



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS  
ANTIMICROBIANOS ISOLADOS DAS SECREÇÕES CUTÂNEAS DE  
ANUROS DOS GÊNEROS *Proceratophrys*, *Physalaemus* e *Hypsiboas***

Andréa Cruz e Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Mariana de S. Castro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.



Brasília  
2011

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Dissertação de mestrado  
ANDRÉA CRUZ E CARVALHO

Título:  
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS  
ISOLADOS DAS SECREÇÕES CUTÂNEAS DE ANUROS DOS GÊNEROS  
*Proceratophrys, Physalaemus e Hypsiboas*

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Mariana S. Castro  
Orientadora - UnB

Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila  
Membro Titular - UFU

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres  
Membro Titular - UnB

Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior  
Membro Suplente - UnB

*“O destino une e separa pessoas, mas mesmo ele sendo tão forte,  
é incapaz de fazer com que esqueçamos,  
pessoas que por algum momento nos fizeram felizes” ...  
(Autor desconhecido)*

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”  
(Albert Einstein)*

*“Trabalho é amor feito visível. Se não podes trabalhar com amor, mas somente  
com desgosto, é melhor deixar o trabalho, sentar no portão do templo e pedir esmola  
àqueles que trabalham com alegria”  
(Kahlil Gibran)*

## DEDICO O PRESENTE TRABALHO

*À DEUS, sem ele nada disso teria sido possível, foi nos momentos de solidão e os mais difíceis, que pude sentir o quão misericordioso ele é na minha vida...*

*À minha mãe, que mesmo ausente e distante sempre a cada telefonema dizia: Filha, estou aqui rezando para o seu anjo da guarda e “Nossa Senhora” e eles estão aí olhando por você, acredite.*

*À Dolly, minha companheira e amiga, presente em tantos momentos da minha vida, momentos bons, e por vezes, ruins, mas não importava, ela, sempre esteve presente, mesmo sem entender direito..... Quando em meio há um problema eu chorava em silêncio encontrava nas suas “lambidas” e em seu afago, a maior forma de amor e lealdade que uma cadelinha poderia oferecer. Quando ao chegar em casa cansada, depois de um dia duro de trabalho, ou de aulas, encontrava nos seus olhos, todo o carinho e apoio que precisava, sem querer nada em troca, a não ser a certeza que eu sempre estaria ao seu lado, e que a sua lealdade e companheirismo nunca iria faltar a mim, ao longo desses 13 anos de sua existência. Exemplo de Amor incondicional...*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mariana S. Castro, um verdadeiro exemplo de bondade, amor, e generosidade. Um ser humano que jamais havia conhecido antes, com tantas qualidades, foi ela que me fez não desistir de tudo, e me socorreu quando eu mais precisei, e somente com a sua serenidade e calma, e de forma tão generosa me disse: "Calma que tudo vai dar certo, e você vai conseguir"...Uma verdadeira Mãe, como já disse tantas vezes...

Ao Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Jr. pela amizade, pelas sugestões, e por tantas vezes, ter coletado o veneno bruto que foi material de estudo do presente trabalho.

A todos os professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, da Universidade de Brasília, Dr. César Koppe Grisólia, por todo incentivo, apoio e amizade.

Ao Laboratório de Morfologia e Morfogênese da Universidade de Brasília, pela colaboração na realização dos ensaios antitumorais.

Ao HEMOCENTRO de Brasília, em especial ao Léo, que sempre que precisei dos eritrócitos de sangue humano O<sup>+</sup>, me forneceu, e nunca me "deixou na mão".

Ao Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, (UNESP - Araraquara) pela síntese dos peptídeos.

Ao Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues, um grande homem e pesquisador que tive a oportunidade de conviver por quase seis anos dentro do Laboratório de Biofísica de Membranas da UFPE. Incentivo, amizade, compromisso com a pesquisa, e dedicação. Aprendi tudo com você, e devo a você tudo o que pude me tornar hoje como profissional.

Ao Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov que me acolheu no Laboratório de Biofísica de Membranas na UFPE, quando eu nem imaginava o que era Ciência, faltava ainda um semestre para iniciar o meu curso de Ciências Biológicas e já comecei a Iniciação Científica sob sua supervisão, e o senhor não imagina o quão valioso foram esses 4 anos para mim.

À Dra. Liliya Yuldasheva minha orientadora tanto da Iniciação Científica, como do período em que estive como DTI-1E (Desenvolvimento Tecnológico Industrial-CNPq). Mãe Científica, literalmente...Aquele que cuida, protege, e se importava até se eu já havia almoçado. Que falava assim as sextas feiras: Andréa, não se esquece de ler um pouco o Lehninger, deixa ele na cabeceira da cama.

Ao meu grande amigo Colombiano MSc. Jimmy G. Vargas, exemplo de solidariedade e acima de tudo amizade, que se dispôs por diversos Finais de Semana, Feriados, até altas horas da noite, ir ao laboratório para me ajudar nas cromatografias, me ensinando desde os pequenos detalhes do HPLC. Um amigo que sei que posso contar sempre. E que me disse uma vez: Andréa, eu confio em ir embora e deixar você usando o equipamento, sei que você trabalha correto e com responsabilidade.

À amiga e confidente de tantos momentos: Rosa Duenas, quem foi que disse "menina" que não conseguiríamos?! A sua ajuda foi sem dúvida imprescindível. O Congresso de Toxinologia em Araxá-MG, só me mostrou que você é como se diz aqui no Brasil "Pau para toda obra" obrigada pela sua amizade, apoio, e convivência de dias maravilhosos no nosso grupo "Diamante".

À você minha grande amiga, Jéssica Arruda, que jamais vou esquecer, e que além de ser uma pessoa sempre presente, me ajudando e ensinando o que eu não sabia, sempre presente com um astral maravilhoso. Somente nós duas mesmo, para estar em pleno fim de ano na UnB, completamente deserta, "lutando" por um resultado positivo do nosso trabalho, com um astral positivo em meio a risos e risadas ...

Aos novos e maravilhosos amigos que conquistei no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, César, Jaques, Rayner, Fernando, Daniel, Alan, Adelson, Humberto, Pedro, Anne, Elaine, Diana, Micaella, Pollyana, e outros não citados, mas igualmente importantes, por estarem sempre disponíveis pra auxiliarem no desenvolvimento desse trabalho, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e por alegrar os dias em que eu estava tão exausta e mesmo assim conseguir sorrir.

Ao Nuno Domingues, pelo apoio operacional, e que se dispôs tantas vezes a ajudar mesmo estando no horário do seu almoço, e às vezes, mesmo depois do horário do seu expediente dentro do Laboratório.

À MSc. Thalita Camargos, (Tatá) primeira pessoa que conheci dentro do Laboratório de Toxinologia, e que me recebeu com um extremo profissionalismo. E foi fundamental, me ajudando em vários momentos até nas coisas mais básicas como escrever nos tubos.

Ao amigo MSc. Christiano Gati com toda a sua vibração positiva, sempre demonstrou preocupação com o andamento do meu trabalho, e que mesmo bastante ocupado, me ajudou nas cromatografias, e cedendo seu dia de reserva do Sped-Vac.

Aos amigos que também conquistei e levo na minha memória do Laboratório de Toxinologia: Carol, Carlinha Vizzotto, Janaína, Luísa Sordi, Marianne, Natiela, Pollyanna, Solange, Rafael Melani, e Fagner pela convivência diária, ensinamentos, conversas e momentos de grande descontração.

À minha irmã, Patrícia Kelly Barreto, na ingenuidade dos seus filhos, meus sobrinhos, Caio, Eric e Luna, pude observar que nesta vida, tudo passa extremamente rápido, e que quando menos esperamos acabou o tempo.....obrigada por tudo.

À minha amiga e confidente Ana Carolina (carolzinha) que sempre me deu apoio ao longo de minha jornada. E que por diversas vezes na época do vestibular, dizia: Déia, tu vai mesmo fazer vestibular para Medicina, faz Biologia. Nem imaginava ela, que a Biologia viraria um amor incondicional.

À Elaine Carvalho, amiga, sorridente e alegre, um exemplo de vida. Com um caráter impar e uma personalidade invejável. Acompanhou-me durante toda a minha vida acadêmica na UFPE, no Laboratório de Biofísica de Membranas, e com a sua risada espontânea e seus abraços calorosos com que tantas vezes contei e me fez sentir feliz.

Ao meu amigo Adriano Martins, amigo de infância. E como não lembrar de você?! Sempre disposto a ajudar, e me ouvir, nas horas difíceis em que eu mais precisei.

Ao Cléber Arruda, só você mesmo (Café) poderia por horas a fio me ouvir e sorrir das coisas mais bestas do mundo real, mas somente assim, pude perceber que o orgulho não leva a nada, e que as suas experiências sirvam de aprendizado para mim. Obrigada por tudo.

Ao Márcio Justino, (Galinho), como esquecer as suas ligações de madrugada e fora de hora, mas com aquele humor que somente você consegue ter, e por mais que eu explique que estamos no meio do fuso horário entre países diferentes, não consigo me chatear ao acordar com seus risos. Você também faz parte da minha vida.

À minha amiga de infância Serena Terra Kierzkowski que mesmo estando no outro lado do mundo, é para mim, um exemplo diário de persistência, e dedicação em tudo que faz, que um dia me fez acreditar na seguinte frase: "Basta ter força de vontade que você consegue". Ao ganhar um dicionário de grego de presente de aniversário e aprender grego com só lendo o dicionário, exemplo de determinação e inteligência.

Ao meu amigo o Biólogo Dr. Bruno Machado Leão, pelo apoio incondicional que sempre se fez presente.

À amiga de Graduação, Karol Leitão que além de confidente por mais de 10 anos, tive a oportunidade de ver o exemplo de honestidade, e lealdade que você é, e sempre será a melhor amiga, aquela que me ouve nos momentos de alegria e naqueles que mais precisei: os de tristeza.

À Kátia Barcellos exemplo de amor e dedicação a ajudar o próximo, e especialmente aqueles que são indefesos- os animais. Obrigada pelas palavras de conforto, e dos abraços que ganhei quando precisei, quando sentia saudades da minha mãe.

Ao Ângelo Cardoso Ribeiro por todo o apoio e ajuda que me foi concedido ao longo desse trabalho em Brasília.

Ao meu querido Gilberto Mansur, grande colecionador dos pratos da Boa Lembrança, que em cada jantar nosso, me falava como um grande Jornalista que é, das suas experiências de vida, e me mostrava que aquelas diversidades que eu tinha, era tudo passageiro, e que eu iria levar um aprendizado de cada uma delas.

As secretarias da Pós - Graduação em Biologia Animal, Ana Paula Cabral e Daniele Cristiane de Lara Brito, que sempre que precisei de qualquer documentação, estavam dispostas a ajudar, e imediatamente.

As músicas do Philip Glass que nunca me deixou entrar em parafuso, e me fizeram companhia nas madrugadas, em que eu escrevia o presente trabalho, sendo sempre um alívio para alma, e uma poesia para os ouvidos...

Enfim a todos que, de forma direta ou indireta, ajudaram e me incentivaram para a finalização deste trabalho, sou eternamente grata.

# ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Peptídeos antimicrobianos (PAMs): uma abordagem panorâmica	4
1.1.1. Estrutura e características dos peptídeos antimicrobianos	7
1.1.2. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos	10
1.1.3. Modelos dos mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos	14
1.1.4. A diversidade de PAMs	18
1.1.5. Aplicações dos peptídeos antimicrobianos	20
1.2. Câncer	22
1.2.1. Desencadeamento do câncer	23
1.2.2. Peptídeos anticarcinogênicos (PACs)	25
1.2.3. Mecanismos de ação dos peptídeos carcinogênicos (PACs)	27
1.2.4. A seletividade dos PACs pelas células tumorais	29
1.2.5. Estratégias para aumentar a eficiência dos PACs	31
1.3. Espécies-alvo do presente estudo	33
1.3.1. <i>Proceratophrys goyana</i> (Miranda-Ribeiro, 1937)	33
1.3.2. <i>Physalaemus fuscomaculatus</i> (Steindachner, 1864)	35
1.3.3. <i>Physalaemus centralis</i> (Bokermann, 1962)	36
1.3.4. <i>Hypsiboas albopunctatus</i> (Spix, 1824)	38
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1. Coleta dos animais e obtenção das secreções cutâneas dos anuros das espécies <i>P. goyana</i> , <i>P. centralis</i> e <i>P. fuscumaculatus</i>	46
4.2. Fracionamento cromatográfico das secreções cutâneas brutas	46
4.3. Purificação dos peptídeos bioativos	46



4.4. Ensaio hemolítico	47
4.5. Ensaio antimicrobiano	47
4.5.1. Ensaio preliminar	48
4.6. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) para os peptídeos de <i>H. albopunctatus</i>	49
4.7. Análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF	50
4.8. Ensaio de citotoxicidade sobre linhagens celulares tumorais	51
4.8.1. Linhagens celulares	51
4.8.2. Manutenção da cultura de células	52
4.8.3. Tratamento das células com os peptídeos <i>ceratoxin-like</i> de <i>H. albopunctatus</i>	53
4.8.4. Análise dos efeitos citotóxicos	54
4.8.4.1. Avaliação da viabilidade celular empregando-se MTT	54
4.8.4.2. Morfologia celular	55
5. RESULTADOS	58
5.1. <i>Proceratophrys goyana</i>	58
5.1.1. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea	58
5.1.2. Ensaio preliminares das atividades antimicrobiana e hemolítica	58
5.1.3. Análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF das frações bioativas	60
5.1.4. Purificação de peptídeos bioativos	63
5.2. <i>Physalaemus fuscumaculatus</i>	64
5.2.1. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea	64
5.2.2. Ensaio preliminares das atividades antimicrobiana e hemolítica	65
5.2.3. Análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF das frações bioativas	66

5.2.4. Purificação de peptídeos bioativos	70
5.3. <i>Physalaemus centralis</i>	71
5.3.1. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea	71
5.3.2. Ensaios preliminares das atividades antimicrobiana e hemolítica	72
5.3.3. Análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF das frações bioativas	73
5.3.4. Purificação de peptídeos bioativos	76
5.4. <i>Hypsiboas albopunctatus</i>	77
5.4.1. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) para os peptídeos <i>ceratoxin-like</i> de <i>H. albopunctatus</i>	77
5.4.2. Tratamento das células cancerígenas e normais com os peptídeos <i>ceratoxin-like</i> de <i>H. albopunctatus</i>	78
5.4.2.1. Efeitos sobre a viabilidade celular	78
5.4.2.2. Efeitos sobre a morfologia celular	79
6. DISCUSSÃO	87
7. CONCLUSÃO	99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
9. ANEXOS	123

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de estruturas tridimensionais de peptídeos antimicrobianos: PAMs lineares: (A) Estrutura em  $\alpha$ -hélice da *magainina*; (B) Forma estendida da *indolicidina*. PAMs cíclicos: (C) Estrutura enovelada da *protegrina*; (D) Estrutura folhas  $\beta$ -pregueadas das *defensinas* 10

Figura 2. (A) Representação esquemática do modelo *barrel-stave*. 1) Os peptídeos se ligam à membrana plasmática tomando a conformação de  $\alpha$ -hélice. 2) Ligação de mais peptídeos à membrana. 3) Inserção das hélices na bicamada lipídica. 4) Recrutamento de mais monômeros para aumento do poro. 5) Vazamento do material citoplasmático, seguida da morte celular. (B) Esquema do modelo do poro toroidal onde os peptídeos se intercalam aos fosfolipídios para formar o poro. O azul das hélices (peptídeos) representa a face hidrofílica e o vermelho a hidrofóbica (Retirado de Brogden, 2005) 14

Figura 3. Representação do modelo *carpet-like*. 1) Ligação dos peptídeos aos fosfolipídios da membrana. 2) Alinhamento dos monômeros de peptídeo de modo que os resíduos hidrofóbicos fiquem em contato com as cabeças dos fosfolipídios. 3) Reorientação dos peptídeos para o centro hidrofóbico da membrana. 4) Desintegração da membrana devido a quebra da curvatura (Retirado de Brogden, 2005) 16

Figura 4. Esquema do modelo *Shai-Matsuzaki-Huang*. a) Formação de um carpete de peptídeos na camada externa da membrana. b) Integração do peptídeo à membrana e afinamento da camada externa. c) Formação de poros transitentes. d) Transporte de lipídios e peptídeos para a camada interna. e) Difusão dos peptídeos para alvos intracelulares (em alguns casos). f) Colapso da membrana em fragmentos. (Modificado de Zasloff, 2002) 18

Figura 5. Estágios de progressão do câncer: (A). Células normais; (B). Estágio de Iniciação: mutação genética. (C). Promoção: transformação maligna da célula; (D). Progressão: proliferação celular descontrolada. (E). Estágio de Câncer avançado. (Imagem retirada do Instituto Nacional do Câncer - <http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind/cancer/cancer01.htm>) 25

Figura 6 Multi-estágios da carcinogênese: processos e estratégias de prevenção. A iniciação é caracterizada pela conversão de uma célula normal em uma célula inicializada, em resposta a agentes prejudiciais ao DNA (dano genético indicado por um X). A promoção caracteriza-se pela transformação de uma célula inicializada em uma população de células pré-neoplásicas, resultado de alterações na expressão de genes e proliferação celular. A progressão inclui a transformação das células pré-neoplásicas em uma população de células neoplásicas como resultado de alterações genéticas adicionais (modificado de Peter Greenwald 2002) 30

Figura 7. Interação de um peptídeo anticarcinogênico (PAC) com a membrana celular: (A) ancoragem do peptídeo na membrana celular; (B). Início da desestabilização da membrana celular; (C). Desmontagem da bicamada lipídica e formação do canal transmembrana; (D). Fluxo de substâncias para o interior e exterior da célula levando a apoptose (fonte: wfdaj.sites.uol.com.br) 31

Figura 8. Exemplar de *Proceratophrys goyana* (Miranda-Ribeiro, 1937). (Foto de Carlos Cândido-Colinas do Sul/Goiás) 34

Figura 9. Exemplar de *Physalaemus fuscomaculatus* (Steindachner, 1864). Fonte da imagem: <http://www.conservegrassland.org/portuguese/membership.html> 36

Figura 10. Exemplar de *Physalaemus centralis* (Bokermann, 1962) (Foto de Diogo B. Provete) 37

Figura 11. Exemplar de *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) (Foto de Carlos Cândido) 39

Figura 12. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *P. goyana* em coluna C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS, 6.0 x 150 mm) em sistema HPLC da Shimadzu com emprego de gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila. A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min. As frações contendo os peptídeos utilizados ao longo do presente trabalho estão indicadas com números que correspondem à sua ordem de eluição e possuem os seguintes tempos de retenção: Fração 19: 10.46; Fração 21: 11.36; Fração 22: 11.89; Fração 33: 18.81; Fração 38: 20.13; Fração 68: 32.61 e Fração 86: 43.94 min 59

Figura 13. Espectrograma da fração bioativa 21 isolada da secreção cutânea de *P. goyana*, com massa molecular 1343.20 Da [M+H]<sup>+</sup>, ativa contra a bactéria *P. aeruginosa*, com uma inibição de cerca de 40%. Inseto. Visão ampla do espectro evidenciando o grau de pureza dessa fração 61

Figura 14. Espectrograma da fração bioativa 33 isolada da secreção cutânea de *P. goyana*, com massa molecular 1159.11 Da [M+H]<sup>+</sup>, ativa contra a bactéria *P. aeruginosa*, com uma inibição de aproximadamente de 24%. Inseto. Visão ampla do espectro evidenciando o grau de pureza dessa fração 61

