurgel
Faculdade de Medicina
Coordenador Geral do Encontro

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This certifies that **ANDERSON DEMATEI** has attended the **1st CIAPep - Ibero-American Congress on Bioactive Peptides**, promoted by Food Science and Quality Center and held in Campinas, Brazil, on December 3rd – 5th, 2019.

Technical Coordination
Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Technical Coordination
Maria Elisa Caetano Silva Abreu

Ital Director General
Eloísa Elena Corrêa Garcia



RECORD Nº CQ-111219-A008


ITAL
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS




CERTIFICADO

Certificamos que **ANDERSON DEMATEI** participou do **II Encontro Internacional de Inovação em Saúde do Distrito Federal - INOVATEC 2020** em Brasília, que ocorreu o período de 06/03/2020 a 08/03/2020, na Faculdade de Ciências da Saúde, *Campus* Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF, organizado pelo Núcleo de Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA) da Faculdade de Medicina da UnB em parceria com *Bioprospectum*, Lda., totalizando a carga horária de 40 hora(s).

Brasília, DF, 08 de março de 2020.



Dr. José Roberto S.A. Leite
 Coordenador Técnico do II INOVATEC
 Sub-Coordenador do NuPMIA



Organização



CERTIFICADO

Certificamos que **Anderson Dematei**, participou com êxito do evento **Parasito 2021** realizado em 04/05/2021 a 06/05/2021, online, contabilizando carga horária total de 27 horas.

O evento foi realizado de forma *on-line* no período de 04 a 06 de maio de 2021.



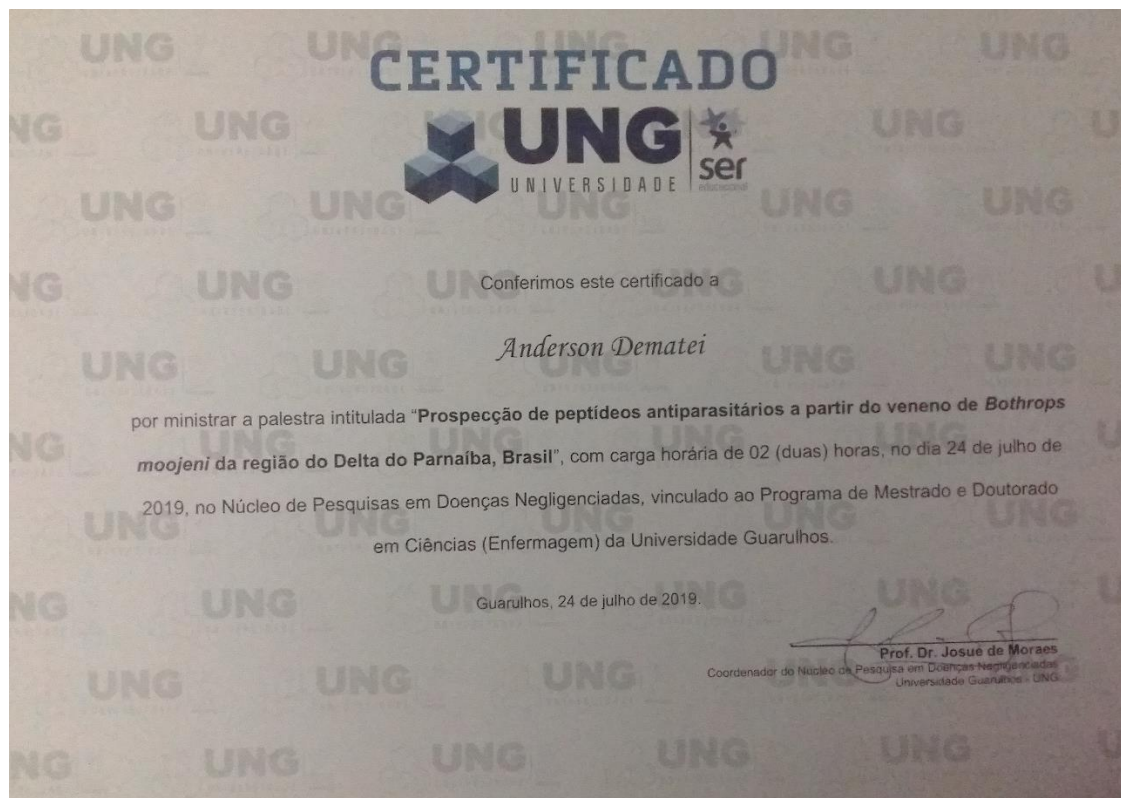
José Mauro Peralta
 Presidentes Parasito-2021



Ricardo Toshio Fujiwara
 Presidentes Parasito-2021



Comunicação Oral






TERCEIRA OFICINA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

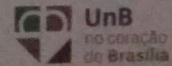
4 e 5 de março de 2020
Núcleo de Medicina Tropical
Universidade de Brasília

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **Avaliação do efeito bactericida e leishmanicida a partir da síntese do peptídeo Batroxidina (BatxC) e análogos.**, de autoria de **Anderson Dematei**, foi apresentado oralmente na Terceira Oficina do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, realizada nos dias 4 e 5 de março de 2020, no Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília.

Brasília, 5 de março de 2020


Rodrigo Gurgel Gonçalves
Coordenador do PPG Medicina Tropical



Synthesis and evaluation of the effect of batroxicidin (BatxC) and analogues on antibacterial and leishmanial activity

Dematei, A.^{1,2}, Nunes, J.B.^{2,3}, Moreira, D.C.², Barbosa, E.A.³, Jesus, J.A.⁴, Mengarda, A.C.A.⁵, Moraes, J.⁵, Passero, L.F.D.⁴, Brand, G.³, Bessa, L.J.⁴, Kuckelhaus, S.^{1,2}, Eaton, P.⁶, Leite, J.R.S.A.^{1,2}

1. Center for Tropical Medicine, NMT, Faculty of Medicine, University of Brasília, UnB, Brasília, DF.
2. Research Center in Morphology and Applied Immunology, NuPMIA, Faculty of Medicine, University of Brasília, UnB, Brasília, DF.
3. Laboratory for the Synthesis and Analysis of Biomolecules (LSAB), Institute of Chemistry, University of Brasília, UnB, Brasília, DF, Brazil.
4. Laboratory of Pathology of Infectious Diseases, Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.
5. Research Center on Neglected Diseases (NPDN), University of Guarulhos, Guarulhos, SP, Brazil.
6. REQUIMTE/LAQV, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences of the University of Porto, Porto, Portugal.

ABSTRACT

In this current study, the Antimicrobial Peptides (AMPs) Batroxicidin (BatxC) and two analogues were synthesized and had their activity tested against: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, and one isolated from *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* multiple drug resistant (MDR). The group evaluated their leishmanicide activity against *Leishmania (L) amazonensis* promastigotes (MHOM/BR/73/M2269), their toxicity in lineage J774 (MØ J774) macrophages and immortalized human keratinocytes (HaCaT). SITO[®] Green was used to evaluate the membrane integrity and Atomic Force Microscopy (AFM) to study the effects on the cell surface. Both the BatxC and its analogues (BatxC (K20→F20) and BatxC (K20→F20) ΔF) were chemically synthesized by solid phase peptide synthesis (SPPS), purified by RP-HPLC and confirmed by MALDI-TOF Spectrometry. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of BatxC to *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus* and MDR *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* were 0,47, 0,94, 7,51, 7,51, 0,94 and 0,94 μM, of BatxC (K20→F20) ΔF were 0,48, 0,97, 7,75, 3,87, 1,94, 0,94 and 0,48 μM, and of BatxC (K20→F20) 0,93, 1,87, 7,48, 3,74, 1,87, 0,93 and 0,93 μM. The IC₅₀ values of BatxC, BatxC (K20 →F20) ΔF e BatxC (K20→F20) against *L. amazonensis* promastigotes were 4,90, 8,86 e 6,73 μM, the cytotoxicity to MØ J774, 1,60, 3,51 e 2,14 μM, and to HaCaT 21,74, 34,07 e 29,40 μM. To determination of the *L. amazonensis* membrane integrity, the porosity growth was analyzed with the EC₅₀ and 2xEC₅₀ values compared to the controls. Through AFM was possible to observe the pores within the MIC for *E. coli* and IC₅₀ for the leishmanicide activity. The peptides studied in this work showed potential anti-bacteria and anti-leishmania activities and the AFM images suggests that its activities occur through pore formation on the pathogen membrane. Acknowledgments: FAPDF (Grant number 00193.00001937 / 2018-83). A.D. Thank CNPq for the PhD scholarship.

Keyword: Antimicrobial peptides, Cell cytotoxicity, Snake, Anti-leishmania activity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thapa, P., Zhang, R. Y., Menon, V. & Bingham, J. P. Native chemical ligation: A boon to peptide chemistry. *Molecules* **19**, 14461–14483 (2014).
2. T. Ramesha, B. *et al.* Biodiversity and Chemodiversity: Future Perspectives in Bioprospecting. *Curr. Drug Targets* **12**, 1515–1530 (2011).
3. Lubell, W. D. Synthesis, L Fmoc Solid-phase, D Direct Fmoc-chemistry-based Ligation, A Native Chemical Synthesis, Organic letters 2012. *Synthesis (Stuttg)*. **14**, 3912–3916 (2012).
4. Mailig, M. & Liu, F. The Application of Isoacyl Structural Motifs in Prodrug Design and Peptide Chemistry. *ChemBioChem* **20**, 2017–2031 (2019).
5. L., A. & Gericke, N. Bioprospecting: Creating a Value for Biodiversity. *Res. Biodivers. - Model. Appl.* (2011) doi:10.5772/24905.
6. Weiss, C. & Eisner, T. Partnerships for value-added through bioprospecting. *Technol. Soc.* **20**, 481–498 (1998).
7. States, T. U. National Strategy for Combating Antibiotic-resistant bacteria. 37 (2014).
8. Prates, M V. Bloch, C. Peptídeos Antimicrobianos: Uma alternativa no combate a microrganismos resistentes. in *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 17(3), 30–36. (2000).
9. Shagaghi, N., Palombo, E. A., Clayton, A. H. A. & Bhave, M. Antimicrobial peptides: biochemical determinants of activity and biophysical techniques of elucidating their functionality. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 62 (2018).
10. Zhang, L. J. & Gallo, R. L. Antimicrobial peptides. *Curr. Biol.* **26**, R14–R19 (2016).
11. Abbassi, F. *et al.* Antibacterial and leishmanicidal activities of temporin-SHd, a 17-residue long membrane-damaging peptide. *Biochimie* **95**, 388–399 (2013).
12. Brand, G. D. *et al.* The skin secretion of the amphibian phyllomedusa