Figura 15. Frequência da composição peptídica da secreção cutânea de *P. goyana* representadas em grupos de massas moleculares monoisotópicas obtidas pela análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF nos modos refletido (matriz ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxi-cinâmico) e linear (matriz ácido sinapínico). O ensaio foi realizado empregando-se as frações provenientes de uma corrida de RP-HPLC 62

Figura 16. Distribuição dos componentes moleculares detectados em função da suas massas moleculares na análise por MALDI-TOF MS com relação aos seus tempos de retenção em sistema RP-HPLC 62

Figura 17. (A) Purificação do peptídeo bioativo 22 de *P. goyana*. Recromatografia realizada em sistema de RP-HPLC em coluna analítica C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS 4,6 x 150 mm). A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min, com um gradiente de 0-20% de acetonitrila/TFA 0,1% em 30 minutos. (B) Espectrograma de massa em sistema MALDI-TOF, modo refletido, matriz reconstituída de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) da fração 22 (indicada como F.22) 63

Figura 18. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *P. fuscumaculatus* em coluna C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS, 6.0 x 150 mm) em sistema HPLC da Shimadzu com emprego de gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila. A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min. As frações contendo os peptídeos utilizados ao longo do presente trabalho estão indicadas com números que correspondem à sua ordem de eluição e possuem os seguintes tempos de retenção: Fração 16: 16.04; Fração 23: 19.25; Fração 96: 51.83; Fração 103: 62.25; Fração 104: 63.37; Fração 111: 66.86 e Fração 112: 67.24 min 64

Figura 19. Espectrograma da fração bioativa 111 isolada da secreção cutânea de *P. fuscumaculatus*, com massa molecular 1293.52 Da [M+H]<sup>+</sup>, ativa contra a bactéria *S. aureus*, com uma inibição de cerca de 19%. Inseto. Visão ampla do espectro evidenciando o grau de pureza dessa fração 67

Figura 20. Espectrograma da fração bioativa 112 isolada da secreção cutânea de *P. fuscumaculatus*, com massa molecular 1671.42 Da [M+H]<sup>+</sup>, ativa contra a bactéria *S. aureus*, com uma inibição de cerca de 70%. Inseto. Visão ampla do espectro evidenciando o grau de pureza dessa fração 68

Figura 21. Frequência da composição peptídica da secreção cutânea de *P. fuscumaculatus* representadas em grupos de massas moleculares monoisotópicas obtidas pela análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF nos modos refletido (matriz ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxicinâmico) e linear (matriz ácido sinapínico). O ensaio foi realizado empregando-se as frações provenientes de uma corrida de RP-HPLC 69

Figura 22. Distribuição dos componentes moleculares detectados em função da suas massas moleculares na análise por MALDI-TOF MS com relação aos seus tempos de retenção em sistema RP-HPLC 69

Figura 23. (A). Purificação do peptídeo bioativo 23 de *P. fuscumaculatus*. Recromatografia realizada em sistema de RP-HPLC em coluna analítica C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS 4,6 x 150 mm). A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min, com um gradiente de 0-25% de acetonitrila/TFA 0,1% em 30 minutos. (B). Espectrograma de massa em sistema MALDI-TOF, modo refletido, matriz reconstituída de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) da fração 23 (indicada como F.23)

70

Figura 24. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *P. centralis* em coluna C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS, 6.0 x 150 mm) em sistema HPLC da Shimadzu com emprego de gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila. A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min. As frações contendo os peptídeos utilizados ao longo do presente trabalho estão indicadas com números que correspondem à sua ordem de eluição e possuem os seguintes tempos de retenção: Fração 6: 5.78; Fração 18: 15.89; Fração 22: 17.54; Fração 87: 40.02; Fração 116: 57.13; Fração 118: 60.38 e Fração 120: 62.55

71

Figura 25. Espectrograma da fração bioativa 118 isolada da secreção cutânea de *P. centralis*, com massa molecular 1774.92 Da [M+H]<sup>+</sup>, ativa contra a bactéria *S. aureus*, com uma inibição de cerca de 15%. Inseto. Visão ampla do espectro evidenciando o grau de pureza dessa fração

74

Figura 26. Frequência da composição peptídica da secreção cutânea de *P. centralis* representadas em grupos de massas moleculares monoisotópicas obtidas pela análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF nos modos refletido (matriz ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxi-cinâmico) e linear (matriz ácido sinapínico). O ensaio foi realizado empregando-se as frações provenientes de uma corrida de RP-HPLC

75

Figura 27. Distribuição dos componentes moleculares detectados em função da suas massas moleculares na análise por MALDI-TOF MS com relação aos seus tempos de retenção em sistema RP-HPLC

75

Figura 28. (A) Purificação do peptídeo bioativo 87 de *P. centralis*. Recromatografia realizada em sistema de RP-HPLC em coluna analítica C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS 4,6 x 150 mm). A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min, com um gradiente de 30-40% de acetonitrila/TFA 0,1% em 25 minutos. (B) Espectrograma de massa em sistema MALDI-TOF, modo refletido, matriz reconstituída de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) da fração 23 (indicada como F87)

76

Figura 29. (A) Porcentagem de células mortas das linhagens celulares de câncer de colo uterino (HeLa) e de fibroblasto normal (NHI3T3) após a incubação por 48 horas com diferentes concentrações do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile. O peptídeo testado por meio do ensaio do MTT apresentou uma maior citotoxicidade contra a linhagem de fibroblastos normais (NHI3T3). Os valores são expressos como média  $\pm$  SD de um experimento feito em duplicata. (B) Porcentagem de células mortas das linhagens celulares de câncer de colo uterino (HeLa) e de fibroblasto normal (NHI3T3) após a incubação por 48 horas com diferentes concentrações do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu. Os valores são expressos como média  $\pm$  SD de um experimento feito em duplicata

79

Figura 30. (A) Porcentagem de células viáveis das linhagens celulares de câncer de colo uterino (HeLa) e de fibroblasto normal (NHI3T3) após a incubação por 48 horas com diferentes concentrações do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile. Os valores são expressos como média  $\pm$  SD de um experimento feito em duplicata. (B) Porcentagem de células viáveis das linhagens celulares de câncer de colo uterino (HeLa) e de fibroblasto normal (NHI3T3) após a incubação por 48 horas com diferentes concentrações do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu. Os valores são expressos como média  $\pm$  SD de um experimento feito em duplicata

79

Figura 31. (A) Fotomicrografias de células de câncer de colo do útero (HeLa) após 48 horas de incubação na ausência do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile (controle); (B) Após incubação na menor concentração empregada (0,125  $\mu$ M) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile, onde pode-se observar conservação da morfologia celular à semelhança da situação controle exibida no inserto A; (C) Após incubação na maior concentração empregada (256  $\mu$ M) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile, onde pode-se observar perda da integridade da membrana plasmática e a presença de *debris* celulares (setas); (D) Após incubação na concentração de 8  $\mu$ M do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile, onde ainda pode-se observar efeitos citotóxicos relevantes. Imagens obtidas por microscópio de contraste de fase. Barra = 100  $\mu$ m

81

Figura 32. (A) Fotomicrografias de células de fibroblasto normal (NIH3T3) após 48 horas de incubação na ausência do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile (controle); (B) Após incubação na menor concentração empregada (0,125  $\mu$ M) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile; (C) Após incubação na maior concentração empregada (256  $\mu$ M) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile; (D) Após incubação na concentração de 8  $\mu$ M do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile. Imagens obtidas por microscópio de contraste de fase. Barra = 100  $\mu$ m

82

Figura 33. (A) Fotomicrografias de células de câncer de colo do útero (HeLa) após 48 horas de incubação na ausência do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu (controle); (B) Após incubação na menor concentração empregada (0,125  $\mu\text{M}$ ) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu, onde pode-se observar conservação da morfologia celular à semelhança da situação controle exibida no inserto A; (C) Após incubação na maior concentração empregada (256  $\mu\text{M}$ ) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu, onde pode-se observar perda da integridade da membrana plasmática e a presença de *debris* celulares (setas); (D) Após incubação na concentração de 8  $\mu\text{M}$  do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu, onde ainda pode-se observar efeitos citotóxicos relevantes. Imagens obtidas por microscópio de contraste de fase. Barra = 100  $\mu\text{m}$

83

Figura 34. (A) Fotomicrografias de células de fibroblasto normal (NIH3T3) após 48 horas de incubação na ausência do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu (controle); (B) Após incubação na menor concentração empregada (0,125  $\mu\text{M}$ ) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu; (C) Após incubação na maior concentração empregada (256  $\mu\text{M}$ ) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu; (D) Após incubação na concentração de 8  $\mu\text{M}$  do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu. Imagens obtidas por microscópio de contraste de fase. Barra = 100  $\mu\text{m}$

84

Figura 35. Concentração capaz de reduzir em 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) a viabilidade celular de células de câncer de colo uterino (HeLa) e de fibroblastos normais (NIH3T3) dos peptídeos *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus* após 48 horas de incubação a 37 °C

85

Figura 36. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *Hypsiboas albopunctatus* na coluna  $\text{C}_8$  (Sephadex  $\text{C}_8$ , 4.6 x 250 mm, Pharmacia Biotech, Sweden) em sistema HPLC com emprego de gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila. A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min. A fração contendo o peptídeo antimicrobiano caracterizado no presente estudo está indicada com um asterisco

123

Figura 37. Multi-alinhamento entre as *ceratoxinas* e o peptídeo *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus* contendo leucina como resíduo C-terminal. "\*" indica resíduos idênticos e ":" indica substituições conservativas

124



## LISTA DE TABELAS

- Tabela. 1. Avaliação da atividade inibitória sobre o crescimento das bactérias patogênicas *S. aureus* e *P. aeruginosa* das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da secreção cutânea *P. goyana* em RP-HPLC C<sub>18</sub> 59
- Tabela 2. Massas moleculares [M+H]<sup>+</sup> dos componentes moleculares detectados presentes nas frações cromatográficas obtidas com o fracionamento em RP-HPLC da secreção cutânea de *P. goyana*. Dados obtidos a partir de análise em espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF, nos modos refletido e linear 60
- Tabela. 3. Avaliação da atividade inibitória sobre o crescimento das bactérias patogênicas *S. aureus* e *P. aeruginosa* das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da secreção cutânea *P. fuscumaculatus* em RP-HPLC C<sub>18</sub> 65
- Tabela 4. Massas moleculares [M+H]<sup>+</sup> dos componentes moleculares detectados presentes nas frações cromatográficas obtidas com o fracionamento em RP-HPLC da secreção cutânea de *P. fuscumaculatus*. Dados obtidos a partir de análise em espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF, nos modos refletido e linear 66
- Tabela. 5. Avaliação da atividade inibitória sobre o crescimento das bactérias patogênicas *S. aureus* e *P. aeruginosa* das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da secreção cutânea *P. centralis* em RP-HPLC C<sub>18</sub> 72
- Tabela 6. Massas moleculares [M+H]<sup>+</sup> dos componentes moleculares detectados presentes nas frações cromatográficas obtidas com o fracionamento em RP-HPLC da secreção cutânea de *P. centralis*. Dados obtidos a partir de análise em espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF, nos modos refletido e linear 73
- Tabela 7. Atividade antimicrobiana (MICs) das duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu ou Ile na porção C-terminal frente a linhagens bacterianas Gram-negativas 77
- Tabela 8. Atividade antimicrobiana (MICs) das duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu ou Ile na porção C-terminal frente a linhagens bacterianas Gram-positivas 77

Tabela 9. Comparação das características químicas e biológicas de vários PAMs isolados da secreção cutânea de anfíbios e que também apresentam atividade antitumoral. Os parâmetros comparados são a massa molecular monoisotópica (Mm); anfifilicidade, como momento hidrofóbico médio ( $\langle\mu H\rangle$ ); hidrofobicidade média ( $\langle H\rangle$ ); carga em pH neutro; ponto isoelétrico (pI), porcentagem de resíduos hidrofóbicos (%H); atividade contra Gram-positivas (+) e Gram-negativas (-); predição da estrutura secundária. (modificado de Libério, 2008)

92

## LISTA DE ABREVIATURAS

**[M+H]<sup>+</sup>**. Massa molecular monoisotópica.

**Abs.** Absorbância.

**ACN.** Acetonitrila.

**ATP.** Adenosina trifosfato.

**ATTC.** *American Type Culture Collection.*

**CFU.** Unidade formadora de colônia.

**DMEM.** *Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium.*

**DMSO.** Dimetilsulfóxido.

**DNA.** Ácido desoxorribonucléico.

**DST.** Doença sexualmente transmissível.

**DTT.** Ditioneitol.

**EDTA.** Ácido etilenodiaminotetraacético.

**FGF.** Fator de crescimento de fibroblasto.

**HC<sub>50</sub>.** Concentração capaz de promover 50% de hemólise.

**HCCA.** Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico.

**IC<sub>50</sub>.** Concentração que inviabiliza 50% das células.

**MALDI-TOF.** *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight.*

**MIC.** Concentração inibitória mínima.

**MTT.** Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio.

**m/z.** Massa/carga.

**NIH3T3.** Células de fibroblastos murino normal.

**nM.** Nanomolar.

**PAM.** Peptídeo antimicrobiano.

**PAC.** Peptídeo anticarcinogênico.

**RP-HPLC.** *Reversed-phase high performance liquid chromatography.*

**TFA.** Ácido trifluoroacético.

## RESUMO

As secreções cutâneas dos anfíbios anuros são reconhecidamente uma rica fonte de substâncias bioativas. Um importante grupo dentre esses compostos são os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Os PAMs são componentes do sistema imune inato, presentes na maioria dos seres vivos, que vêm despertando um interesse crescente, uma vez que apresentam atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismos, sendo usualmente atóxicos para células de mamíferos. O presente trabalho teve como objetivo o isolamento, a identificação e a caracterização empregando espectrometria de massa tipo MALDI-TOF de PAMs presentes nas secreções cutâneas dos anuros *Proceratophrys goyana*, *Physalaemus fuscumaculatus* e *Physalaemus centralis*, comumente encontrados na fauna do Cerrado. Também foi objeto do presente a caracterização biológica de duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* previamente isolado e quimicamente caracterizado da rã *Hypsiboas albopunctatus*.

As secreções cutâneas das espécies *P. goyana*, *P. fuscumaculatus* e *P. centralis* foram obtidas por estimulação elétrica, liofilizadas e armazenadas a -20°C. Cada secreção bruta foi submetida a fracionamento por RP-HPLC usando coluna C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS, 6.0 x 150 mm) em sistema HPLC com emprego de gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila. A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min. As frações cromatográficas eluídas foram coletadas manualmente e secadas a vácuo. Diferenças significativas nos perfis cromatográficos de cada espécie foram observadas. Todas as frações cromatográficas obtidas foram avaliadas quanto à capacidade em inibir a proliferação de bactérias patogênicas *S. aureus* (ATCC 25923) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853), bem como quanto à capacidade de lisar eritrócitos humanos. As frações ativas foram analisadas por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF a fim de se avaliar seu grau de pureza e determinar as massas moleculares dos componentes presentes. Peptídeos antimicrobianos foram identificados nas três secreções cutâneas em estudo.

As duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu ou Ile na porção C-terminal foram avaliados quanto ao seu potencial inibitório sobre o crescimento de sete linhagens de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As duas versões do peptídeo *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus* apresentaram atividade

antibacteriana significativa com MICs que variaram de 2 a 8  $\mu\text{M}$ . Como vários PAMs de amplo espectro de ação também apresentam citotoxicidade para células cancerígenas, tais peptídeos foram testados contra a linhagem celular de câncer cervical (HeLa) e fibroblastos normais (NIH3T3). Os resultados obtidos indicaram que as duas versões testadas exibem atividade citotóxica contras as linhagens celulares avaliadas.

Estudos de bioprospecção relacionados com a caracterização química e biológica dos compostos presentes na secreção cutânea de anuros são de extrema relevância, podendo auxiliar no esclarecimento de questões taxonômicas, no desenvolvimento de novas drogas terapêuticas, além do entendimento da biologia dos anuros.

O presente trabalho é parte de um esforço para aumentar o nosso conhecimento acerca da diversidade de peptídeos antimicrobianos presentes nas secreções cutâneas de anuros da fauna do Cerrado brasileiro.

## ABSTRACT

Skin secretion of anurans are recognized as a rich source of several bioactive substances. An important group of such compounds are the antimicrobial peptides (AMPs). AMPs are components of the innate immune system present in the most living beings that have been awakened to an increasing interest, because they exhibit antimicrobial activity against a large array of microorganisms, being usually non-toxic for mammal cells. The aim of this study was the isolation, identification and characterization using MALDI-TOF mass spectrometry of AMPs from the cutaneous secretions of the anurans *Proceratophrys goyana*, *Physalaemus fuscumaculatus* and *Physalaemus centralis*, commonly found in the Brazilian Cerrado. It was also described the biological characterization of two synthetic versions of the *ceratoxin*-like peptide previously isolated and chemically characterized from the frog *Hypsiboas albopunctatus*.

The skin secretions were obtained by electrical stimulation, freeze-dried and stored at -20°C. Each crude secretion was fractioned by RP-HPLC on a C<sub>18</sub> column (Shim-pack CLC-ODS, 6.0 x 150 mm) using a HPLC system and employing a linear gradient of TFA 0,1% (v/v) in acetonitrile. The detection was monitored at 216 nm and the elution was performed at 1 mL/min. The eluted chromatographic fractions were manually collected and dried in vacuum. Meaningful differences in the chromatographic profiles of each species were observed. All eluted chromatographic fractions were tested for their cellular proliferation inhibition of pathogenic bacteria *S. aureus* (ATCC 25923) and *P. aeruginosa* (ATCC 27853), as also for their ability to promote lysis of human erythrocytes. The bioactive fractions were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry in order to evaluate their homogeneity and to determine the molecular masses of the major components present in each fraction. Antimicrobial peptides were identified in the three secretions under analysis.

The two synthetic versions of the *ceratoxin*-like peptide with Leu or Ile in the C-terminal region were evaluated for their inhibitory activity on the cellular proliferation of seven different Gram-positive and Gram-negative bacteria. The two versions of the *ceratoxin*-like peptide of *H. albopunctatus* exhibited strong antibacterial effects with MICs ranging from 2 to 8 µM. As several AMPs of large spectrum of action are also toxic to cancer cells, these two peptides were also tested against cervix cancer cell lineage (HeLa) and fibroblasts (NIH3T3). The results

indicated that the two peptides were cytotoxic for both tested cells (cancer and normal cells).

Bioprospective studies related to the chemical and biological characterization of the compounds present in the skin secretions of anurans are extremely relevant, as they can help clarifying taxonomy issues, on the development of therapeutic drugs, and also on the understanding of amphibian biology.

This work is part of an effort to increase our knowledge about the diversity of antimicrobial peptides present in the skin secretions of the anurans from the Brazilian Cerrado fauna.

# *1. Introdução*

---



# 1. INTRODUÇÃO

A classe *Amphibia* abrange três ordens: Anura (sapos, rãs e pererecas), Caudata (salamandras) e Gymnophiona (cecílias ou cobras-cegas) (Duellman & Trueb, 1994). Existem 6.435 espécies de anfíbios descritas em todo o mundo (Amphibian Species of the World <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>).

No território brasileiro, são 849 espécies descritas, das quais 821 pertencem à ordem Anura (Sociedade Brasileira de Herpetologia <http://www.sbherpetologia.org.br/>). Devido às adaptações comportamentais, fisiológicas e morfológicas, esses animais conseguiram estar presentes, tanto no ambiente terrestre como no aquático. A pele, uma de suas maiores adaptações, possui diversas funções, tais como: proteção contra abrasão, respiração cutânea, osmorregulação, termorregulação e secreção de substâncias protetoras (Colon *et al.*, 2009).

Devido à constante presença de microrganismos patogênicos, os organismos multicelulares apresentam um aparato de resistência chamado de imunidade inata (Rinaldi, 2002). Como a resposta imune patógeno-específica ocorre lentamente, a imunidade inata age como uma primeira linha de defesa, na qual há a produção de moléculas antimicrobianas pelas células epiteliais, atuando rapidamente e controlando o crescimento de um amplo espectro de microrganismos (Colon *et al.*, 2009). A defesa contra microrganismos patogênicos é importante porque a pele desses animais é um ambiente favorável para o crescimento de bactérias e fungos (Toledo & Jared, 1995). Existem dois tipos de glândulas na pele da maioria dos anfíbios: glândulas mucosas e glândulas granulosas.

As glândulas mucosas, menores e em maior número, são responsáveis por manter a pele úmida e escorregadia por meio da secreção de mucinas. As glândulas granulosas, por outro lado, são maiores e apresentam-se em menor número, as quais estão localizadas, principalmente, na parte dorsal da pele desses animais. As glândulas granulosas são responsáveis pela produção, armazenamento e liberação de moléculas bioativas, como peptídeos antimicrobianos (Colon *et al.*, 2009).

Os peptídeos antimicrobianos provenientes da secreção de anuros possuem algumas características em comum, tais como: apresentam entre 10 a 50 resíduos de aminoácidos, com um grande número de resíduos hidrofóbicos, usualmente exibem carga líquida positiva, conformação em  $\alpha$ -hélice anfipática, momento hidrofóbico alto e uma ampla face apolar em contraste com uma pequena face polar (Hancock & Chapple, 1999; Nascimento *et al.*, 2003). Estruturalmente, os peptídeos antimicrobianos são divididos em três grupos: (1) peptídeos anfipáticos lineares em  $\alpha$ -hélice e sem cisteínas (ex: *magaininas* e *dermaseptinas*), (2) peptídeos com uma ponte dissulfeto formando um *loop* C-terminal (ex: *brevininas* e *esculetinas*) e (3) peptídeos de 10 a 13 resíduos de aminoácidos (*temporinas*), primeiramente isolados da espécie *Rana temporaria*.

Acredita-se que as características físico-químicas, comuns aos peptídeos antimicrobianos de anuros, sejam essenciais para a sua ação na inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, assim como, protozoários (Magalhães *et al.*, 2008; Brand *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2005; Shai, 2002; Giangaspero *et al.*, 2001; Shai, 1999; Wieprecht *et al.*, 1997).

Dessa forma, a produção de peptídeos antimicrobianos em anuros participa do sistema imune inato, um mecanismo essencial de defesa em organismos multicelulares, cuja função é agir como a primeira barreira de proteção contra o ataque e proliferação de microrganismos patogênicos (Brown & Hancock, 2006).

O primeiro estudo acerca dos peptídeos antimicrobianos caracterizados a partir da secreção cutânea de anfíbios foi em 1987 por Zasloff. Estudando a espécie *Xenopus laevis*, o autor isolou, caracterizou e determinou a atividade antimicrobiana de dois peptídeos, nomeados de *Magainina 1* e *Magainina 2*. Desde então, já foram caracterizados centenas de peptídeos antimicrobianos, isolados a partir da secreção cutânea de várias espécies de anuros. Tais peptídeos possuem atividade contra um amplo espectro de patógenos microbianos e estão agrupados em, pelo menos, 26 famílias distintas (Antimicrobial Peptide Database <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

Todavia, a cada ano, são descobertos novos peptídeos com características estruturais únicas que acabam por constituir novas famílias, por exemplo, *tigerinas*, *pseudinas*, *maximinas*, *japonicinas*, *nigrocinas* e *distinctina* (Rinaldi, 2002).

## 1.1 Peptídeos antimicrobianos (PAMs): uma abordagem panorâmica

A descoberta da ocorrência de peptídeos antimicrobianos (PAM) e seu papel importante como efetores da defesa frente a patógenos microbianos foram enormemente motivados pelo surgimento e propagação da resistência múltipla aos antibióticos. Nas últimas duas décadas, tem merecido destaque as inúmeras pesquisas com os PAMs relacionadas com seu uso potencial na luta contra microrganismos multi-resistentes. A mais peculiar descoberta é a constatação de que PAMs estão presentes em múltiplas isoformas, com um conjunto comum de propriedades que permitem o seu agrupamento em famílias. Embora a importância desta descoberta levante questões intrigantes, algumas das quais sem resposta até o momento, a presença destas isoformas ajudou a identificar a importância da carga líquida e da hidrofobicidade como elementos fundamentais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas (Rotem & Mor, 2009).

Uma série de peptídeos “antibióticos” faz parte do sistema imune inato da maioria das espécies, desde plantas a mamíferos (Zasloff, 2002). Estes peptídeos possuem como principal alvo de interação os lipídeos das membranas celulares dos organismos (Papo *et al.*, 2003).

Esta ação pode envolver uma desestabilização das membranas plasmáticas, resultando em lise celular, através de mecanismos ainda não completamente descritos. A atividade dos peptídeos dirigida aos lipídios de membranas representa uma grande vantagem aos peptídeos antibióticos naturais, devido ao fato da composição lipídica dessas membranas serem altamente conservada durante a evolução dos organismos e apresentar diferenças significativas entre células procarióticas e eucarióticas (Zasloff, 2002).

Essa desestabilização das membranas biológicas tem sido considerada, por muitos, o mecanismo pelo qual os peptídeos antimicrobianos exercem sua função, agindo como detergentes, ou formando poros (Meincken *et al.*, 2005; Mecke *et al.*, 2005). No entanto, evidências sugerem que tal desestabilização pode ser apenas um dos mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos atuam (Sahl *et al.*, 2005). De qualquer forma, a interação entre os peptídeos antimicrobianos e as membranas biológicas alvo é, aparentemente, imprescindível para a ação destes.

Como consequência, a atividade lítica é independente de receptores na membrana, o que dificulta o desenvolvimento de mecanismos de resistência, conferindo a estes peptídeos um grande potencial para serem utilizados como substitutos de antibióticos convencionais. A procura por peptídeos que tenham a atividade antimicrobiana potencializada e que não sejam tóxicos às células de mamíferos tem aumentado significativamente nos últimos anos, em decorrência do aumento do número de cepas resistentes aos antibióticos convencionais (Powers & Hancock, 2003; Yeaman & Yount, 2003). Até o momento, uma série de peptídeos biologicamente ativos já foi isolada da secreção cutânea de diversos anfíbios anuros.

Nas últimas cinco décadas, a necessidade por novos antibióticos tem sido suprida, principalmente pelas modificações semi-sintéticas, a partir de novas moléculas descobertas em meados do século XX. Mais recentemente, os peptídeos antimicrobianos formadores de poros em membranas têm atraído muita atenção, como um novo tipo de antibiótico, porque a sua atividade antimicrobiana é induzida pela interação com a membrana da célula e, portanto, a resistência à droga seria dificilmente desenvolvida. Muitos microrganismos têm desenvolvido resistência, tanto contra os antibióticos de uso convencional já bem estabelecidos, quanto contra os antibióticos de última geração, causando graves problemas de saúde pública e muitos prejuízos econômicos. (Austin *et al.*, 1999).

O impacto da crescente resistência de microrganismos a medicamentos e a substâncias específicas tem movimentado vários grupos de pesquisa, assim como a indústria farmacêutica, para o desenvolvimento de novas drogas, que sejam capazes de lidar efetivamente com as estratégias de adaptação que esses

organismos elaboram, em face de todo o tipo de situação adversa. O surgimento da resistência a antimicrobianos é um exemplo clássico de evolução em resposta a uma forte pressão de seleção.

Hospitais e outros estabelecimentos constituem uma comunidade ecológica particular, na qual diversos tipos de micróbios circulam e interagem entre si diretamente, por meio da reprodução e da troca de plasmídeos, e/ou indiretamente, por meio de interações entre pacientes e funcionários. O corpo humano é um conhecido habitat de uma microbiota muito diversificada, composta de populações benéficas, populações prejudiciais à saúde e populações que vivem comensalmente, as quais exercem pouca influência sobre seu hospedeiro em condições normais.

A respeito dos microrganismos patogênicos, a maior preocupação é, sem dúvida, o elevado surgimento de cepas resistentes aos antimicrobianos disponíveis. Entretanto, os microrganismos comensais estabelecem um tipo de problema diferente daquele imposto pelos microrganismos patogênicos. Sob condições normais, eles vivem em locais como a pele ou o trato respiratório, causando pouco ou nenhum problema. Porém, quando transferidos para regiões estéreis, como a corrente sangüínea e os pulmões, eles podem ser maléficos e provocar sérios distúrbios na saúde do hospedeiro (Stewart *et al.*, 1998). Uma vez que os antimicrobianos são introduzidos para tratar os verdadeiros patógenos e não os comensais, vários fatores de transferência de resistência são assim disseminados e podem ser transmitidos a linhagens sensíveis, por meio do contato entre as células. Muitos fatores de virulência, como, por exemplo, os de *Staphylococcus aureus*, são carregados por plasmídeos e podem ser consignados entre diferentes linhagens. Sem dúvida, esse é o principal mecanismo para o rápido espalhamento de linhagens com resistência múltipla (Brock *et al.*, 1994).

Além disso, o problema da resistência introduz questões relacionadas com a duração e com a intensidade do tratamento, com as estratégias que envolvem o uso de várias drogas concomitantemente e com o rigor que deve ser obedecido por parte dos pacientes. Dessa forma, o uso de novas tecnologias para o desenvolvimento de drogas mais eficazes constitui uma estratégia promissora no campo da biotecnologia, uma vez que possibilitará a iniciativa de prospecção de novas classes

de moléculas naturais e/ou sintéticas, capazes de neutralizar ou de danificar o patógeno-alvo, ao invés de inviabilizá-lo geneticamente, inibindo assim o desenvolvimento da resistência (Heinemann *et al.*, 2000).

Atualmente, peptídeos antimicrobianos de origem animal vêm sendo utilizados como modelos para o desenho de novas drogas com aplicações nas áreas agrícolas e saúde. Para tanto, sequências anfifílicas de peptídeos vêm sendo desenhadas, sintetizadas e testadas *in vitro*, a fim de permitirem a obtenção de genes com potencial de resistência a fitopatógenos, bem como compostos ativos para a fabricação de drogas de amplo espectro de ação e de múltipla aplicabilidade (Castro *et al.*, 2006). Um exemplo dessa abordagem são os análogos sintéticos da *magainina* II, peptídeo proveniente da secreção da pele do anfíbio africano *Xenopus laevis*, que foram testados com sucesso na inibição da germinação de conídios de *Cryphonectria parasitica*, *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, e *Septoria musiva*, e que não provocaram nenhuma interferência detectável na germinação de pólen dos organismos hospedeiros, além de serem eficazes também contra as bactérias *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora* e *Pseudomonas syringae*. As diferenças significativas encontradas na sensibilidade entre os microrganismos e as células vegetais têm mostrado que tais peptídeos podem ser úteis como modelos para o desenho de genes de resistência (Powell *et al.*, 1995).

### 1.1.1. Estrutura e características dos peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos apresentam baixo peso molecular (> 5 kDa), com predominância de aminoácidos básicos, que lhes conferem uma carga líquida positiva (+2 a +9) em pH fisiológico, possuindo atividade antimicrobiana contra bactérias, vírus, fungos e protozoários. Esses peptídeos são, na maioria das vezes, anfipáticos, possuindo um domínio hidrofóbico e outro hidrofílico (Bulet & Stocklin, 2005), o que capacita a molécula a ser solúvel em ambiente aquoso e, também, em membranas lipídicas (Izadpanah & Gallo, 2005).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) estão amplamente distribuídos entre os seres vivos, incluindo bactérias, fungos, plantas, animais invertebrados e

vertebrados e possuem um importante papel na imunidade inata (Mookherjee & Hancock, 2007). Estas moléculas foram inicialmente isoladas da hemolinfa de insetos, pele de sapos e grânulos de neutrófilo humano e, atualmente, mais de 1000 PAMs já foram descritos (Tossi *et al.*, 2008).

Diversos estudos têm demonstrado que os PAMs, além da participação direta na eliminação dos patógenos, podem atuar como reguladores da resposta do sistema imune. Eles podem regular respostas inflamatórias, como por exemplo, aquelas desencadeadas por endotoxinas, tais como o lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas e suprimir a expressão de genes pró-inflamatórios e, assim, evitar a síndrome da inflamação sistêmica ou sepsis. Além disso, os PAMs podem induzir a produção de diferentes citocinas e quimocinas, agir como agente quimioatrativo para determinados tipos de células, como monócitos, neutrófilos, linfócitos T e eosinófilos, além de influenciar na diferenciação de células dendríticas imaturas. Dessa forma, os PAMs possuem, indiretamente, um papel no desenvolvimento dos linfócitos e disparo das respostas do sistema imune adaptativo (Mookherjee & Hancock, 2007).

Os PAMs são produzidos por vários tipos celulares e, geralmente, são expressos como pré-pró peptídeos, com liberação da molécula biologicamente ativa após processamento proteolítico. Em humanos, são produzidos por monócitos/macrófagos, neutrófilos, células epiteliais, queratinócitos e mastócitos (Mookherjee & Hancock, 2007). Em animais invertebrados, como os insetos, os PAMs podem ser encontrados no corpo gorduroso (órgão equivalente ao fígado humano), células da hemolinfa (sangue dos invertebrados) e epitélios do tubo digestório, sistema traqueal, entre outros (Bulet & Stocklin, 2005). Os peptídeos com atividade antimicrobiana produzidos por bactérias, na sua totalidade, parecem ser mais potentes que os produzidos por eucariotos, pois, na maioria dos casos, são ativos em baixas concentrações (Fimland *et al.*, 2005).

Mesmo possuindo uma grande variabilidade na estrutura e na natureza química, a maioria desses peptídeos antimicrobianos apresenta atividade antimicrobiana sobre as membranas da célula-alvo. O fato desses peptídeos antimicrobianos serem produzidos por microrganismos tem conduzido as pesquisas

a considerarem essas moléculas como “antimicrobianos naturais” e, assim, uma nova alternativa aos antimicrobianos sintéticos (Marshall & Arenas, 2003).

O desenvolvimento de novos antibióticos baseados nestes peptídeos pode ser um caminho para resolver o problema da resistência das bactérias aos antibióticos convencionais, uma vez que eles não possuem alvos específicos (Zasloff *et al.*, 2002).

Em geral, os PAMs são divididos em dois grupos principais (Bulet *et al.*, 2004):

- PAMs sem pontes dissulfeto

São peptídeos que não possuem resíduos de cisteínas e, não apresentam pontes dissulfeto em sua estrutura. Em solução aquosa ou ambiente que mimetize a membrana celular, costumam adotar uma estrutura de  $\alpha$ -hélice anfipática. Como exemplos, pode-se citar a *catelicidina* LL-37 (Johansson *et al.*, 1998), as cecropinas (Boman *et al.*, 1993) e as *magaininas* (Matsuzaki, 1999) (Figura 1).

Além dos peptídeos com estrutura em  $\alpha$ -hélice, existe outra subclasse de peptídeos lineares, que possuem predominância de um ou dois resíduos de aminoácidos, tais como prolina, arginina, triptofano, histidina e glicina. Entre estes, estão a *indolicidina* (Friedrich *et al.*, 2001), rica em triptofano (Figura 1) e as *histatinas* (Kavanagh & Dowd, 2004), ricas em histidinas.

- PAMs com pontes dissulfeto

São peptídeos que contêm um ou mais pares de cisteínas envolvidas na formação de pontes de dissulfeto intramoleculares. Os PAMs podem apresentar as suas extremidades amino- e carboxi-terminais abertas ou fechadas e podem formar estruturas, tais como grampos tipo  $\beta$ , folhas  $\beta$ -pregueadas, ou uma mistura de  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ -pregueadas. Entre os exemplos mais conhecidos, estão as  $\alpha$ -e  $\beta$ -



*defensinas* (Selsted *et al.*, 1985) (Figura 1), as *protegrinas* (Fahrner *et al.*, 1996) (Figura 1) e a *gomesina* (Silva *et al.*, 2000; Mandard *et al.*, 2002).

- Outros tipos de PAMs

Ainda existem outros PAMs com características peculiares, com seus conteúdos derivados da hidrólise parcial de uma proteína precursora maior.

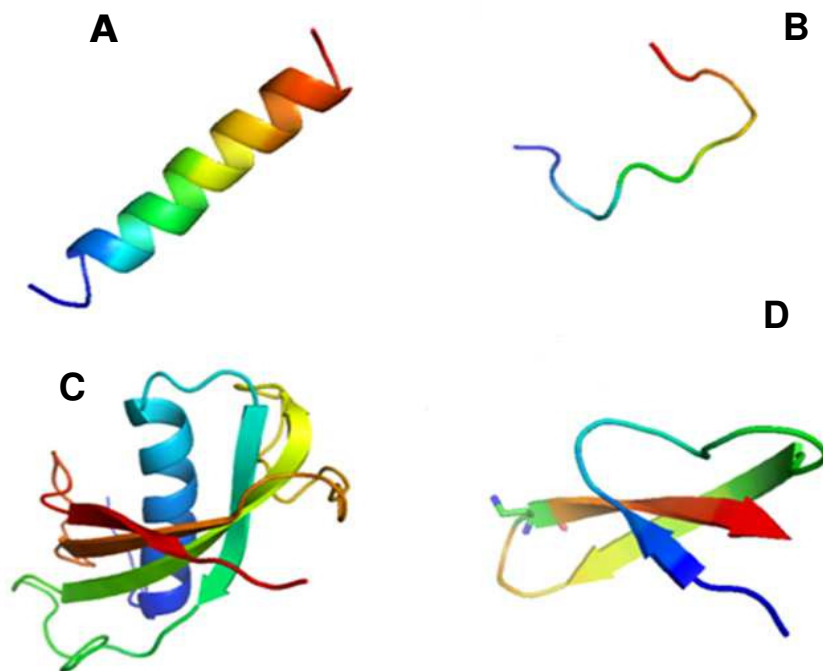


Figura 1. Exemplos de estruturas tridimensionais de peptídeos antimicrobianos: PAMs lineares: (A) Estrutura em  $\alpha$ -hélice da *magainina*; (B) Forma estendida da *indolicidina*. PAMs cíclicos: (C) Estrutura enovelada da *protegrina*; (D) Estrutura folhas  $\beta$ -pregueadas das *defensinas*.

### 1.1.2. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos

Muitos peptídeos antimicrobianos ligam-se às membranas negativamente carregadas permeabilizando-as, o que resulta na formação de uma via para a movimentação de íons, solutos e do próprio peptídeo (McElhaney & Prenner, 1999). A ação dos peptídeos antimicrobianos induz defeitos na membrana, como por exemplo, a separação de fase ou afinamento da membrana, formação de poros, promoção da estrutura lipídica não-lamelar ou o rompimento da bicamada,

dependendo das propriedades dos peptídeos e dos lipídeos envolvidos (Lohner & Prenner, 1999).

Segundo Subbalakshmi & Sitaram (1998), alguns peptídeos antimicrobianos podem atingir moléculas intracelulares, como o DNA ou enzimas, desde que sejam capazes de atravessar as membranas bacterianas internas e externas. Sabe-se que a natureza hidrofóbica e catiônica dos peptídeos é importante para a interação inicial entre o peptídeo e a membrana bacteriana (Hancock & Chapple, 1999).