- nordestina: A source of antimicrobial and antiprotozoal peptides. *Molecules* **18**, 7058–7070 (2013).
13. Pinto, E. G., Pimenta, D. C., Antoniazzi, M. M., Jared, C. & Tempone, A. G. Antimicrobial peptides isolated from *Phyllomedusa nordestina* (Amphibia) alter the permeability of plasma membrane of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* **135**, 655–660 (2013).
 14. Oliveira, M. *et al.* Ocellatin-PT antimicrobial peptides: High-resolution microscopy studies in antileishmania models and interactions with mimetic membrane systems. *Biopolymers* 873–886 (2016) doi:10.1002/bip.22925.
 15. Leite, J. R. S. A. *et al.* Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides* **26**, 565–573 (2005).
 16. Allane, D., Oussedik-Oumehdi, H., Harrat, Z., Seve, M. & Laraba-Djebari, F. Isolation and characterization of an anti-leishmanial disintegrin from *Cerastes cerastes* venom. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **32**, 1–11 (2018).
 17. Mello, C. P. *et al.* Evaluation of the antichagasic activity of batroxicidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland. *Toxicon* **130**, 56–62 (2017).
 18. Barbosa, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* **23**, 629–643 (2010).
 19. Chen, Z. & Zhong, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* **30**, 271–281 (2014).
 20. Bento-Pereira, C. & Dinkova-Kostova, A. T. Activation of transcription factor Nrf2 to counteract mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Med. Res. Rev.* **41**, 785–802 (2021).
 21. Singh, A., Kukreti, R., Saso, L. & Kukreti, S. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules* **24**, 1–20 (2019).
 22. Brazaca, L. C., Sampaio, I., Zucolotto, V. & Janegitz, B. C. Applications of biosensors in Alzheimer's disease diagnosis. *Talanta* **210**, 120644 (2020).

23. Dorsey, E. R., Sherer, T., Okun, M. S. & Bloem, B. R. The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *J. Parkinsons. Dis.* **8**, S3–S8 (2018).
24. Melo, A. *et al.* Oxidative stress in neurodegenerative diseases: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2011**, (2011).
25. Park, H. G. *et al.* Honeybee (*Apis cerana*) vitellogenin acts as an antimicrobial and antioxidant agent in the body and venom. *Dev. Comp. Immunol.* **85**, 51–60 (2018).
26. Demori, I. *et al.* Peptides for skin protection and healing in amphibians. *Molecules* **24**, (2019).
27. Zhang, X. *et al.* A novel amphibian-derived peptide alleviated ultraviolet B-induced photodamage in mice. *Biomed. Pharmacother.* **136**, 111258 (2021).
28. Monteiro, D. A. *et al.* Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like cys-rich protein isolated from the venom of the snake *Rhinocerophis alternatus*, stimulates angiogenesis and antioxidant defenses in the liver of freshwater fish, *Hoplias malabaricus*. *Toxins (Basel)*. **9**, 1–13 (2017).
29. Nunes, S. de F., Kaefer, I. L., Leite, P. T. & Cechin, S. Z. Reproductive and feeding biology of the pitviper *Rhinocerophis alternatus* from subtropical Brazil. *Herpetol. J.* **20**, 31–39 (2010).
30. Querobino, S. M., Carrettiero, D. C., Costa, M. S. & Alberto-Silva, C. Neuroprotective property of low molecular weight fraction from *B. jararaca* snake venom in H₂O₂-induced cytotoxicity in cultured hippocampal cells. *Toxicon* **129**, 134–143 (2017).
31. Linhares, C. & Lima, S. Transformações na Rota Turística do Delta do Parnaíba (PI / MA): percurso histórico Transformations in the Tourist Route of the Delta do Parnaíba (PI / MA , Brazil): historical route. 689–707 (2021).
32. MATTOS, F. F. (Graduanda em P. na U. & IRVING, M. A. (Professora do P. E.-U.). Delta do Parnaíba nos rumos do ecoturismo : um olhar a partir da comunidade local. *Cad. Virtual Tur.* **3**, 13 (2003).
33. Radek, K. & Gallo, R. Antimicrobial peptides: Natural effectors of the innate immune system. *Semin. Immunopathol.* **29**, 27–43 (2007).