Além da cationicidade, os PAMs freqüentemente adotam uma estrutura anfipática caracterizada por uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, separadas espacialmente. Os mecanismos de ação dos PAMs ainda não são totalmente conhecidos, porém, sabe-se que o seu caráter catiônico (devido ao alto teor dos aminoácidos básicos arginina e/ou lisina, reforçado pela freqüente presença da amidação C-terminal), e a sua tendência à anfipaticidade facilita sua interação com a superfície celular de bactérias e inserção na membrana (Castro *et al.*, 2009).

As interações eletrostáticas entre os PAMs e a superfície celular de bactérias são facilitadas pela presença de fosfolipídios com carga líquida negativa na face externa da membrana, grupos fosfato de moléculas de LPS e ácidos teicóicos. A membrana citoplasmática de células de mamíferos, ao contrário das de bactérias, apresenta, na sua face externa, uma predominância de fosfolipídios com carga líquida neutra, o que contribui para que a ação de diversos PAMs seja seletiva para membrana de bactérias (Zasloff, 2002; Brogden, 2005).

A anfipaticidade dos PAMs facilita a sua inserção na membrana através da interação de sua região hidrofóbica com a região hidrofóbica dos fosfolipídios de membrana e, como consequência, podem ocorrer permeabilização da membrana, vazamento de conteúdo intracelular e morte do patógeno (Brogden, 2005; Hancock & Sahl, 2006; Yount *et al.*, 2006).

Outra característica peculiar dos PAMs está em provocar a morte celular a partir da lise da membrana em virtude de alterações nas propriedades e no balanço osmótico celular. Isso levou a crer, durante muitos anos, serem essa a única

maneira pela qual os PAMs provocavam morte celular. No entanto, novos estudos apontavam para outros mecanismos cujos alvos seriam intracelulares (Park et al., 1998; Morton et al., 2007).

A composição da membrana está diretamente relacionada com o modo como tais peptídeos interagem com a mesma, sendo o ponto principal da seletividade dos peptídeos antimicrobianos. A membrana plasmática de organismos procariontes e eucariontes difere em sua composição, tanto no conteúdo de fosfolipídios, como na presença de outros componentes, tais como esteróides. Além disso, as membranas bacterianas caracterizam-se por serem organizadas de tal forma que a face externa da bicamada lipídica, voltada para o meio extracelular, possui alto conteúdo de fosfolipídeos carregados negativamente, enquanto a mesma face da membrana plasmática dos animais é composta majoritariamente por fosfolipídeos neutros, como fosfatidilcolina e esfingomiéline, estando os fosfolipídeos aniônicos, como fosfatidilserina e fosfatidilglicerol, voltados para o interior da célula (Hancock & Lehrer, 1998; Matsuzaki *et al.*, 1998). Este parece ser o principal motivo pelo qual a maioria dos PAMs caracterizados até o momento consegue diferenciar células procarióticas e eucarióticas (Yeaman & Yount, 2003).

Dos PAMs estudados até o momento, poucos apresentam toxicidade acentuada frente células de mamíferos, e essa seletividade dos PAMs por microrganismos, ao invés de células do hospedeiro, parecem resultar, além do alto conteúdo de fosfolipídios aniônicos na superfície externa da membrana plasmática, também da ausência de colesterol nas membranas de bactérias (Hancock & Lehrer, 1998). A presença de colesterol na membrana normalmente reduz a atividade dos PAMs, devido a uma maior estabilização da bicamada lipídica e/ou a possíveis interações entre o colesterol e os PAMs (Matsuzaki *et al.*, 1998).

A capacidade de agregação também pode estar relacionada com a seletividade, uma vez que peptídeos que permanecem em estado monomérico parecem não ter atividade hemolítica (Bechinger & Lohner, 2006). Muitos PAMs apresentam modo de ação variável, dependendo das condições nas quais se encontram. Vários fatores precisam ser considerados na descrição de interações entre peptídeos e membranas: a relação peptídeo/lipídio, a composição da

membrana, temperatura, hidratação e composição do tampão são essenciais para uma interpretação correta desse tipo de interação (Bechinger & Lohner, 2006).

Entretanto, estudos recentes indicam que a perturbação da parede ou membrana não seria o único mecanismo de ação desses peptídeos. Alguns PAMs podem ser translocados para o interior do microrganismo e agir sobre alvos intracelulares, podendo interferir em várias vias metabólicas, como na formação do septo na membrana plasmática, inibição da biossíntese de parede celular, de ácidos nucleicos, de proteínas ou inibição da atividade de enzimas bacterianas, além de outros mecanismos que também podem levar à inibição do crescimento e morte do microrganismo (Kragol *et al.*, 2001; Brogden, 2005).

Alguns modelos sugerem que o mecanismo de ação destes peptídeos ocorra através da interação eletrostática com os fosfolípidos aniônicos da membrana plasmática e lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular, no caso de bactérias Gram-negativas. Após interação, ocorre a permeabilização da membrana bacteriana através de diferentes vias.

Em relação à estrutura primária, diversos estudos vêm demonstrando, principalmente com *dermaseptinas*, (isolados da secreção cutânea do anfíbio *phyllomedusa sp*) que a composição de aminoácidos e sua localização na sequência influenciam diretamente na potência e seletividade desses peptídeos. Deleções, inversões, e substituições provocam alterações, tanto nas concentrações necessárias para a atividade de um determinado peptídeo, como na sua citotoxicidade (Krugliak *et al.*, 2000). As representações a seguir ilustram alguns modelos que buscam descrever o modo de ação de PAMs considerando como alvo membranas plasmáticas.

### 1.1.3. Modelos dos mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos

#### 1.1.3.1. Modelo *barrel-stave*

O mecanismo de ação do modelo *barrel-stave*, proposto inicialmente para o peptídeo *alameticona*, do fungo *Thichoderma viride*, consiste basicamente em peptídeos na forma monomérica que se aderem à membrana celular e se inserem na mesma. Os monômeros inseridos unem-se de modo a circundar um poro aquoso (Figura 2), o qual pode ter seu tamanho aumentado na proporção em que mais monômeros são inseridos na membrana, até o momento em que haverá o vazamento do conteúdo celular e, conseqüentemente, a morte celular (Oren *et al.*, 1999). O modelo *barrel-stave* é aplicado mais comumente para peptídeos citolíticos de células bacterianas e de mamíferos (Conlon *et al.*, 2007).

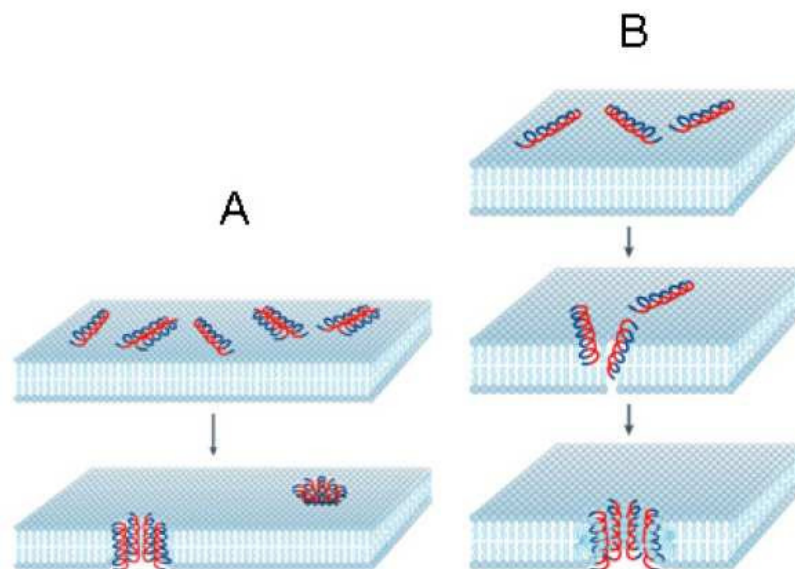


Figura 2. (A) Representação esquemática do modelo *barrel-stave*. 1) Os peptídeos se ligam à membrana plasmática tomando a conformação de  $\alpha$ -hélice. 2) Ligação de mais peptídeos à membrana. 3) Inserção das hélices na bicamada lipídica. 4) Recrutamento de mais monômeros para aumento do poro. 5) Vazamento do material citoplasmático, seguida da morte celular. (B) Esquema do modelo do poro toroidal onde os peptídeos se intercalam aos fosfolípidios para formar o poro. O azul das hélices (peptídeos) representa a face hidrofílica e o vermelho a hidrofóbica (Retirado de Brogden, 2005).

### 1.1.3.2. Modelo do poro toroidal

Outro modelo proposto é do poro toroidal. Neste, os PAMs podem atuar formando poros juntamente com lipídios presentes na membrana, onde estes últimos facilitam a estabilização dos poros, uma vez que reduzem a repulsão eletrostática existente entre peptídeos positivamente carregados. A formação de poros é dirigida por interações hidrofóbicas; após o início desse processo, mais monômeros são recrutados, o que evidencia o aumento do poro.

Poucos poros são necessários para desestabilizar a membrana, fato que explica a atividade de vários PAMs em concentrações micromolares (Shai, 2002). Este tipo de poro transmembrânico é induzido pelas *magaininas*, *protegrinas* e *melitinas* (Brogden, 2005).

### 1.1.3.3. Modelo *carpet-like*

O modelo *carpet-like* (Figura 3) é utilizado para evidenciar o modo de ação de várias famílias de peptídeos antimicrobianos, inclusive as *dermaseptinas*. A permeabilização da membrana é iniciada com a ligação dos peptídeos, carregados positivamente, a regiões negativas presentes na camada fosfolipídica. A orientação dos peptídeos de modo que sua face hidrofóbica fique em contato com a parte lipídica e a face polar em contato com os grupos carregados dos fosfolipídios, provoca uma curvatura na bicamada lipídica.

Após uma determinada concentração peptídica ser atingida, acontece a permeabilização e desestabilização da membrana; durante este processo, vários poros temporários atuam no colapso da mesma. Este modelo é utilizado principalmente para explicar o modo de ação de peptídeos não-hemolíticos, isto é, altamente seletivos (Shai, 2002). A *ovispirina* é um outro exemplo de PAM com este tipo de ação (Brogden, 2005).

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

aquosa, peptídeos altamente hidrofóbicos formam micelas ou agregados que, ao entrarem em contato com fosfolipídios de membranas, removem pedaços dessa membrana, resultando no aparecimento de estruturas semelhantes a poros, sendo esse efeito dependente da concentração do peptídeo (Bechinger & Lohner, 2006).

Existem relatos que alguns peptídeos, como, por exemplo, a *magainina* e a *alameticona*, assumem orientação perpendicular após a concentração de 3,3 mol%, não mais estando na conformação paralela à membrana (Beggin & Sansom, 1999; Bechinger, 1999).

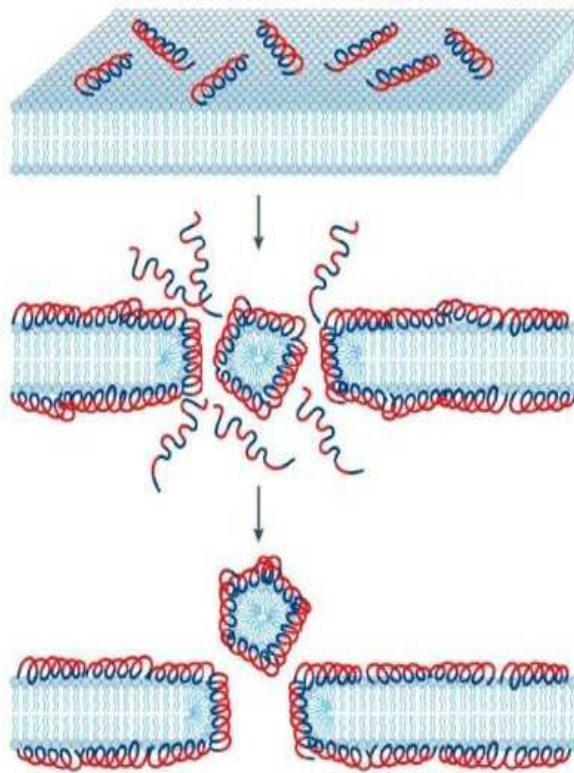


Figura 3. Representação do modelo *carpet-like*. 1) Ligação dos peptídeos aos fosfolipídios da membrana. 2) Alinhamento dos monômeros de peptídeo de modo que os resíduos hidrofóbicos fiquem em contato com as cabeças dos fosfolipídios. 3) Reorientação dos peptídeos para o centro hidrofóbico da membrana. 4) Desintegração da membrana devido a quebra da curvatura (Retirado de Brogden, 2005).

#### 1.1.3.4. Modelo Shai-Matsuzaki-Huang

Este modelo (Figura 4) é caracterizado pelas moléculas de peptídeos que aderem à face extracelular da membrana plasmática, tensionando-a e reduzindo a sua espessura, de modo a formar poros transitórios. Neste modelo, algumas moléculas de peptídeos podem atravessar os poros, alcançando a face interna da membrana e outros elementos intracelulares (Zasloff, 2002).

Geralmente, peptídeos que atuam por esse mecanismo são letais para os microrganismos em concentrações da ordem de micromolar (Zasloff, 2002). Independente do mecanismo de ação, uma despolarização letal da membrana bacteriana, a formação de poros que provocam o extravasamento do conteúdo celular, a ativação de processos letais como a indução de hidrolases (enzimas) que degradam a membrana, a desorganização da distribuição de lipídeos na membrana que resulta na perturbação do funcionamento normal da membrana e causam danos a alvos intracelulares após a entrada do peptídeo na célula, resultam na lise da célula bacteriana (Apponyi *et al.*, 2004; Zasloff, 2002).

Estudos sobre o mecanismo de ação dos peptídeos aniônicos ainda são escassos na literatura. Um estudo mais aprofundado foi realizado com os derivados da dermicidina por Steffen e colaboradores (Steffen *et al.*, 2006). Os autores demonstraram que estes PAMs formam poros ou desestabilizam as membranas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Também foi observado que os derivados da dermicidina ligam-se à superfície de *S. aureus* e formam aglomerados de peptídeos em pontos específicos, o que, segundo os autores, pode ser um indicativo da presença de receptores específicos na membrana.



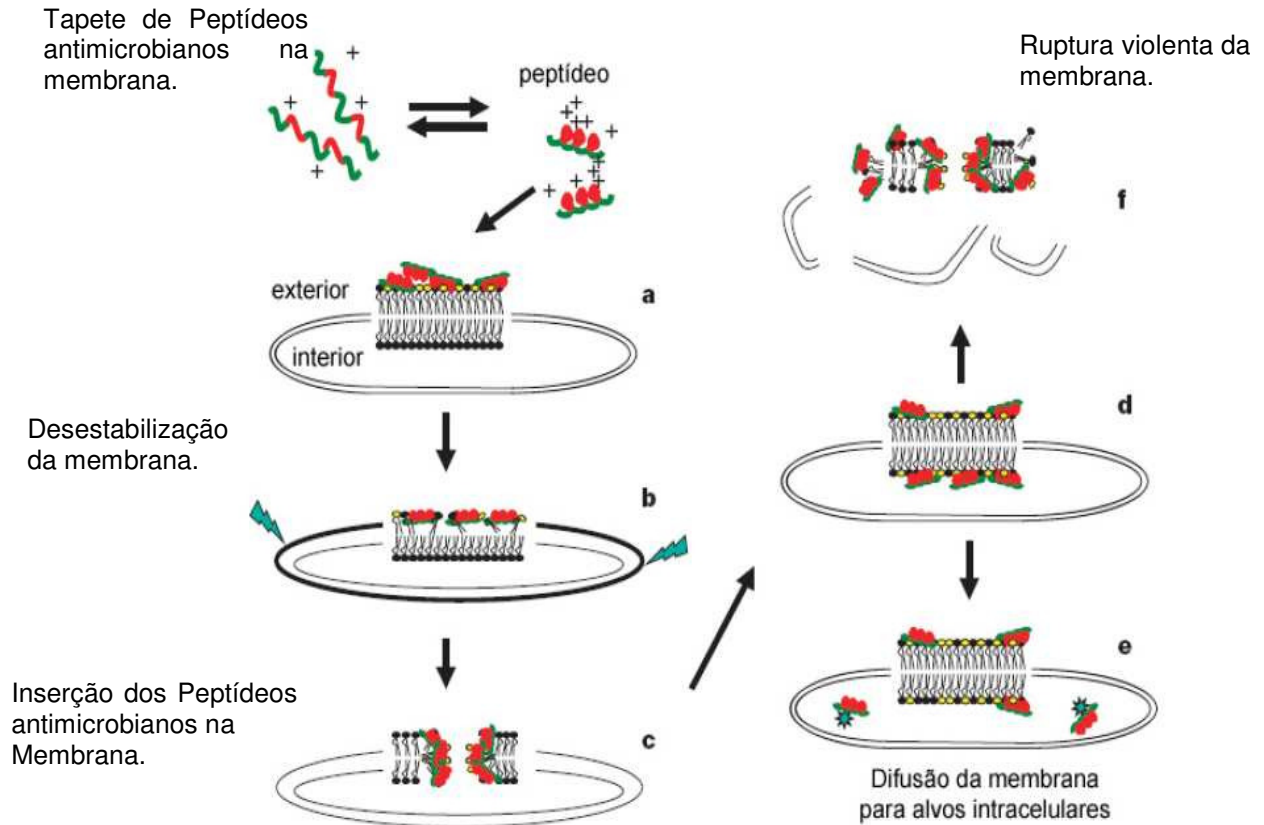


Figura 4. Esquema do modelo *Shai-Matsuzaki-Huang*. a) Formação de um carpete de peptídeos na camada externa da membrana. b) Integração do peptídeo à membrana e afinamento da camada externa. c) Formação de poros transitentes. d) Transporte de lipídios e peptídeos para a camada interna. e) Difusão dos peptídeos para alvos intracelulares (em alguns casos). f) Colapso da membrana em fragmentos. (Modificado de Zasloff, 2002).

#### 1.1.4. A diversidade de PAMs

A diversidade de PAM é tão acentuada, que se torna difícil categorizá-los, exceto baseando-se em suas estruturas secundárias. O princípio estrutural fundamental subjacente a todas as classes de PAMs consiste da habilidade da molécula em adotar uma forma, na qual grupamentos de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos estão espacialmente organizadas em setores da molécula, formando um *design* anfipático. Peptídeos lineares, como a *cecropina*, isolada de mariposa, e a *magainina*, de anuros, adotam esta organização somente no momento da interação com a membrana, quando estes assumem uma estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice (Bechinger *et.al.*, 1993).

Já peptídeos como a *bactenecina*, de neutrófilos bovinos, e as *defensinas*, encontradas em uma grande variedade de organismos, assumem uma estrutura relativamente rígida em  $\beta$ -folha antiparalela, mantida por pontes de dissulfeto, em torno da qual organizam-se grupos de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos (Bulet *et al.*, 2004).

Uma grande família de PAMs também pode ser caracterizada pela predominância de um ou dois aminoácidos particulares, como a *indolicina* de neutrófilos bovinos, rica em resíduos de triptofano, (Agerberth *et al.*, 1991; Selsted *et al.*, 1992). Alguns peptídeos podem ainda ser derivados da proteólise de proteínas maiores, como a *buforina* II da histona 2A (Ulvatne & Vorland, 2001; Lee *et al.*, 2003; Gifford *et al.*, 2005).

De maneira geral, a maioria dos PAMs descritos atualmente deriva de precursores maiores que incluem uma sequência sinal, importante para seu direcionamento ao retículo endoplasmático rugoso. Modificações pós-traducionais levam à remoção proteolítica do peptídeo sinal e podem incluir também, em alguns casos, glicosilação, amidação carboxi-terminal e isomerização aminoacídica (Simmaco *et al.*, 1998).