34. Bahar, A. A. & Ren, D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* **6**, 1543–1575 (2013).
35. Zasloff, M. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **4**, 3–7 (1992).
36. Rahnamaeian, M. Antimicrobial peptides: Modes of mechanism, modulation of defense responses. *Plant Signal. Behav.* **6**, 1325–1332 (2011).
37. Zhao, X., Wu, H., Lu, H., Li, G. & Huang, Q. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. *PLoS One* **8**, 6–11 (2013).
38. Azim, S. *et al.* Venom peptides cathelicidin and lycotoxin cause strong inhibition of *Escherichia coli* ATP synthase. *Int. J. Biol. Macromol.* **87**, 246–251 (2016).
39. Franco, A. R. *et al.* Antimicrobial coating of spider silk to prevent bacterial attachment on silk surgical sutures. *Acta Biomater.* **99**, 236–246 (2019).
40. Who Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics. **38**, 444–445 (2017).
41. Dürr, U. H. N., Sudheendra, U. S. & Ramamoorthy, A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1758**, 1408–1425 (2006).
42. Mello, C. P. *et al.* Evaluation of the antichagasic activity of batroxicidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland. *Toxicon* **130**, 56–62 (2017).
43. Meurer, M. *et al.* Comparing Cathelicidin Susceptibility of the Meningitis Pathogens *Streptococcus suis* and *Escherichia coli* in Culture Medium in Contrast to Porcine or Human Cerebrospinal Fluid. *Front. Microbiol.* **10**, 1–10 (2020).
44. Epand, R. M. Host defense peptides and their potential as therapeutic agents. *Host Def. Pept. Their Potential as Ther. Agents* 1–321 (2016) doi:10.1007/978-3-319-32949-9.
45. Juba, M. L. *et al.* Helical cationic antimicrobial peptide length and its impact

- on membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1848**, 1081–1091 (2015).
46. Barksdale, S. M., Hrifko, E. J. & van Hoek, M. L. Cathelicidin antimicrobial peptide from Alligator mississippiensis has antibacterial activity against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Dev. Comp. Immunol.* **70**, 135–144 (2017).
 47. Marani, M. M. *et al.* 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 (2017).
 48. Souza, B. B. P. *et al.* Identification and characterization of phospholipases A2 from the skin secretion of *Pithecopus azureus* anuran. *Toxicon* **167**, 10–19 (2019).
 49. Kao, C. *et al.* Cathelicidin antimicrobial peptides with reduced activation of toll-like receptor signaling have potent bactericidal activity against colistin-resistant bacteria. *MBio* **7**, 1–10 (2016).
 50. Currie, S. M. *et al.* Cathelicidins Have Direct Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus In Vitro and Protective Function In Vivo in Mice and Humans. *J. Immunol.* **196**, 2699–2710 (2016).
 51. Arenas, R., Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R. & Ruiz-Esmenjaud, J. Leishmaniasis: A review. *F1000Research* **6**, 1–15 (2017).
 52. Oliveira, L. F. *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* **118**, 87–96 (2011).
 53. Asadi, A., Tavakoli Kareshk, A., Sharifi, I. & Firouzeh, N. Murine cathelicidin: as a host defensive response against *Leishmania major* infection. *J. Parasit. Dis.* **44**, 633–638 (2020).
 54. Das, S. *et al.* Cathelicidin augments VDR-dependent anti-leishmanial immune response in Indian Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *Int. Immunopharmacol.* **50**, 130–138 (2017).
 55. Crauwels, P. *et al.* Cathelicidin Contributes to the Restriction of *Leishmania* in Human Host Macrophages. *Front. Immunol.* **10**, 1–12 (2019).

56. Mariano, G. H. *et al.* Characterization of novel human intragenic antimicrobial peptides, incorporation and release studies from ureasil-polyether hybrid matrix. *Mater. Sci. Eng. C* **119**, 111581 (2021).
57. Union, I. U. of P. and A. C. International Union of Pure Joint Commission on Biochemical Nomenclature * Nomenclature and Symbolism for. *Pure Appl. Chem.* **56**, 595–624 (1984).
58. Eisenberg, D., Weiss, R. M. & Terwilliger, T. C. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 140–144 (1984).
59. Shen, Y., Maupetit, J., Derreumaux, P. & Tufféry, P. Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction. *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 4745–4758 (2014).
60. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
61. Wayne, P. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard — Ninth edition. CLSI document M07-A9. *Clin. Lab. Stand. Inst.* (2012).
62. Cheng, H. T. & London, E. Preparation and properties of asymmetric large unilamellar vesicles: Interleaflet coupling in asymmetric vesicles is dependent on temperature but not curvature. *Biophys. J.* **100**, 2671–2678 (2011).
63. Hwang, T. L. & Shaka, A. J. Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *Journal of Magnetic Resonance - Series A* vol. 112 275–279 (1995).
64. Amorim, C. R. *et al.* Schiff bases of 4-Phenyl-2-Aminothiazoles as hits to new antischistosomes: Synthesis, in vitro, in vivo and in silico studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **150**, 105371 (2020).
65. de Brito, M. R. M. *et al.* Cyclohexene-fused 1,3-oxazines with selective antibacterial and antiparasitic action and low cytotoxic effects. *Toxicol. Vitro.* **44**, 273–279 (2017).
66. De Moraes, J., Dario, B. S., Couto, R. A. A., Pinto, P. L. S. & Da Costa