A maioria dos organismos multicelulares expressam uma mistura de peptídeos múltiplos das várias classes estruturais citadas nos seus tecidos de defesa, e a diversidade entre os diferentes PAMs é tão significativa, que a mesma sequência do peptídeo raramente é encontrada em duas espécies de animais diferentes, mesmo estes sendo muito próximos. Entretanto, podem ser reconhecidas, tanto entre PAMs de uma mesma espécie, quanto de diferentes grupos de organismos, sequências de aminoácidos significativamente conservadas, o que as classifica dentre os diferentes grupos de PAMs (Simmaco *et al.*, 1998).

Diversos autores sugerem que essa significativa diversidade entre os diferentes PAMs caracterizados até o momento deve-se a mutações pontuais que, em alguns casos, podem alterar drasticamente sua atividade biológica e reflete, provavelmente, a adaptação das diferentes espécies a um ambiente microbiano particular que caracteriza o nicho por elas ocupado (Boman, 2003).

Nos últimos anos, vem surgindo também uma grande variedade de PAMs produzidos sinteticamente com o objetivo de criar peptídeos com características desejáveis, como uma aumentada taxa de seletividade contra células microbianas, maior resistência à degradação por proteases ou ainda a produção de partes menores, a partir de peptídeos complexos, mais facilmente sintetizados para produção em larga escala (Castro *et al.*, 2006).

#### 1.1.5. Aplicações dos peptídeos antimicrobianos

O crescente problema de resistência dos microrganismos aos antibióticos convencionais tem estimulado a busca por novas drogas para combate às infecções. Bactérias, tais como *S. aureus*, tornaram-se resistentes à penicilina e a sulfonamidas no início da década de 40 (Domin, 1998). Na década de 70, elas tornaram-se resistentes à meticilina, e, mais recentemente, à vancomicina (Miranda *et al.*, 2008). Estima-se que três milhões de pacientes irão adquirir infecções hospitalares e destas, 50-60% envolverão bactérias resistentes a antibióticos (Miranda *et al.*, 2008). A busca por novos fármacos, portanto, torna-se emergencial e, nesse sentido, os PAMs representam uma classe promissora para o desenvolvimento de drogas alternativas. Estudos da relação estrutura-função destas moléculas têm permitido o desenho de moléculas com alta especificidade para patógenos, baixa toxicidade para células eucarióticas e estabilidade no soro (Miranda *et al.*, 2008). Os PAMs, além de sua capacidade antimicrobiana direta, podem também atuar como moduladores do sistema imune (Mookherjee & Hancock, 2007).

Outras aplicações incluiriam a utilização destas moléculas para impedir a colonização e o crescimento de microrganismos em materiais poliméricos sintéticos, tais como os cateteres intravenosos de uso médico. Já foi demonstrado que a *magainina* liga-se covalentemente a esferas poliméricas insolúveis e impede o crescimento bacteriano (Zasloff, 2002).

Alguns exemplos de PAMs em desenvolvimento para uso clínico são os derivados da *magainina* (MSI-78; *Pexiganan*), para tratamento da úlcera de diabéticos; os derivados da *protegrina* (IB-367; *Isegranin*), para tratamento de

inflamações nas mucosas, infecções respiratórias em pacientes com fibrose cística e prevenção de pneumonia; e um derivado da *indolicidina* bovina, para tratamento de pacientes com hepatite C crônica e doenças dermatológicas (Miranda *et al.*, 2008 Hancoch & Sahl, 2006).

Ainda existem outros estudos relacionados a antimicrobianos, como os peptídeos ativos de anuros, onde a maioria dos peptídeos das secreções apresenta múltiplas funções. Por exemplo, o neuropeptídeo *caeruleina*, presente em *Leptodactylus labyrinthicus*, contrai e relaxa músculo liso, afetando a pressão sanguínea e é um potente analgésico (Pukala *et al.*, 2006). Foi relatado também que a *magainina*, a *temporina*, a *dermaseptina* e a *bombinina*, todas isoladas de anuros, além do híbrido *cecropina-melittina*, podem causar a morte de diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* através de um processo que envolve o rompimento de sua membrana plasmática, resultando na lise osmótica da célula (Diaz-Archirica *et al.*, 1998).

Outro exemplo que merece destaque é o da *gomesina*, um PAM presente na hemolinfa da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*. A *gomesina* apresenta atividade antiparasitária contra o agente etiológico da doença de Chagas *Trypanosoma cruzi*, os agentes etiológicos da leishmaniose *Leishmania amazonensis* e *L. major* (Silva *et al.*, 2000; Burgierman *et al.*, 2002) e *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária.

Os PAMs de humanos pertencentes às classes das  $\alpha$  e  $\beta$ -*defensinas*, *catelicidinas* e *histatinas* são ativos contra diferentes espécies de microrganismos, incluindo bactérias resistentes a antibióticos de uso clínico (De Smet & Contreras, 2005). Podemos ainda citar a *cecropina* de insetos e as *protegrinas* que atuam sobre bactérias, fungos e vírus (Jenssen *et al.*, 2006).

Já os peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias estão sendo objeto de várias pesquisas, devido ao seu potencial na preservação dos alimentos. E, ainda, são ótimos candidatos para resolver o problema da resistência dos microrganismos patogênicos aos antimicrobianos convencionais. Até o presente momento, somente a *nisina* (comercialmente disponível), dentre as bacteriocinas,

tem alcançado aceitação comercial para serem utilizadas em algumas aplicações, como em queijos, produtos com ovos, vegetais, produtos lácteos pasteurizados e em molhos para saladas (Papagianni, 2003).

As bacteriocinas têm apresentado um bom potencial na bioconservação de carnes, alimentos crus, peixes, bebidas alcoólicas, vegetais fermentados (O'Sullivan *et al.*, 2002; Chen & Hoover, 2003). Estudos de várias outras bacteriocinas têm gerado resultados promissores para a sua utilização industrial (Diep & Nes, 2002).

Outros peptídeos produzidos por bactérias ainda apresentam atividade antiviral e potencial para serem utilizados como imunossuppressores. Existem alguns com propriedades similares aos detergentes, tendo assim um ótimo potencial para o uso como emulsificante nas formulações de drogas e como promotores da absorção de drogas (Diep & Nes, 2002).

A ausência de toxicidade de alguns peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias e a sua atividade contra patógenos Gram-positivos conduzem ao seu possível uso em aplicações clínicas. Além disso, o fato de alguns desses peptídeos serem ativos contra uma variedade de patógenos multi-resistentes faz deles uma opção atrativa para serem utilizados como agentes terapêuticos no lugar das drogas convencionais. Testes *in vivo* com modelo animal já demonstraram o sucesso de alguns peptídeos antimicrobianos no tratamento de infecções causadas por *S. pneumoniae* (Goldstein *et al.*, 1998) e no tratamento de infecções por *S. aureus* resistente à metilina (Niu & Neu, 1991; Kruszewska *et al.*, 2004).

## 1.2. Câncer

Estudos epidemiológicos durante as últimas décadas têm demonstrado que a incidência e mortalidade por câncer variam significativamente entre as diferentes regiões do mundo (Stewart & Coates, 2005; Kelloff *et al.*, 2000). Apesar dos recentes avanços na terapia do câncer, a doença continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado

(maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (Almeida *et al.*, 2005).

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele porque a pele é formada de mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, é chamado de sarcoma. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástases). Embora o câncer localizado possa ser tratado por cirurgia ou radioterapia, a quimioterapia ainda é o tratamento de escolha para os casos mais graves. No entanto, os convencionais agentes quimioterápicos, que agem contra a alta proliferação células através da inibição da síntese de ácidos nucleicos, induzem indesejáveis efeitos colaterais (Almeida *et al.*, 2005). A terapia ainda é complicada devido à resistência adquirida de tumores por quimioterápicos (Dennison *et al.*, 2006;. Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

### 1.2.1. Desencadeamento do câncer

As causas do câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são derivadas de oncogenes hereditários. Os outros cânceres envolvem alterações ou danos no material genético das células que são acumulados ao longo do tempo (AICR, 2007).

Devido a uma série de alterações genéticas e epigenéticas, uma vasta combinação de mutações terminam por desencadear outras patologias, tornando a cura do câncer um importante desafio para a medicina (Weinberg, 2006). Cerca de 5 a 10% dos cânceres são geneticamente pré-determinados e estão ligados à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (Brandão *et al.*2010).

De todos os casos, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais. Alguns deles são bem conhecidos: o cigarro pode causar câncer de pulmão, a exposição excessiva ao sol pode causar câncer de pele, e alguns vírus podem causar leucemia. Outros estão em estudo, como alguns componentes dos alimentos que ingerimos, e muitos são ainda completamente desconhecidos. As mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, os hábitos e o estilo de vida adotados pelas pessoas podem determinar diferentes tipos de câncer (AICR, 2007).

O envelhecimento traz mudanças nas células que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna. Isso, somado ao fato de as células das pessoas idosas terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco para o câncer, explica em parte o porquê de o câncer ser mais freqüente nesses indivíduos. Os fatores de risco ambientais de câncer são denominados cancerígenos ou carcinógenos. Esses fatores atuam alterando a estrutura genética (DNA) das células. O surgimento do câncer depende da intensidade e duração da exposição das células a os agentes causadores de câncer (AICR, 2007).

Em geral, o desenvolvimento do câncer ocorre lentamente, podendo formar apenas um tumor, após muitos anos, à exposição ao agente carcinogênico. Esse processo é dividido em três estágios principais: a iniciação, a promoção e a progressão (Figura 5). No estágio de iniciação, as células apresentam alterações genéticas em decorrência da exposição ao agente carcinogênico; no entanto, ainda não é possível identificar o tumor clinicamente. No estágio de promoção, a célula afetada inicia, lentamente, o processo de transformação maligna caracterizado pela expressão de oncogenes. Por fim, o estágio de progressão caracteriza-se pela proliferação descontrolada e irreversível das células, formando uma massa tumoral

no local. Nesse último estágio, algumas células podem entrar em metástase, ou seja, invadir a corrente sanguínea e se instalar em outros tecidos do organismo (Brentani *et al.*, 2003).

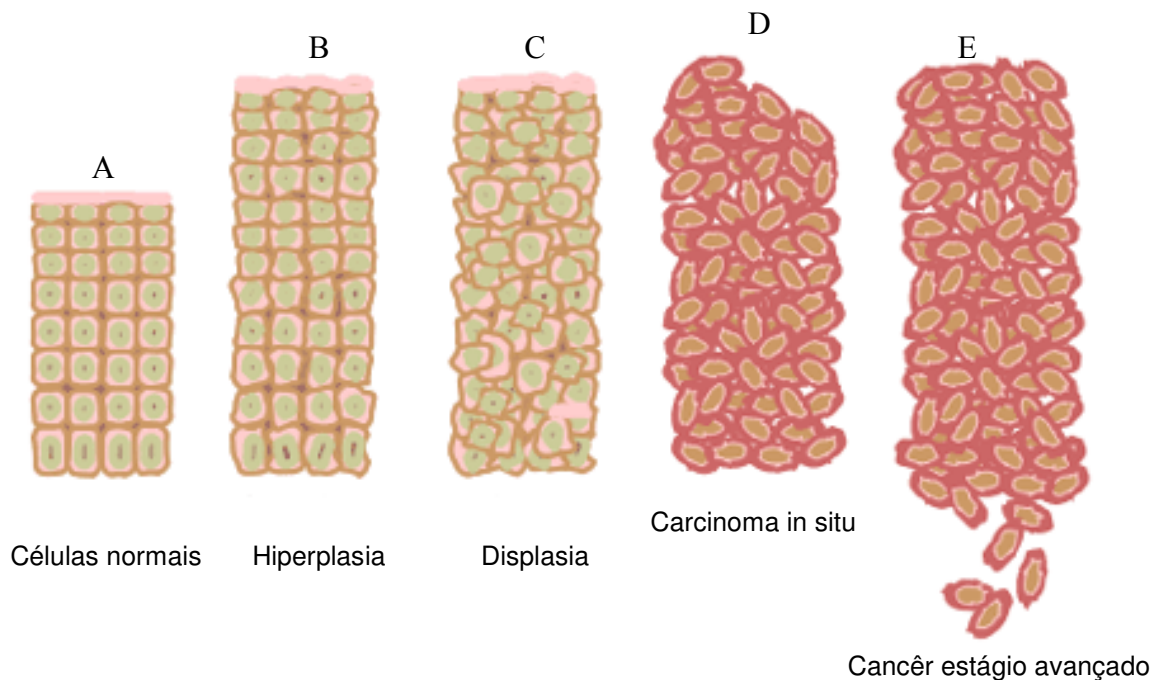


Figura 5. Estágios de progressão do câncer: (A). Células normais; (B). Estágio de Iniciação: mutação genética. (C). Promoção: transformação maligna da célula; (D). Progressão: proliferação celular descontrolada. (E). Estágio de Câncer avançado. (Imagem retirada do Instituto Nacional do Câncer - <http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind/cancer/cancer01.htm>).

### 1.2.2. Peptídeos anticarcinogênicos (PACs)

O recente desenvolvimento de tratamentos à base de peptídeos antimicrobianos (PAMs) emergiu como uma nova estratégia à terapia do câncer. O tratamento é bastante viável, pelo fato dos peptídeos serem altamente específicos para os seus alvos e apresentarem baixa toxicidade, boa penetrabilidade nos tecidos, devido aos seus tamanhos reduzidos, atuarem rapidamente, não estimularem o aparecimento de resistência pelas células, apresentarem sinergismo com quimioterápicos clássicos, possuírem atividade em amplo espectro, serem capazes de destruir tumores primários, além de prevenir metástase (Shadidi & Sioud, 2003; Bhutia & Maiti, 2008; Hoskin & Ramamoorthy, 2008).



Pesquisas recentes revelaram que muitos peptídeos antimicrobianos apresentavam atividade anticarcinogênica, sendo denominados de peptídeos anticarcinogênicos (PACs). Esses peptídeos possuem um papel importante na imunidade inata de diversos organismos, além do recente surgimento de evidências de que eles também modulam a imunidade, afetando infecções e inflamações. Estudos sugerem que a atividade antitumoral desses peptídeos surge primariamente da interação com a membrana plasmática das células ou com a membrana mitocondrial (Dennison *et al.*, 2006).

De acordo com o espectro de atividade, os peptídeos antimicrobianos são divididos em dois grupos: O primeiro grupo inclui peptídeos que são extremamente potentes contra bactérias e células de câncer, mas que não afetam células normais de mamíferos (ex: *magaininas*). O outro grupo é formado por peptídeos tóxicos para bactérias, células tumorais e normais de mamíferos (ex: *melittina*). No entanto, é bom ressaltar que nem todos os peptídeos antimicrobianos apresentam atividade antitumoral (Papo & Shai, 2005).

Um número diversificado de organismos produzem peptídeos anticarcinogênicos (PACs); no entanto, a maior fonte destes peptídeos (por exemplo, *magaininas*, *dermaseptinas*, *gaegurinas*, *aureinas* e *citropinas*) é a partir da secreção cutânea de anuros. Pesquisas revelam que muitos anfíbios possuem secreções glandulares que contêm pelo menos um peptídeo antimicrobiano de amplo espectro, juntamente com outros que apresentam um espectro limitado de atividade contra uma ou poucas bactérias. Muitos desses peptídeos antimicrobianos de amplo espectro de ação apresentam a porção C-terminal amidada e também exibem atividade anticâncer, como é o caso do *Hypsiboas albopunctatus*, alvo de estudo no presente trabalho. Essa dupla função (atividade antimicrobiana e anticancerígena) sugere que o mecanismo de ação de ambas as atividades é similar (Pukala *et al.*, 2006).

Na literatura, existem relatos (Libério *et al.*, and 2011; Van Zoggel *et al.*, 2010) de que alguns peptídeos antimicrobianos (PAMs) de amplo espectro também apresentaram atividade anticancerígena. Dentro dos estudos realizados pelo nosso grupo, pode-se citar a atividades anti-proliferativa e citotóxica sobre células de

melanoma murino da *pentadactylina*, um peptídeo composto por 25 resíduos de aminoácidos e também ativo contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas (Libério *et al.*, 2011). A *pentadactylina* foi originalmente isolada da rã *Leptodactylus pentadactylus* por King e colaboradores em 2005 e também detectada por nosso grupo na rã sul-americana *Leptodactylus labyrinthicus*.

### 1.2.3. Mecanismos de ação dos peptídeos carcinogênicos (PACs)

#### A) Processos apoptóticos na célula

A apoptose é um processo biológico de morte celular, essencial para a homeostase de um organismo. Também está envolvida na maquinaria de defesa do sistema imune e tem um papel fundamental na proteção do organismo contra a carcinogênese (Fesik, 2005; Ghobrial *et al.*, 2005; Jin & El-Deiry, 2005). Consiste na autodestruição programada e controlada de uma célula, mediante um estímulo de morte celular (dano no material genético ou restrição energética, por exemplo). Em um sistema vivo, os fragmentos celulares são fagocitados por células próximas sem causar reações inflamatórias no local (Okada & Mak, 2004).

A célula apoptótica tem como algumas características a perda do volume, condensação da cromatina, degradação do DNA e formação de corpos apoptóticos (fragmentos celulares envoltos por membrana plasmática) (Majno *et al.*, 1995). Essas alterações ocorrem em função da regulação de vias de transdução de sinal envolvendo proteínas anti- e pro-apoptóticas, seguida pela degradação proteolítica de componentes celulares (Youle *et al.*, 2008). As caspases são as principais enzimas participantes do processo de ativação da apoptose. Elas clivam substratos vitais das células, causando alterações bioquímicas e morfológicas características desse processo de morte celular (Ghobrial *et al.*, 2005).

A clivagem da lâmina nuclear causa a condensação da cromatina e diminuição do volume do núcleo. A desativação de inibidores de endonucleases induzem a fragmentação do DNA. Proteínas do citoesqueleto também são clivadas

pelas caspases, induzindo alterações na morfologia (Savill *et al.*, 2000). A apoptose pode ser ativada por duas vias principais. A via extrínseca inicia-se com a interação de ligantes específicos aos receptores de apoptose localizados na superfície da membrana plasmática, desencadeando a ativação de caspases. A via intrínseca é iniciada após alterações funcionais e/ou estruturais ocorridas na mitocôndria, desencadeando a liberação de moléculas sinalizadoras responsáveis por ativar as caspases (Igney *et al.*, 2002).

Vários peptídeos catiônicos, como *magainina 2* e derivados de *gaegurina 6*, são capazes de induzir apoptose. Os resultados dos estudos com a *magainina* sugerem perturbação da membrana mitocondrial, a qual é carregada negativamente, levando à liberação do citocromo c, que promove o processo apoptótico (Kim *et al.*, 2003; Papo & Shai, 2005; Bhutia & Maiti, 2008).

## B) Processos de necrose da célula

A maioria dos peptídeos atuantes em membranas se liga rapidamente à membrana plasmática das células tumorais, desestabilizando-a e levando à necrose. A membrana citoplasmática das células cancerígenas hiper-expressa fosfatidilserina carregada negativamente e mucinas O-glicosiladas, o que torna a membrana dessas células mais negativa que a das células eucarióticas normais.

Esses peptídeos, freqüentemente pequenos, catiônicos e anfipáticos, causam desestabilização da membrana, tanto pelo modelo *carpet-like*, como pelo *barrel-stave*, como descrito acima, levando à morte necrótica das células tumorais, sendo que os peptídeos que atuam como no último modelo também lisam células normais. (Papo & Shai, 2005; Bhutia & Maiti, 2008).