- Ferreira, A. M. Antischistosomal activity of oxindolimine-metal complexes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 6648–6652 (2015).
67. Lago, E. M. *et al.* Phenotypic screening of nonsteroidal anti-inflammatory drugs identified mefenamic acid as a drug for the treatment of schistosomiasis. *EBioMedicine* **43**, 370–379 (2019).
68. Falcao, C. B. *et al.* Viperacidins: A novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. *Amino Acids* **46**, 2561–2571 (2014).
69. Pérez-Peinado, C. *et al.* Mechanisms of bacterial membrane permeabilization by crotalicidin (Ctn) and its fragment Ctn(15–34), antimicrobial peptides from rattlesnake venom. *J. Biol. Chem.* **293**, 1536–1549 (2018).
70. Oliveira-Júnior, N. G., Freire, M. S., Almeida, J. A., Rezende, T. M. B. & Franco, O. L. Antimicrobial and proinflammatory effects of two viperacidins. *Cytokine* **111**, 309–316 (2018).
71. Eaton, P. *et al.* Atomic Force Microscopy for the Characterisation of the Effects and Treatment of Infectious Parasites. *Microsc. Microanal.* **19**, 3–4 (2013).
72. Badosa, E. *et al.* Derivatives of the antimicrobial peptide BP100 for expression in plant systems. *PLoS One* **8**, 1–12 (2013).
73. Longo, P. F., Azevedo, R. B., Delerue-matos, C. & Leite, J. R. S. A. Characterization and Biological Activities of Ocellatin Peptides from the Skin Secretion of the Frog *Leptodactylus pustulatus*. (2014) doi:10.1021/np500907t.
74. Strzałkowska, N. & Jo, A. Cathelicidins : family of antimicrobial peptides . A review. 10957–10970 (2012) doi:10.1007/s11033-012-1997-x.
75. Toyama, M. H. *et al.* Isolation of a new L -amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **47**, 47–57 (2006).
76. Tempone, A. G. *et al.* Bothrops moojeni venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 620–624 (2001).

77. Passero, L. F. D., Tomokane, T. Y., Corbett, C. E. P., Laurenti, M. D. & Toyama, M. H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. *Parasitol. Res.* **101**, 1365–1371 (2007).
78. Nunes, D. C. O. *et al.* BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology* **140**, 844–854 (2013).
79. Mendes, B. *et al.* Potential use of 13-mer peptides based on phospholipase and oligoarginine as leishmanicidal agents. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* **226**, 108612 (2019).
80. Brito, J. R. *et al.* Antileishmanial activity and ultrastructural changes of related tetrahydrofuran dineolignans isolated from *Saururus cernuus* L. (Saururaceae). *J. Pharm. Pharmacol.* **71**, 1871–1878 (2019).
81. Lynn, M. A. *et al.* Effect of BMAP-28 antimicrobial peptides on *Leishmania major* promastigote and amastigote growth: Role of leishmanolysin in parasite survival. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, (2011).
82. Coorens, M., van Dijk, A., Bikker, F., Veldhuizen, E. J. A. & Haagsman, H. P. Importance of Endosomal Cathelicidin Degradation To Enhance DNA-Induced Chicken Macrophage Activation. *J. Immunol.* **195**, 3970–3977 (2015).
83. Mu, L. *et al.* The first identified cathelicidin from tree frogs possesses anti-inflammatory and partial LPS neutralization activities. *Amino Acids* **49**, 1571–1585 (2017).
84. Coorens, M., Scheenstra, M. R., Veldhuizen, E. J. A. & Haagsman, H. P. Interspecies cathelicidin comparison reveals divergence in antimicrobial activity, TLR modulation, chemokine induction and regulation of phagocytosis. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
85. Kückelhaus, S. A. S. *et al.* Phylloseptin-1 is leishmanicidal for amastigotes of *leishmania amazonensis* inside infected macrophages. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**, 1–14 (2020).

86. De Barros, E. *et al.* Snake venom cathelicidins as natural antimicrobial peptides. *Front. Pharmacol.* **10**, 1–13 (2019).
87. Amos, S. B. T. A. *et al.* Antimicrobial Peptide Potency is Facilitated by Greater Conformational Flexibility when Binding to Gram-negative Bacterial Inner Membranes. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
88. Cardoso, M. H. *et al.* Comparative NanoUPLC-MSE analysis between magainin I-susceptible and -resistant *Escherichia coli* strains. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
89. Mcgwire, B. S. & Kulkarni, M. M. Experimental Parasitology Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Exp. Parasitol.* **126**, 397–405 (2010).
90. Teixeira, V., Feio, M. J. & Bastos, M. Progress in Lipid Research Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.* **51**, 149–177 (2012).
91. Alfonso, J. J. *et al.* Isolation, Biochemical Characterization and Antiparasitic Activity of BmatTX-IV, A Basic Lys49-Phospholipase A2 from the Venom of *Bothrops mattogrossensis* from Paraguay. *Curr. Top. Med. Chem.* (2019) doi:10.2174/1568026619666190723154756.
92. Grabner, A. N. *et al.* BmajPLA2-II, a basic Lys49-phospholipase A2 homologue from *Bothrops marajoensis* snake venom with parasitocidal potential. *Int. J. Biol. Macromol.* **102**, 571–581 (2017).
93. De Menezes, R. R. P. P. B. *et al.* Involvement of nitric oxide on bothropoides insularis venom biological effects on murine macrophages in vitro. *PLoS One* **11**, 1–15 (2016).
94. Kebir-Chelghoum, H. & Laraba-Djebari, F. Cytotoxicity of *Cerastes cerastes* snake venom: Involvement of imbalanced redox status. *Acta Trop.* **173**, 116–124 (2017).
95. De Sousa, F. C. M. *et al.* *Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923) venom induces apoptosis on renal tubular epithelial cells. *Toxicon* **118**, 82–85 (2016).
96. Bustillo, S., Van de Velde, A. C., Matzner Perfumo, V., Gay, C. C. & Leiva, L.

- C. Apoptosis induced by a snake venom metalloproteinase from *Bothrops alternatus* venom in C2C12 muscle cells. *Apoptosis* **22**, 491–501 (2017).
97. Costal-Oliveira, F. *et al.* L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. *Sci. Rep.* **9**, 1–14 (2019).
98. Roll, U. *et al.* The global distribution of tetrapods reveals a need for targeted reptile conservation. *Nat. Ecol. Evol.* **1**, 1677–1682 (2017).
99. Bronikowski, A. M. The evolution of aging phenotypes in snakes: A review and synthesis with new data. *Age (Omaha)*. **30**, 169–176 (2008).
100. Jaffredo, T., Fellah, J. S. & Dunon, D. Immunology of Birds and Reptiles. *Encycl. Life Sci.* (2006) doi:10.1038/npg.els.0000521.
101. Zimmerman, L. M., Vogel, L. A. & Bowden, R. M. Commentary: Understanding the vertebrate immune system: Insights from the reptilian perspective. *J. Exp. Biol.* **213**, 661–671 (2010).
102. van Harten, R. M., van Woudenberg, E., van Dijk, A. & Haagsman, H. P. Cathelicidins: Immunomodulatory antimicrobials. *Vaccines* **6**, (2018).
103. Agier, J., Efenberger, M. & Brzezińska-Błaszczuk, E. Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Cent. Eur. J. Immunol.* **40**, 225–235 (2015).
104. van Hoek, M. L. Antimicrobial peptides in reptiles. *Pharmaceuticals* **7**, 723–753 (2014).
105. Dematei, A. *et al.* Mechanistic Insights into the Leishmanicidal and Bactericidal Activities of Batroxicidin, a Cathelicidin-Related Peptide from a South American Viper (*Bothrops atrox*). *J. Nat. Prod.* **84**, 1787–1798 (2021).
106. Warrell, D. A. Snake bite. *Lancet* **375**, 77–88 (2010).
107. Nirthanan, S. & Gwee, M. C. E. Three-Finger α -Neurotoxins and the Nicotinic Acetylcholine Receptor, Forty Years On. *J. Pharmacol. Sci.* **94**, 1–17 (2004).
108. Vindas, J. *et al.* A novel pentameric phospholipase A2 myotoxin (PophPLA2) from the venom of the pit viper *Porthidium ophryomegas*. *Int. J. Biol. Macromol.* **118**, 1–8 (2018).

109. Tasoulis, T. *et al.* Intra-specific venom variation in the australian coastal taipan oxyuranus scutellatus. *Toxins (Basel)*. **12**, (2020).
110. Fernández, M. L. *et al.* Intravascular hemolysis induced by phospholipases A2 from the venom of the Eastern coral snake, *Micrurus fulvius*: Functional profiles of hemolytic and non-hemolytic isoforms. *Toxicol. Lett.* **286**, 39–47 (2018).
111. Casais-e-Silva, L. L. *et al.* Lemnitoxin, the major component of *Micrurus lemniscatus* coral snake venom, is a myotoxic and pro-inflammatory phospholipase A2. *Toxicol. Lett.* **257**, 60–71 (2016).
112. Sies, H. & Jones, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 363–383 (2020).
113. Dong, D. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense in detoxification systems of snake venom-induced toxicity. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **26**, 1–10 (2021).
114. Sárközy, M. *et al.* Mechanisms and Modulation of Oxidative/Nitrative Stress in Type 4 Cardio-Renal Syndrome and Renal Sarcopenia. *Front. Physiol.* **9**, 1–19 (2018).
115. Münzel, T. *et al.* Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *J. Am. Coll. Cardiol.* **70**, 212–229 (2017).
116. Bargagli, E. *et al.* Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: A review. *Respir. Med.* **103**, 1245–1256 (2009).
117. Dao, V. T. V. *et al.* Pharmacology and Clinical Drug Candidates in Redox Medicine. *Antioxidants Redox Signal.* **23**, 1113–1129 (2015).
118. Barbosa, E. A. *et al.* Structure and function of a novel antioxidant peptide from the skin of tropical frogs. *Free Radic. Biol. Med.* **115**, 68–79 (2018).
119. Plácido, A. *et al.* The antioxidant peptide salamandrin-i: First bioactive peptide identified from skin secretion of salamandra genus (*salamandra salamandra*). *Biomolecules* **10**, (2020).
120. Barbosa, E. A. *et al.* The peptide secreted at the water to land transition in a