Os peptídeos necróticos possuem uma alta especificidade para células tumorais, atuam independentemente do estado proliferativo das células e são ativos contra células de câncer resistentes a múltiplas drogas, uma vez que não atuam via receptores. Experimentos demonstraram que o potencial de membrana é fundamental para a atividade desses peptídeos (Papo & Shai, 2005; Bhutia & Maiti,

2008). Durante a última década, membros desse grupo foram isolados de *Litoria* sp. e apresentam atividade contra todas as classes de cânceres humanos testados (Apponyi *et al.*, 2004).

#### 1.2.4. A seletividade dos PACs pelas células tumorais

Primeiramente, vale saber que peptídeos anticarcinogênicos são agentes que reduzem a frequência ou a taxa de manifestação de tumores espontâneos ou induzidos, independentemente do mecanismo envolvido. Eles diferem dos antineoplásicos, por impedirem a formação das neoplasias. As substâncias que possuem papel anticarcinogênicas podem ser divididas em três categorias.

A primeira consiste em compostos que impedem a formação de carcinógenos a partir de substâncias precursoras. A segunda categoria consiste em "agentes bloqueadores" que inibem a carcinogênese impedindo-os de alcançarem ou de reagirem com os alvos críticos nos tecidos. O terceiro grupo é formado pelos "agentes supressores" que agem suprimindo a expressão da neoplasia em células que foram previamente expostas a carcinógenos que, de outra forma, causariam neoplasia (Figura 6).

Mudanças na membrana de uma célula são de extrema importância para o desenvolvimento do câncer, para imitar a expressão de certos constituintes na membrana, promovendo a habilidade de crescer na ausência de sinais estimulatórios, de atacar e responder diferentemente às células vizinhas, e afetar a mobilidade das células cancerígenas, facilitando a invasão e a metástase.

Diferenças entre a membrana das células tumorais e normais fazem os peptídeos anticarcinogênicos apresentarem especificidade frente às células de câncer. As interações eletrostáticas entre os peptídeos anticarcinogênicos catiônicos e os componentes aniônicos da membrana celular são as maiores responsáveis pela especificidade desses peptídeos. As membranas das células cancerígenas são carregadas negativamente devido à presença de moléculas aniônicas, tais como as fosfatidilserinas, as mucinas O-glicosiladas e ácido siálico, como ressaltado

anteriormente, diferentemente das células normais que possuem membranas neutras (Dennison *et al.*, 2006; Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

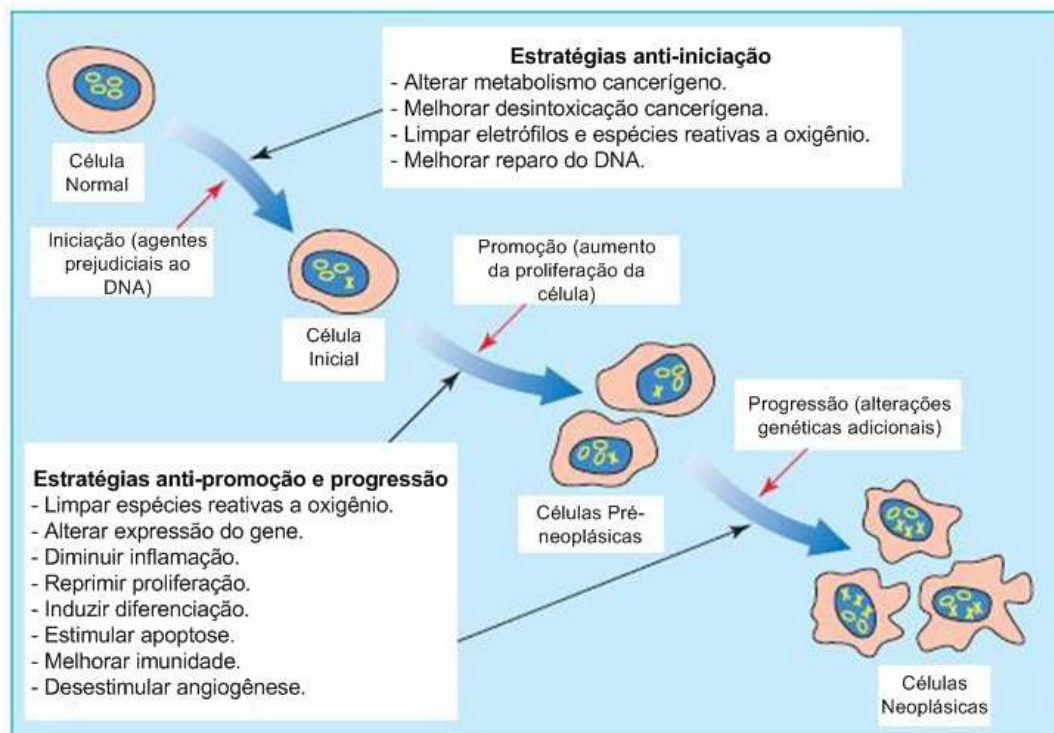


Figura 6. Multi-estágios da carcinogênese: processos e estratégias de prevenção. A iniciação é caracterizada pela conversão de uma célula normal em uma célula inicializada, em resposta a agentes prejudiciais ao DNA (dano genético indicado por um X). A promoção caracteriza-se pela transformação de uma célula inicializada em uma população de células pré-neoplásicas, resultado de alterações na expressão de genes e proliferação celular. A progressão inclui a transformação das células pré-neoplásicas em uma população de células neoplásicas como resultado de alterações genéticas adicionais (modificado de Peter Greenwald 2002).

Outros fatores, como a maior fluidez da membrana (por causa da reduzida quantidade de colesterol), que facilita a sua desestabilização e a maior área superficial devido à presença de inúmeras microvilosidades, as quais permitem a ligação de uma maior quantidade de peptídeos, também são responsáveis pela eficácia dos PACs contra as células tumorais (Dennison *et al.*, 2006; Hoskin & Ramamoorthy, 2008). Na figura 7 está ilustrada a interação de um PAC com a membrana celular.

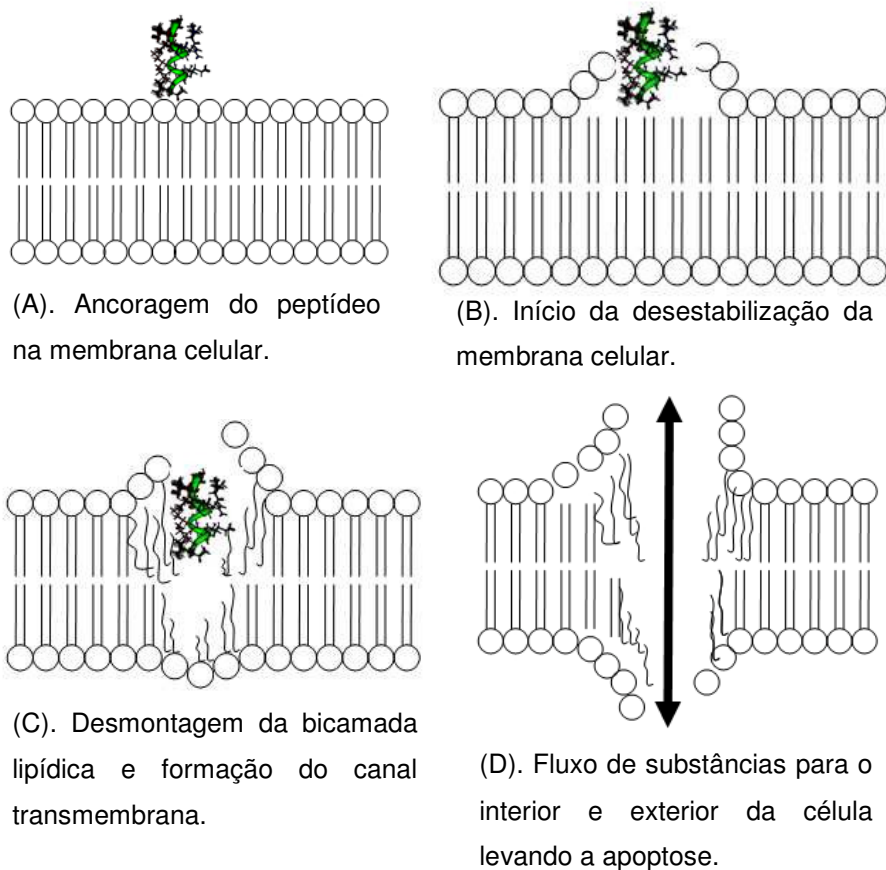


Figura 7. Interação de um peptídeo anticarcinogênico (PAC) com a membrana celular: (A) ancoragem do peptídeo na membrana celular; (B). Início da desestabilização da membrana celular; (C). Desmontagem da bicamada lipídica e formação do canal transmembrana; (D). Fluxo de substâncias para o interior e exterior da célula levando à apoptose (fonte: wfdaj.sites.uol.com.br)

Entretanto, existem PACs que são tóxicos para todos os tipos de células. Além disso, existe grande variabilidade na especificidade e na eficiência para diferentes células-alvo. Vários estudos sugerem que a seletividade também pode depender de características físico-químicas e estruturais do peptídeo, juntamente com a organização e a composição da membrana-alvo e de camadas associadas (Dennison *et al.*, 2006).

### 1.2.5. Estratégias para aumentar a eficiência dos PACs

Substâncias originadas de fontes naturais há muito tempo são utilizadas no tratamento de inúmeras enfermidades que acometem os seres humanos. Grande parte dos medicamentos encontrados no mercado é derivado direto ou indiretamente de vegetais, microrganismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres. (Newman *et. al.*, 2000; Chin, 2006). Analisando os medicamentos disponibilizados no mercado entre 1981 e 2002, observa-se que 28% destes possuem princípios ativos isolados de produtos naturais, semi-sintéticos ou sintéticos, ao passo que 24% são sintéticos com grupos farmacofóricos baseados em estruturas bioativas (Newman *et. al.*, 2003).

Apesar do grande potencial terapêutico, o uso de peptídeos naturais tem sido inviabilizado por inúmeros fatores, como meia-vida curta no sangue, baixa biodisponibilidade em tecidos e órgãos, depuração renal e potencial ativação do sistema imune (Shadidi & Sioud, 2003). O desenvolvimento de terapias baseadas em peptídeos deve possuir forte atividade tumoricida e baixa toxicidade (Kim *et al.*, 2003).

Uma alternativa é a funcionalização dos PACs, isto é, a utilização desses peptídeos com quimioterápicos convencionais ou moléculas radio-marcadas, por exemplo, o uso de peptídeos antagonistas de receptores conjugados às drogas tradicionais utilizadas no tratamento de câncer. Essas pró-drogas são desenhadas pela fusão de quimioterápicos a peptídeos, que se ligam especificamente a células tumorais com um sítio de clivagem que é reconhecido pelas proteases associadas ao tumor (Shadidi & Sioud, 2003). Finalmente, o potencial desses peptídeos pode ser aumentado por meio de sistemas de entrega. Carreadores de drogas e associação com soro albumina estão sendo usados para aumentar a longevidade, estabilidade, permeabilidade e retenção no corpo dessas moléculas (Zhu & Witte, 1999; Brannon-Peppas & Blanchette, 2004; Papo & Shai, 2005).

Outra estratégia que representa um importante passo no uso de peptídeos líticos na terapia do câncer é o uso da entrega de genes codificadores de peptídeos

líticos nas células tumorais por vetores (Winder *et al.*, 1998; Brannon-Peppas & Blanchette, 2004).

Infelizmente, os custos para isolar e sintetizar PACs de origem natural ainda são muito elevados. Investimentos das indústrias farmacêuticas levarão, em um futuro próximo, ao desenvolvimento de novas técnicas que viabilizarão a comercialização dessas moléculas, as quais serão uma alternativa real aos quimioterápicos atuais (Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

### 1.3. Espécies-alvo do presente estudo

#### 1.3.1. *Proceratophrys goyana* (Miranda-Ribeiro, 1937)

O gênero *Proceratophrys* foi criado para acomodar *Ceratophrys bigibbosa* (Peters, 1872), diferenciando esta espécie das demais pela região supra-ocular intumescida e pálpebras com tubérculos no lugar dos apêndices. Posteriormente, Lynch (1971) redefiniu e reorganizou os gêneros da então família *Leptodactylidae* a partir de caracteres morfológicos, incluindo em *Proceratophrys* as espécies com apêndices palpebrais até então alocadas em *Stombus*, que foi considerado sinônimo de *Ceratophrys*. Neste mesmo estudo, Lynch (1971) posicionou *Proceratophrys* e *Odontophrynus* na tribo *Odontophrynini*, *Telmatobiinae*, família *Leptodactylidae*. A proposta de Lynch (1971) foi bem aceita e amplamente utilizada nas três décadas seguintes.

Recentemente, Frost *et al.* (2006), em ampla revisão da sistemática de anfíbios, incluíram o gênero *Proceratophrys*, utilizando caracteres moleculares e morfológicos, alteraram este esquema alocando *Proceratophrys* na tribo *Alsodini* Mivart, 1869, subfamília *Cycloramphinae* Bonaparte 1850, família *Cycloramphidae* Bonaparte, 1850, juntamente com os gêneros *Alsodes* Bell, 1843, *Eupsophus* Fitzinger, 1843, *Hylorina* Bell, 1843, *Limnomedusa* Fitzinger, 1843 e *Macrogenioglottus* Carvalho, 1946, e *Odontophrynus*, sem abordar os relacionamentos intragenéricos. Mais tarde, Grant *et al.* (2006), estudando a filogenia de *Dendrobatidae* Cope, 1865, mantiveram *Proceratophrys* na família



Cycloramphidae, mas não reconheceram as subfamílias ou tribos propostas por Frost *et al.* (2006).

As espécies do gênero *Proceratophrys* ocorrem em amplas regiões da América do Sul a leste dos Andes (Frost, 2009). Atualmente, são reconhecidas 18 espécies (Frost, 2009), distribuídas em dois grupos (Lynch, 1971), sem definição filogenética formal (Giaretta *et al.*, 2000): o grupo de *Proceratophrys boiei*, que compreende nove espécies, caracterizadas pela presença de apêndices palpebrais ceratóides e outro grupo, que abriga as demais espécies e não deve representar um grupo monofilético, caracterizado pela ausência de apêndices palpebrais ou presença de apenas pequenos tubérculos nas margens das pálpebras.

O gênero tem a sua distribuição geográfica, principalmente, na Mata Atlântica, desde o nordeste até o sul do Brasil, alcançando o domínio das araucárias, nos estados do Paraná e de Santa Catarina, o domínio do cerrado, nos estados de Rondônia e Minas Gerais, Goiás, e o domínio das caatingas, entre os estados de Pernambuco e do Ceará. Os seus habitats naturais são: savanas húmidas, matagal húmido tropical ou subtropical, campos de gramíneas de baixa altitude subtropicais ou tropicais sazonalmente úmidos ou inundados, campos de altitude subtropicais ou tropicais, e rios intermitentes.



Figura 8. Exemplar de *Proceratophrys goyana* (Miranda-Ribeiro, 1937). (Foto de Carlos Cândido - Colinas do Sul/Goiás).

São raros os trabalhos tratando de comportamento e ecologia das espécies do grupo. Sabe-se que pós-metamorfoseados são terrestres e, em geral, habitam a serapilheira (Giaretta *et al.*, 2000; Kwet & Faivovich, 2001).

São animais de difícil visualização, em função da camuflagem e comportamentos associados (Izecksohn & Peixoto, 1996). A reprodução da maioria das espécies é concentrada na estação úmida e quente (Giaretta & Facure, 2008), aparentemente associada à ocorrência de chuvas fortes (Kwet & Faivovich, 2001).

Entre as poucas espécies conhecidas em termos reprodutivos, todas têm larvas aquáticas, principalmente em ambientes lóticos (mesmo que de correnteza fraca) no interior de matas, onde também são encontrados adultos em atividade reprodutiva (machos vocalizando e fêmeas ovíferas) (Kwet & Faivovich, 2001; Giaretta & Facure, 2008).

Presentemente, são reconhecidas formalmente no Cerrado apenas três espécies: *Proceratophrys palustris* (Poços de Caldas, MG), que vocaliza em áreas abertas, próxima a filetes de água com correnteza fraca e fundo lodoso (Giaretta & Sazima, 1993); *Proceratophrys cururu*, que ocorre em matas e poças temporárias em áreas abertas da Serra do Cipó, MG (Eterovick & Sazima 1998, 2000) e *Proceratophrys goyana* (Figura 8), que ocorre em matas do Triângulo Mineiro, Goiás e Distrito Federal (Brandão & Araújo, 2001; Bastos *et al.*, 2003;).

### 1.3.2. *Physalaemus fuscomaculatus* (Steindachner, 1864)

A espécie *Physalaemus fuscomaculatus* (Figura 9) pertence à família Leptodactylidae. e é encontrada no Brasil, Paraguai, Argentina, Bolívia e Uruguai. Os seus habitats naturais são: savanas áridas, savanas úmidas, matagal húmido tropical ou subtropical e matagal tropical de altitude, regiões subtropicais ou pastagens de várzea tropical seco, lagos de água doce intermitentes e marismas intermitentes de água doce. Tal espécie é bem caracterizada quanto ao aspecto da sua pele, onde podemos perceber uma certa granulação da pele dorsal, marcada pelo acúmulo de glândulas granulosas. Estas glândulas, também chamadas

glândulas serosas ou de veneno, podem estar distribuídas ao longo de todo o corpo, ou concentradas em algumas áreas, formando protuberâncias, especialmente na região dorsal do animal (Duellman & Trueb, 1986).



Figura 9. Exemplar de *Physalaemus fuscumaculatus* (Steindachner, 1864). Fonte da imagem: <http://www.conservegrassland.org/portuguese/membership.htm>.

Um aspecto curioso acerca das glândulas serosas presente na parte dorsal deste indivíduo é que o lume das glândulas serosas e das paratoides é rico em grânulos que armazenam secreções tóxicas. Em qualquer situação de perigo, um estímulo nervoso é recebido pelas paredes glandulares, provocando a contração da musculatura local e causando uma descarga sincronizada do seu conteúdo. Após a liberação da secreção, o sistema glandular inicia seu processo de regeneração, que pode variar de poucas horas a alguns dias, dependendo da espécie de anfíbio, até que o conteúdo do lume glandular seja reconstituído (Delfino *et al.*, 1990).

### 1.3.3. *Physalaemus centralis* (Bokermann, 1962)

A espécie *Physalaemus centralis* (Figura 10) pertencente a família Leptodactylidae, pode ser encontrada na Bolívia, Brasil e Paraguai. Os seus habitats naturais são: savanas úmidas, matagal úmido tropical ou subtropical, campos de gramíneas de baixa altitude subtropicais ou tropicais sazonalmente úmidos ou inundados, de água doce.

*Physalaemus centralis* pertence ao grupo de *P. cuvieri* (Nascimento *et al.*, 2005; Frost, 2009), e se assemelha à última espécie, mas distingue-se pelo seu maior tamanho e largura do corpo (em vista dorsal), a presença de dois negros pontos na região sacral, e também possui uma cabeça menor.

É mais abundante no meio da estação chuvosa, que normalmente vai de outubro a início de janeiro (Brasileiro *et al.*, 2005; Vasconcelos & Rossa-Feres, 2005; Santos *et al.*, 2007, Zina *et al.*, 2007). A espécie exibe reprodução explosiva (Toledo *et al.*, 2003; Vasconcelos & Rossa-Feres, 2005; Santos *et al.* 2007). A postura dos ovos dura cerca de 28 min (Brasileiro & Martins, 2005). As fêmeas colocam ovos em pequenos ninhos de espuma (o número médio de ovos chega a 1872), presentes na vegetação marginal à beira da lagoa ou espumas flutuantes em lagoas. Os girinos se desenvolvem em poças de água (Haddad & Prado, 2005; Toledo *et al.*, 2003; Brasileiro *et al.*, 2005; Zina *et al.*, 2007).