- model amphibian has antioxidant effects. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **288**, (2021).
121. Querobino, S. M., Costa, M. S. & Alberto-Silva, C. Protective effects of distinct proline-rich oligopeptides from *B. jararaca* snake venom against oxidative stress-induced neurotoxicity. *Toxicon* **167**, 29–37 (2019).
 122. Walker, J. M. & Ditor, S. E. E. *Peptide Synthesis and Applications M E T H O D S I N M O L E C U L A R B I O L O G Y*TM. (2005).
 123. Zimmermann, L. *et al.* A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. *J. Mol. Biol.* **430**, 2237–2243 (2018).
 124. Gabler, F. *et al.* Protein Sequence Analysis Using the MPI Bioinformatics Toolkit. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **72**, 1–30 (2020).
 125. Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**, 5648–5652 (1993).
 126. Chengteh Lee, Weitao Yang, and R. G. P. Development of the Colic-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density formula Chengteh. *EE Eval. Eng.* **37**, 785–789 (1988).
 127. Cossi, M., Barone, V., Cammi, R. & Tomasi, J. Ab initio study of solvated molecules: A new implementation of the polarizable continuum model. *Chem. Phys. Lett.* **255**, 327–335 (1996).
 128. Yang, W. & Mortier, W. J. The Use of Global and Local Molecular Parameters for the Analysis of the Gas-Phase Basicity of Amines. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5708–5711 (1986).
 129. Maia, R. A., Ventrone, G. & Batagin-Neto, A. Reactivity of lignin subunits: the influence of dehydrogenation and formation of dimeric structures. *J. Mol. Model.* **25**, (2019).
 130. Alves, G. G. B., Lavarda, F. C., Graeff, C. F. O. & Batagin-Neto, A. Reactivity of eumelanin building blocks: A DFT study of monomers and dimers. *J. Mol. Graph. Model.* **98**, 107609 (2020).

131. Martínez, A., Rodríguez-Girones, M. A., Barbosa, A. & Costas, M. Donator acceptor map for carotenoids, melatonin and vitamins. *J. Phys. Chem. A* **112**, 9037–9042 (2008).
132. Monti, S., Carravetta, V. & Ågren, H. Simulation of Gold Functionalization with Cysteine by Reactive Molecular Dynamics. *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 272–276 (2016).
133. Plimpton, S. Fast Parallel Algorithms for Short-Range Molecular Dynamics. *Journal of Computational* vol. 117 1–19 (1994).
134. Aktulga, H. M., Fogarty, J. C., Pandit, S. A. & Grama, A. Y. Parallel reactive molecular dynamics: Numerical methods and algorithmic techniques. *Parallel Comput.* **38**, 245–259 (2012).
135. Chisté, R. C. *et al.* In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chem.* **127**, 419–26 (2011).
136. Mancini, M. C. S. *et al.* Beetroot and leaf extracts present protective effects against prostate cancer cells, inhibiting cell proliferation, migration, and growth signaling pathways. *Phytother. Res.* (2021) doi:10.1002/ptr.7197.
137. Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Kristinsson, H. G. & Bakken, H. E. Preventive effect of Nile tilapia hydrolysate against oxidative damage of HepG2 cells and DNA mediated by H₂O₂ and AAPH. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 6194–205 (2015).
138. Vasconcelos, A. G. *et al.* Cytotoxic activity of poly- ϵ -caprolactone lipid-core nanocapsules loaded with lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) on breast cancer cells. *Food Res. Int.* **136**, 109548 (2020).
139. Löfgren, S. E., Miletto, L. C., Steindel, M., Bachère, E. & Barracco, M. A. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. *Experimental Parasitology* vol. 118 197–202 (2008).
140. Mancini, M. C. S. *et al.* Beetroot and leaf extracts present protective effects against prostate cancer cells, inhibiting cell proliferation, migration, and

- growth signaling pathways. *Phyther. Res.* **35**, 5241–5258 (2021).
141. Amaral, C. L. *et al.* S6Ks isoforms contribute to viability, migration, docetaxel resistance and tumor formation of prostate cancer cells. *BMC Cancer* **16**, 602 (2016).
 142. Castro Araújo, K. *et al.* Trabalho Herpetofauna of the Environmental Protection Area Delta do Parnaíba, Northeastern Brazil. *Cuad. herpetol* **34**, 185–199 (2020).
 143. Loebmann, D., Mai, A. C. G. & Lee, J. T. The invasion of five alien species in the Delta do Parnaíba Environmental Protection Area, Northeastern Brazil. *Rev. Biol. Trop.* **58**, 909–923 (2010).
 144. Cavalcante, J. dos S., Nogueira Júnior, F. A., Bezerra Jorge, R. J. & Almeida, C. Pain modulated by Bothrops snake venoms: Mechanisms of nociceptive signaling and therapeutic perspectives. *Toxicon* **201**, 105–114 (2021).
 145. Menin, L. *et al.* High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in Bothrops moojeni snake venom using precursor ion mass spectrometry. *Toxicon* **51**, 1288–1302 (2008).
 146. Montecucchi, P. C. Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins. *Peptides* **6**, 187–195 (1985).
 147. Popov, C. Expressão de peptídeos bioativos na derme de Phyllomedusa distincta em dois estágios de desenvolvimento. 1–10 (2013).
 148. Tran, T. T. N. *et al.* Antioxidant activities of major tryptophyllin L peptides: A joint investigation of Gaussian-based 3D-QSAR and radical scavenging experiments. *J. Pept. Sci.* **27**, 1–12 (2021).
 149. Wang, R. *et al.* Identification and functional analysis of a novel tryptophyllin peptide from the skin of the red-eye leaf frog, agalychnis callidryas. *Int. J. Biol. Sci.* **11**, 209–219 (2015).
 150. Wang, R., Chen, T., Zhou, M., Wang, L. & Shaw, C. PsT-1: A new tryptophyllin peptide from the skin secretion of Waxy Monkey Leaf Frog, Phyllomedusa sauvagei. *Regul. Pept.* **184**, 14–21 (2013).

151. Yang, W. & Parr, R. G. Hardness, softness, and the Fukui function in the electronic theory of metals and catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 6723–6726 (1985).
152. Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3533–3539 (1963).
153. Melin, J., Aparicio, F., Subramanian, V., Galván, M. & Chattaraj, P. K. Is the Fukui Function a Right Descriptor of Hard-Hard Interactions? *J. Phys. Chem. A* **108**, 2487–2491 (2004).
154. Dong, J., Sulik, K. K. & Chen, S. Y. Nrf2-mediated transcriptional induction of antioxidant response in mouse embryos exposed to ethanol in vivo: Implications for the prevention of fetal alcohol spectrum disorders. *Antioxidants Redox Signal.* **10**, 2023–2033 (2008).
155. Baird, L. & Yamamoto, M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **40**, 1–23 (2020).
156. Lau, A. et al. Arsenic-Mediated Activation of the Nrf2-Keap1 Antioxidant Pathway. *J Biochem Mol Toxicol* **27**, 99–105 (2012).
157. Che, M. et al. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. **21**, 143–149 (2017).
158. Kienhöfer, J. et al. Association of mitochondrial antioxidant enzymes with mitochondrial DNA as integral nucleoid constituents. *FASEB J.* **23**, 2034–2044 (2009).
159. Kerr, F. et al. Direct Keap1-Nrf2 disruption as a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *PLoS Genet.* **13**, 1–30 (2017).
160. Kowalska, M. et al. Genetic Variants and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **17**, 208–223 (2020).
161. Puspita, L., Chung, S. Y. & Shim, J. W. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Mol. Brain* **10**, 1–12 (2017).
162. Michelle Smeyne, R. J. S. Glutathione Metabolism and Parkinson's Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **62**, 13–25 (2013).

163. Tang, Q., Liu, H., Shi, X. J. & Cheng, Y. Blood Oxidative Stress Marker Aberrations in Patients with Huntington's Disease: A Meta-Analysis Study. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, (2020).
164. Petri, S., Körner, S. & Kiaei, M. Nrf2/ARE signaling pathway: Key mediator in oxidative stress and potential therapeutic target in ALS. *Neurol. Res. Int.* **2012**, (2012).
165. Uttara, B. et al. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr. Neuropharmacol.* **7**, 65–74 (2009).
166. Allan Butterfield, D., Castegna, A., Lauderback, C. M. & Drake, J. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol. Aging* **23**, 655–664 (2002).
167. Querobino, S. M., Ribeiro, C. A. J. & Alberto-Silva, C. Bradykinin-potentiating PEPTIDE-10C, an argininosuccinate synthetase activator, protects against H₂O₂-induced oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Peptides* **103**, 90–97 (2018).
168. Xu, X. & Lai, R. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chem. Rev.* **115**, 1760–1846 (2015).
169. Sousa, N. A. et al. Novel Ocellatin Peptides Mitigate LPS-induced ROS Formation and NF-κB Activation in Microglia and Hippocampal Neurons. *Sci. Rep.* **10**, 1–16 (2020).
170. Zhao, H. et al. Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes. *Peptides* **29**, 1685–1691 (2008).
171. Wang, Y. et al. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. *PLoS One* **3**, (2008).