Figura 10. Exemplar de *Physalaemus centralis* (Bokermann, 1962) (Foto de Diogo B. Provete).

Há registros de territorialidade e combate físico (Brasileiro, 1998). O desenvolvimento em geral leva cerca de um mês e meio (Brasileiro & Martins 2005). Existem registros de predação de ninhos de espuma, por adultos e larvas da mosca *Beckeriella niger* (Ephydridae) (Menin & Giaretta, 2003).

Os girinos bentônicos são encontrados com maior abundância no final da estação chuvosa (Santos *et al.* 2007), em áreas rasas dos espelhos d'água com vegetação emergente e lama (Brasileiro & Martins 2005).

As larvas alimentam-se de microalgas (Bacillariophyta e Cyanophyta e protozoários (Sarcomastigóforos) (Rossa-Feres *et al.* 2004). A dieta dos *P. centralis* é muito parecida com a dieta de girinos de *P. cuvieri* (Rossa-Feres *et al.* 2004).

A população é estável, uma vez que é amplamente distribuída na região central do Brasil e é considerada uma espécie generalista. No entanto, não é comum, devido aos seus hábitos de reprodução explosiva (Brandão & Araújo, 1998; IUCN-GAA, 2004; Vasconcelos & Rossa-Feres, 2005). A espécie não se adapta bem a perturbação antrópica.

#### 1.3.4. *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824)

*Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) (Figura 11) é uma perereca de porte médio a grande, 30 a 65 mm de comprimento rostro-cloacal, que possui ampla distribuição no Brasil, sendo encontrada no Planalto Central, nos estados do Sul e em quase todos os estados do Sudeste, e também no estado de Rondônia (Frost, 2009). Ocorre também no nordeste da Argentina (na província de Corrientes), no leste da Bolívia (no departamento de Santa Cruz), no leste do Paraguai e no Uruguai. Seu colorido vai do amarelo ao marrom-claro. É uma espécie típica de Cerrado, ocorrendo em áreas abertas na Serra do Japi (Ribeiro *et al.*, 2005).

Como característica distintiva, possui pintas na face posterior das coxas. Essas pintas são amarelas em vida, mas foram descritas como se fossem brancas pelo fato dos autores se basearem em exemplares preservados; daí vem o termo *albopunctatus*. Tanto machos quanto fêmeas possuem pré-pólex, mas este, às vezes, acha-se pouco distinto nas fêmeas. Seu focinho possui uma faixa lateral escura, sendo a região abaixo dessa faixa - a “máscara” - de coloração marrom-escura a negra (Ribeiro *et al.*, 2005).



Figura 11. Exemplar de *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) (Foto de Carlos Cândido).

A espécie *H. albopunctatus* possui atividade de vocalização que ocorre em praticamente todos os meses do ano. Os machos são menores que as fêmeas e têm um espinho em cada pré-pólex. As desovas (média de 769 ovos) são postas à superfície da água em uma monocamada. Girinos recentes eram pretos, porém tornavam-se acobreados ao longo do desenvolvimento (Muniz *et al.*, 2008).

Diferentemente dos girinos, os ovos são impalatáveis para os teleósteos testados. Os girinos são mais abundantes nos brejos e se distribuem de forma agregada no ambiente. Somente nos lagos há correlação positiva entre a abundância de girinos e profundidade, número de artrópodes e quantidade de substrato vegetal (Muniz *et al.*, 2008).

A reprodução da espécie, quase contínua ao longo do ano, é um comportamento raro entre anuros do sudeste do Brasil. A abundância maior de girinos nos brejos pode ser devido à ausência de teleósteos predadores (Muniz *et al.*, 2008).

A impalatabilidade dos ovos e o uso de micro-habitat de refúgio pelos girinos provavelmente são os mecanismos que possibilitam a co-ocorrência de *H. albopunctatus* com teleósteos. Há ocorrência da espécie de reproduzir durante o período seco (Muniz *et al.*, 2008).

## *2. Justificativa*

---

## 2. JUSTIFICATIVA

A resistência de patógenos a antimicrobianos é o maior problema clínico mundial de interesse na saúde pública. Segundo Okeke *et al.* (2005) e French (2005), a presença dos microrganismos resistentes afetam, não somente a mortalidade, mas também o custo do tratamento, a expansão da doença e a duração da mesma. Diversas estratégias estão emergindo para ajudar a solucionar esse problema crítico. Dentre as soluções correntes, encontram-se o uso dos antimicrobianos com parcimônia e a descoberta de novos antimicrobianos alternativos.

Atualmente, a indústria farmacêutica atravessa um período de estagnação na produção de novas drogas, o que é preocupante, uma vez que diversas bactérias patogênicas têm apresentado resistência aos medicamentos comercialmente disponíveis.

Neste contexto, os PAMs são moléculas efetoras naturais do sistema imune inato de diferentes seres vivos, atuando como primeira linha de defesa contra microrganismos. Também são compostos bioativos, potencialmente bons candidatos para novos agentes terapêuticos, menos propenso aos fenômenos de resistência pelos microrganismos e inócuos para a saúde humana.

Estudos ao longo dos anos revelaram diversas funções para os peptídeos antimicrobianos. Dentre essas funções, destacam-se as atividades antimicrobiana, antitumoral, antiviral, contraceptiva e antiparasitária. Entretanto, os peptídeos que possuem atividade antimicrobiana (não excluindo as outras funções) são os mais procurados, devido à crescente resistência aos antibióticos convencionais e a necessidade de novos antibióticos para a terapia humana (Zasloff, 2002). Potenciais peptídeos antimicrobianos devem apresentar uma toxicidade seletiva, rápida ação, amplo espectro antimicrobiano e não selecionar mecanismos de resistência nos microrganismos (Matsuzaki, 1999).



A secreção cutânea da pele de anfíbios, principalmente anuros, é riquíssima em compostos bioativos, principalmente peptídeos antimicrobianos, e acredita-se ser uma alternativa na produção de novas drogas eficientes no controle de organismos patogênicos. O estudo dos peptídeos bioativos de diferentes espécies de anfíbios pode levar também à descoberta de novas atividades biológicas e especificidades.

As pesquisas com peptídeos antimicrobianos de espécies de anfíbios encontradas no Brasil ainda são escassas. Motivado por esses fatos, o presente trabalho visa à purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes nas secreções cutâneas dos anuros *Proceratophrys goyana*, *Physalaemus fuscumaculatus*, *Physalaemus centralis* e *Hypsiboas albopunctatus*, com vistas a fomentar a indústria farmacêutica com novas opções de fármacos direcionados ao controle microbiano.

### *3. Objetivos*

---

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo geral

Realizar estudos de bioprospecção molecular a partir de secreções cutâneas dos anuros *Proceratophrys goyana*, *Physalaemus centralis*, *Physalaemus fuscumaculatus*, e *Hypsiboas albopunctatus*, comumente encontrados na fauna do Cerrado, com ênfase na identificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos.

### 3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Fracionar as secreções cutâneas de indivíduos adultos das espécies *P. goyana*, *P. fuscumaculatus* e *P. centralis*, empregando técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC);

3.2.2. Avaliar a atividade antimicrobiana e hemolítica das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento por RP-HPLC das secreções cutâneas das espécies *P. goyana*, *P. fuscumaculatus* e *P. centralis*;

3.2.3. Avaliar a homogeneidade das frações ativas, bem como determinar as massas moleculares dos componentes presentes nessas frações, por meio de espectrometria de massa tipo MALDI-TOF;

3.2.4. Determinar as concentrações inibitórias mínimas (MIC) dos peptídeos sintéticos produzidos a partir do peptídeo *ceratoxin-ike* obtido da secreção cutânea da rã *H. albopunctatus* frente à bactérias patogênicas.

## *4. Material e Métodos*

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Coleta dos animais e obtenção das secreções cutâneas dos anuros das espécies *P. goyana*, *P. centralis* e *P. fuscumaculatus*

Espécimes adultos de *P. goyana*, *P. fuscumaculatus* e *P. centralis* foram coletados no município de Monte Alegre/GO. As secreções cutâneas foram obtidas por estimulação elétrica moderada de corrente contínua e de baixa amperagem. Os animais foram previamente lavados com água Milli-Q, sendo que a secreção obtida foi congelada e imediatamente liofilizada. A amostra seca foi alíquotada em frações de 5,0 mg e armazenada a -20 °C até o uso. Nenhum animal foi sacrificado durante o procedimento, reassumindo seu comportamento normal após a estimulação.

### 4.2. Fracionamento cromatográfico das secreções cutâneas brutas

Alíquotas (5,0 mg) das secreções cutâneas brutas liofilizadas de *P. goyana*, *P. centralis* e *Physalaemus fuscumaculatus* foram individualmente dissolvidas em 220 µL de TFA 0,1% (v/v) em água, centrifugadas a 14.000 g por 5 min e aplicadas em colunas de fase reversa C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS, 6.0 x 150 mm). A eluição foi realizada empregando-se fluxo de 1 mL/min. Primeiramente, a coluna foi lavada por 5 min com 0,1% (v/v) de TFA/água (solvente A) e, em seguida, foi aplicado gradiente linear de 0–60% por 60 min e de 60–100% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA (solvente B) por 5 min, seguido de uma lavagem de 5 min com 100% de solvente B. A absorbância foi monitorada a 216 nm e as frações foram manualmente coletadas, secadas a vácuo e armazenadas a -20 °C.

### 4.3. Purificação dos peptídeos bioativos

As frações bioativas de interesse foram recromatografadas por RP-HPLC, injetando-se a amostra dissolvida em TFA 0,1% (v/v) em água em uma coluna C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS, 6.0 x 150 mm), previamente equilibrada com o mesmo solvente. A eluição realizou-se com fluxo de 1 mL/min, sendo realizados diferentes

gradientes de acetonitrila contendo 0,1% de TFA (solvente B), dependendo do tempo de retenção de cada amostra recromatografada. A detecção UV foi monitorada em 216 nm e as frações eluídas foram coletadas manualmente, secadas a vácuo e armazenadas a -20 °C.

#### 4.4. Ensaio hemolítico

O ensaio hemolítico utilizado foi modificado do protocolo descrito por Onuma *et al.* (1999). Eritrócitos de sangue humano O<sup>+</sup>, obtidos no Hemocentro de Brasília após realização de exames sorológicos, foram separados do plasma por sedimentação e lavados três vezes com tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M. Foi empregado o mesmo tampão para preparar uma suspensão 1% (v/v) de hemáceas e também para solubilizar as amostras.

Em tubos de 1,5 mL, 100 µL da suspensão de hemáceas foram incubadas com 100 µL de amostra por 60 min, à temperatura ambiente. Também foram incubados com 100 µL da suspensão de hemáceas, 100 µL de Triton X-100 1% (v/v), constituindo a referência para 100% de hemólise, e 100 µL do tampão Tris, referência para 0%.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 3000 g por 2 min e alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes foram transferidas para placas de microtitulação de 96 poços, e analisadas em 405 nm, em leitora BioRad 3550-UV. Com a finalidade de verificar quais componentes das secreções cutâneas dos anuros *P. goyana*, *P. fuscumaculatus* e *P. centralis* exibiam atividade hemolítica, cada fração cromatográfica de uma corrida cromatográfica foi solubilizada em tampão Tris e incubada com a suspensão de hemáceas, de acordo com o método descrito acima.

#### 4.5. Ensaio antimicrobiano

Linhagens referenciais de bactérias, obtidas do Banco de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP), foram cultivadas em 7 mL de meio

Mueller-Hinton, sob agitação a 37 °C. Quando a densidade ótica em 590 nm atingiu o valor de 1,0, cada suspensão bacteriana inicial foi diluída em meio Mueller-Hinton fresco, nas proporções de 1:50 para bactérias Gram-negativas e 1:100 para Gram-positivas. Uma alíquota de 50 µL de cada cultura bacteriana (contendo de 2 a  $5 \times 10^5$  CFUs dependendo da linhagem bacteriana empregada) foi incubada por 22 horas a 37 °C com 50 µL de amostra ressuspensa em água Milli-Q estéril, numa proporção de 1:1 (v/v), em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato).

Como controle representativo da ausência de proliferação bacteriana, foi realizada a incubação de formaldeído 0,4% (v/v) com a suspensão bacteriana e como controle representativo da proliferação máxima, foi feita a incubação da suspensão bacteriana com água Milli-Q estéril. Após a incubação por um período de 22 horas, a 37 °C, as placas foram analisadas a 595 nm, em leitora BioRad modelo 3550 UV (Hercules, CA, USA).

#### 4.5.1. Ensaio preliminar

Para verificar a presença de frações peptídicas ativas contra microrganismos, foi realizado um ensaio antimicrobiano inicial em placa multi-poços contra as bactérias patogênicas Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), e a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

O *screening* foi realizado a fim de verificar quais componentes das secreções cutâneas de *P. goyana*, *P. centralis* e *P. fuscumaculatus* apresentavam atividade inibitória sobre a proliferação bacteriana. Cada fração cromatográfica de uma corrida de RP-HPLC foi solubilizada em água Milli-Q e incubada com a respectiva suspensão bacteriana, de acordo com o método descrito. Após 22 horas de incubação a 37 °C, as placas foram analisadas em 595 nm por meio da leitora de placa da BioRad (Modelo 3550-UV, Hercules, CA, USA).

#### 4.6. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) para os peptídeos de *H. albopunctatus*

Em estudos anteriores realizados por nosso grupo empregando a secreção cutânea da rã *H. albopunctatus* (Castro *et al.*, 2009) foi isolado e caracterizado estruturalmente um peptídeo com atividade antimicrobiana no ensaio preliminar realizado (Anexos, Figura 36). Tal peptídeo foi submetido ao sequenciamento químico (degradação de Edman) resultando em uma sequência N-terminal com 21 resíduos de aminoácidos: GWLDVAKKIGKAAFNVAKNFL/I. Todavia, o resíduo C-terminal não pôde ser determinado com segurança tratando-se de um resíduo de leucina ou isoleucina. Também foi confirmada a presença de amidação na porção C-terminal por meio da esterificação de Fisher e análise por MALDI-TOF MS. Tal peptídeo (nas duas formas possíveis contendo Leu ou Ile na porção C-terminal) foi sintetizado por meio de síntese química manual em colaboração com o grupo do Prof. Eduardo Maffud Cilli (da UNESP de Araraquara), com a finalidade de determinar a concentração inibitória mínima (MIC) frente a diferentes bactérias patogênicas.

Vale destacar que o peptídeo isolado da rã *H. albopunctatus* apresenta similaridade com peptídeos antimicrobianos isolados de glândulas acessórias reprodutivas femininas da mosca da fruta *Ceratitis capitata*, conhecidos como *ceratoxinas*, como pode ser observado no multi-alinhamento apresentado nos Anexos, Figura 37 (Saint *et al.*, 2003). No presente trabalho, as duas versões sintéticas do peptídeo antibacteriano de *H. albopunctatus* foram denominadas peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile e peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu. (Rosetto *et al.*, 2000; Bessin *et al.*, 2004; Marchini *et al.*, 1993)

Para determinação dos MICs frente às bactérias patogênicas foram utilizadas bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e *Klesbsiella pneumoniae* (ATCC 13884), e bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e



*Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). Além dessas, também foi utilizada a bactéria Gram-positiva não-patogênica *Bacillus subtilis* (ATCC 19659).

Alíquotas de 50 µL de diluições seriadas das duas versões sintéticas produzidas, denominadas peptídeo *ceratoxin-like* Leu e peptídeo *ceratoxin-like* Ile, foram preparadas a partir de uma solução-estoque 256 µM esterilizada por filtração em filtros Millex GV 0,22 µm. Em seguida, foram incubadas com 50 µL de suspensão bacteriana, contendo de 2 a 7 x 10<sup>5</sup> CFU, dependendo da linhagem bacteriana empregada.

Após a incubação por um período de 22 horas a 37 °C, as placas foram analisadas a 595 nm, em leitora BioRad, modelo 3550 UV (Hercules, CA, USA). Os ensaios foram realizados em triplicata, e o MIC corresponde à menor concentração de peptídeo em que não houve crescimento bacteriano detectável.

#### 4.7. Análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF

No presente trabalho, todas as frações peptídicas foram caracterizadas com relação a sua composição peptídica/protéica, por meio da determinação das massas moleculares experimentais das frações cromatográficas em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

As frações foram dissolvidas em 0,1% (v/v) de TFA/água, e 1 µL de cada fração foi aplicado em placa de aço inoxidável juntamente com 1 µL da matriz reconstituída de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 20 µg/µL) ou ácido sinapínico (AS 20 µg/µL) ressuspendidas em 50% (v/v) acetonitrila/0,1% (v/v) TFA.

Dois tipos de análises foram realizados com cada fração cromatográfica obtida: modo refletor de íons positivos e modo linear. O procedimento realizado no modo refletor utilizou a solução *Peptide Mix* (Bruker Daltonics) para a calibração e matriz HCCA, sendo a faixa *m/z* analisada de 500 a 4000 Da. Já os espectros de massa de 4 kDa a 20 kDa Da foram calibrados com citocromo C, e a matriz usada foi o ácido sinapínico.

Os peptídeos recromatografados foram submetidos ao mesmo procedimento descrito acima para a verificação do grau de pureza, antes da realização dos demais ensaios biológicos.

## 4.8. Ensaio de citotoxicidade sobre linhagens celulares tumorais

### 4.8.1. Linhagens celulares

As linhagens celulares empregadas no presente trabalho foram: B16F10 (células de melanoma murino), HeLa (célula tumoral do colo do útero humano) e NIH3T3 (célula de fibroblastos murino normal). Todas as células são de origem humana e foram obtidas do banco de células *American Type Culture Collection* (ATCC).

A linhagem celular HeLa apresenta um crescimento aderente e morfologia epitelial. Estudos reportam que células de HeLa contêm sequências do vírus papiloma humano (HPV-18). A linhagem B16F10 apresenta uma elevada característica metastásica, baixa imunogenicidade e moderada virulência (Rodrigues *et al.*, 2008).

Devido ao conhecimento bem estabelecido de suas características morfológicas, bioquímicas e moleculares, essas linhagens têm servido como os modelos celulares mais utilizados na pesquisa de câncer, tanto no estudo de efeitos de compostos anticarcinogênicos, quanto na elucidação dos mecanismos de ação dos mesmos. A linhagem de fibroblastos normais humanos (NIH3T3) é uma linhagem imortalizada, que cresce de forma aderente ao substrato e apresenta morfologia fusiforme.

Todos os ensaios de atividade anticarcinogênica foram realizados no Laboratório de Morfologia e Morfogênese da Universidade de Brasília, sob a coordenação do Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo.

#### 4.8.2. Manutenção da cultura de células

Todos os procedimentos foram realizados com materiais esterilizados e em câmara de fluxo laminar, cuja luz ultra-violeta permaneceu ligada de 30 a 40 minutos antes do uso. Alíquotas de células de câncer e fibroblastos foram removidas de um estoque em nitrogênio líquido e descongeladas rapidamente a 37 °C. Alíquotas de 500 µL foram lentamente adicionadas em 3 mL de meio de cultura DMEM completo (tamponado com bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico). Esse meio de cultura foi utilizado em todos os outros procedimentos experimentais. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, ressuspensas em 5 mL de meio de cultura DMEM, transferidas para um frasco de cultura de células e incubadas em estufa, a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para assegurar a qualidade das células que iriam ser utilizadas nos experimentos, a cada 48 horas, o meio de cultura foi substituído por um meio de cultura novo. A cultura de células foi observada em microscópio de luz invertido e monitorada quanto ao crescimento celular, aspectos morfológicos e presença de contaminantes. Ao atingir o estágio de confluência (elevada densidade de células em uma determinada área), as células foram removidas do frasco de cultura e re-cultivadas em uma densidade menor seguindo o procedimento descrito a seguir.

O meio de cultura foi descartado e 2 mL de solução de tripsina-EDTA foram adicionados ao frasco de cultura, para a remoção da monocamada de células. Após 2 minutos de incubação em estufa a 37 °C, a remoção das células foi observada em microscópio de luz invertido. Em seguida, foram acrescentados 2 mL de meio de cultura para inativar a atividade da tripsina. A suspensão de células foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante foi removido e as células, ressuspensas em meio de cultura. Aproximadamente, 10% das células foram re-cultivadas em frascos de cultura e incubadas em estufa, a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. O restante, ou foi utilizado nos experimentos, ou recebeu a adição de hipoclorito de sódio e detergente e, após 24 horas, foram descartados. Após o término dos experimentos, as células de câncer e

fibroblastos foram congeladas, de acordo com o procedimento descrito a seguir. No estágio de confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura e centrifugadas (como descrito acima). Após o descarte do meio de cultura, as células foram ressuspensas em meio de congelamento (DMEM, 20% soro fetal bovino, 1% de antibiótico, 5% de DMSO). A suspensão celular foi rapidamente transferida para criotubos, os quais foram identificados e envolvidos por uma espessa camada de papel toalha e mantidos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas. Em seguida, os criotubos foram estocados, imersos em nitrogênio líquido.

#### 4.8.3. Tratamento das células com os peptídeos *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus*

Ao atingir o estágio de confluência, as células de câncer ou fibroblastos normais foram removidas do frasco de cultura e centrifugadas como descrito anteriormente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. Para a determinação do número de células, 10  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foi adicionado a 40  $\mu\text{L}$  de solução de azul tripan (0,4% diluídos em PBS, p/v). Uma alíquota de 8  $\mu\text{L}$  dessa mistura foi depositada vagarosamente em uma câmara de Neubauer, onde células presentes nos quatro quadrantes maiores laterais foram contadas em microscópio de luz. O número de células foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\text{Número de células/ mL} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de quadrantes contados (=4)}} \times \text{fator de diluição (=5)} \times 10^4$$

As células contadas foram transferidas para placas de cultura e incubadas em estufa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , por 24 horas, para a completa adesão das células no fundo da placa. As células foram transferidas para placas de tamanhos diferentes, dependendo do experimento a ser realizado. Placas de 96 poços foram utilizadas para ensaios de viabilidade celular por MTT (ver descrição abaixo), com concentração inicial de  $5 \times 10^3$  células/poço.

Após o período de incubação na estufa, as placas de cultura foram observadas em microscópio de luz invertido para a avaliação da morfologia, dispersão das células pela placa e presença de contaminação.

Essa análise foi realizada para decidir se as células estavam homogeneamente dispersas e saudáveis para serem submetidas aos ensaios com os peptídeos. O meio de cultura contendo os peptídeos de interesse foi preparado a partir da diluição seriada das soluções estoque dessas moléculas (256  $\mu$ M) em meio de cultura.

O meio de cultura do grupo controle (ausência dos peptídeos) continha apenas meio DMEM na mesma proporção que foi adicionada aos outros grupos experimentais. O meio de cultura das placas foi substituído pelo que continha os peptídeos. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 horas. Após o período de incubação, as células foram preparadas de maneira adequada para a realização dos testes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.8.4. Análise dos efeitos citotóxicos

Esses testes tiveram como objetivo avaliar se os peptídeos *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus* induziram efeitos em estruturas celulares vitais, levando a morte celular. Tal avaliação foi feita em diversas estruturas celulares, visando observar diferentes aspectos dos efeitos dessa molécula nas células. Essas observações forneceram informações valiosas sobre os possíveis mecanismos de ação dos peptídeos estudados.

##### 4.8.4.1. Avaliação da viabilidade celular empregando-se MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT estabelecido por Mosmann (1983). Esse é um dos métodos colorimétricos mais utilizados em testes preliminares para identificar e determinar as concentrações ativas de novas moléculas anticarcinogênicas. Em células metabolicamente viáveis, enzimas mitocondriais, como a succinil-desidrogenase, reduzem o substrato MTT (brometo

de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), formando o formazan, um produto de cor azulada. Dessa forma, a quantificação da produção de formazan por células submetidas a determinado tratamento está correlacionada com sua viabilidade.

As células tumorais (HeLa e B16F10) e normais (FHN) foram cultivadas e tratadas com os peptídeos *ceratoxin-like* em placas de 96 poços, como descrito no item acima. Após o período de incubação de 48 horas, o meio de cultura das placas foi removido, e 150 µL de solução de uso de MTT (15 µL de MTT 5mg/mL diluídos em 135 µL de DMEM completo) foram adicionados em cada poço. As células foram incubadas por 3 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Em seguida, o meio de cultura foi removido e 100 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver o formazan formado. A quantificação do formazan foi feita pela medida da absorvância dos poços no comprimento de onda de 595 nm, em espectrofotômetro conjugado a uma leitora de microplacas (BioRad modelo 3550 UV, Hercules, CA, USA).

A viabilidade celular foi determinada pela média da triplicata de cada concentração testada. A concentração inibitória mínima (IC<sub>50</sub>) representa a concentração em que a viabilidade celular foi reduzida em 50%.

#### 4.8.4.2. Morfologia Celular

A morfologia celular é um importante indicativo de viabilidade. Alterações severas desencadeadas por agentes citotóxicos geralmente culminam na modificação da morfologia celular. A microscopia de contraste de fase consiste na passagem da luz do microscópio por um anel de contraste, que atinge a amostra e produz um efeito de destaque, onde estruturas claras ficam mais claras e estruturas escuras ficam mais escuras. Dessa forma, é possível observar e analisar rapidamente a morfologia de células imersas em meio de cultura, sem utilização de fixadores ou corantes.

No presente trabalho, após o período de tratamento com os peptídeos *ceratoxin-like*, as placas de cultura foram observadas em microscópio de contraste

de fase invertido (UNICO, EUA), para análise de possíveis alterações morfológicas. A aquisição das imagens foi realizada com o uso de câmera digital acoplada a ocular do microscópio e o *software* de aquisição *Scope* (versão 1.0.0.0, 2003).

## *5. Resultados*

---



## 5. RESULTADOS

De modo a facilitar a compreensão dos resultados obtidos, tal seção foi dividida em função das espécies de anuros empregadas no presente estudo.

### 5.1. *Proceratophrys goyana*

#### 5.1.1. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea

Alíquotas de 5,0 mg da secreção bruta de *Proceratophrys goyana* foram inicialmente fracionadas em coluna C<sub>18</sub> por RP-HPLC a um fluxo de 1 mL/min, obtendo-se o perfil cromatográfico a seguir (Figura 12). O perfil apresentou uma boa reprodutibilidade ao longo das corridas cromatográficas realizadas, totalizando uma média de 97 frações coletadas manualmente.

#### 5.1.2. Ensaios preliminares das atividades antimicrobiana e hemolítica

A partir das frações cromatográficas obtidas de uma única corrida cromatográfica, realizou-se um ensaio preliminar para avaliação da atividade antimicrobiana (empregando-se as bactérias Gram-positiva *S. aureus* e Gram-negativa *P. aeruginosa*). As frações que apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento microbiano das linhagens bacterianas foram testadas.

As frações 19 e 86 foram ativas contra as *S. aureus* apresentando uma inibição em torno de 50%. Já as frações 21, 22, 33, 38, e 68 demonstraram atividade contra a bactéria *P. aeruginosa*, com uma inibição em torno de 30%. As porcentagens de inibição obtidas estão apresentados na Tabela 1.

Também foi realizado ensaio biológico com o intuito de constatar a presença de atividade hemolítica nas frações testadas. Nenhuma das 97 frações foi capaz de promover hemólise nas concentrações utilizadas.

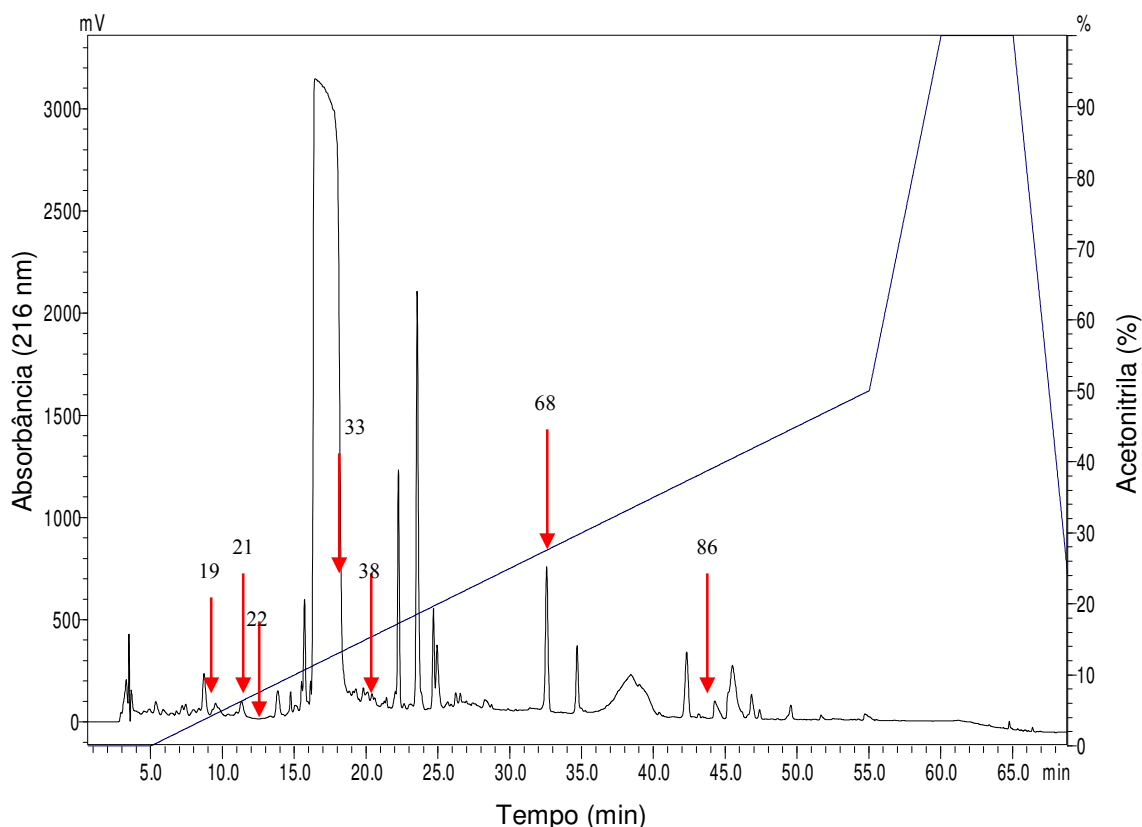


Figura 12. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *P. goyana* em coluna  $C_{18}$  (Shim-pack CLC-ODS, 6.0 x 150 mm) em sistema HPLC da Shimadzu com emprego de gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila. A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min. As frações contendo os peptídeos utilizados ao longo do presente trabalho estão indicadas com números que correspondem à sua ordem de eluição e possuem os seguintes tempos de retenção: Fração 19: 10.46; Fração 21: 11.36; Fração 22: 11.89; Fração 33: 18.81; Fração 38: 20.13; Fração 68: 32.61 e Fração 86: 43.94 min.

Tabela. 1. Avaliação da atividade inibitória sobre o crescimento das bactérias patogênicas *S. aureus* e *P. aeruginosa* das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da secreção cutânea *P. goyana* em RP-HPLC  $C_{18}$ .

Fração cromatográfica	Bactéria empregada	Taxa de inibição do crescimento bacteriano (%)
19	<i>S. aureus</i>	11,0
21	<i>P. aeruginosa</i>	40,2
22	<i>P. aeruginosa</i>	43,2
33	<i>P. aeruginosa</i>	24,1
38	<i>P. aeruginosa</i>	24,1
68	<i>P. aeruginosa</i>	19,7
86	<i>S. aureus</i>	49,2

### 5.1.3. Análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF das frações bioativas

As frações cromatográficas que apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento microbiano foram reunidas e analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (Tabela 2).

Tabela 2. Massas moleculares  $[M+H]^+$  dos componentes moleculares detectados presentes nas frações cromatográficas obtidas com o fracionamento em RP-HPLC da secreção cutânea de *P. goyana*. Dados obtidos a partir de análise em espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF, nos modos refletido e linear.

Fração cromatográfica	Massa molecular $[M+H]^+$ dos componentes moleculares detectados					
19	1021,33	1033,63	<b>1082,83</b>	1119,73	1341,14	
21	<b>1343,20</b>					
22	<b>959,23</b>	<b>1159,64</b>	1181,24	1341,14	2023,80	2060,70
33	<b>1159,11</b>					
38	885,56	1341,27	<b>1513,00</b>	1529,13	1545,27	1805,00
68	1272,60	<b>1294,68</b>	1316,75	1351,01		

\*Algumas frações cromatográficas não foram relacionadas devido a falhas na sua ionização ou em virtude de baixa quantidade de material disponível

\*\*Em negrito, destacam-se os componentes moleculares mais abundantes nas frações cromatográficas analisadas.

As massas moleculares monoisotópicas dos componentes moleculares presentes nas frações cromatográficas bioativas responsáveis pela atividade biológica é mostrada a seguir.

É importante ressaltar que a maioria das frações cromatográficas não se apresentaram puras, com exceção apenas das frações 21 e 33 (ativas contra *P. aeruginosa*) com componentes com massas moleculares 1343,20 Da  $[M+H]^+$  e 1159,11 Da  $[M+H]^+$ , respectivamente (Figura 13 e 14).

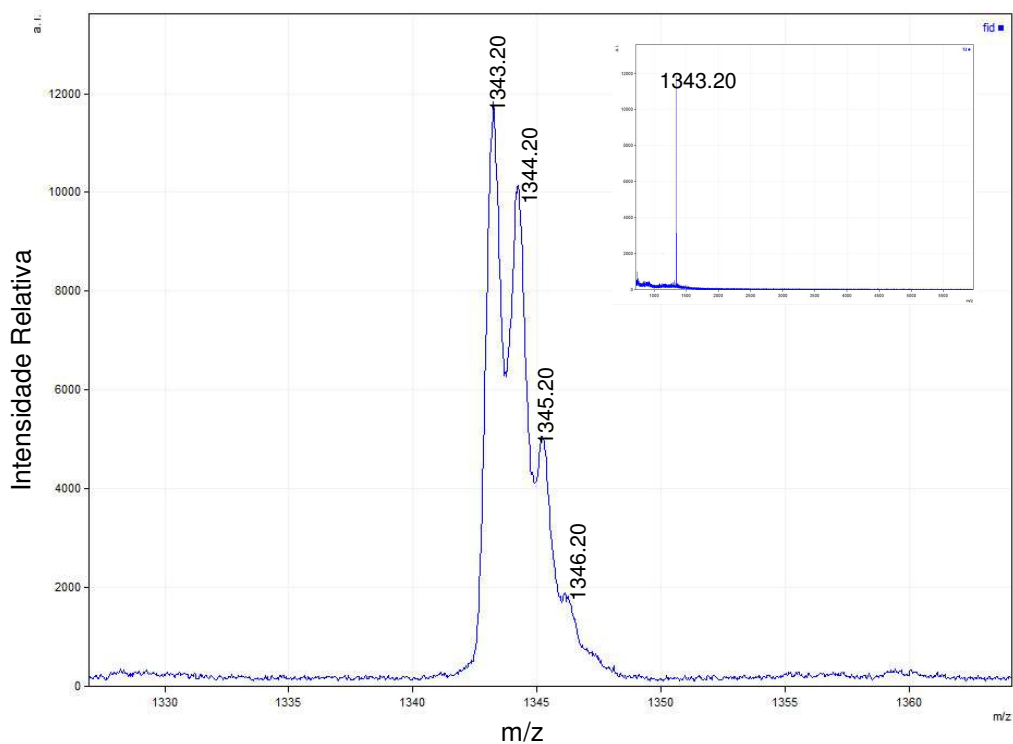


Figura 13. Espectrograma da fração bioativa 21 isolada da secreção cutânea de *P. goyana*, com massa molecular 1343.20 Da  $[M+H]^+$ , ativa contra a bactéria *P. aeruginosa*, com uma inibição de cerca de 40%. Inseto. Visão ampla do espectro evidenciando o grau de pureza dessa fração.

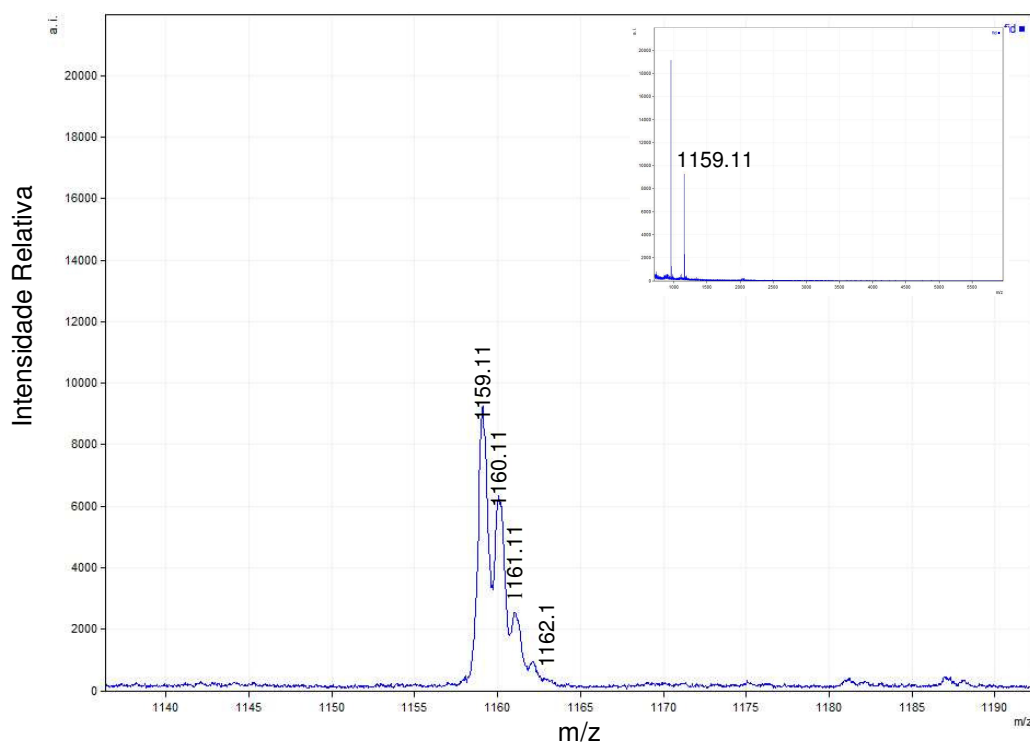


Figura 14. Espectrograma da fração bioativa 33 isolada da secreção cutânea de *P. goyana*, com massa molecular 1159.11 Da  $[M+H]^+$ , ativa contra a bactéria *P. aeruginosa*, com uma inibição de aproximadamente de 24%. Inseto. Visão ampla do espectro evidenciando o grau de pureza dessa fração.

Também foi realizado o agrupamento dos componente moleculares detectados em todas as frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da secreção cutânea de *P. goyana* por RP-HPLC em coluna C<sub>18</sub> (Figura 15). Pode-se observar claramente a predominância de peptídeos de baixa massa molecular (abaixo de 1.5 kDa).

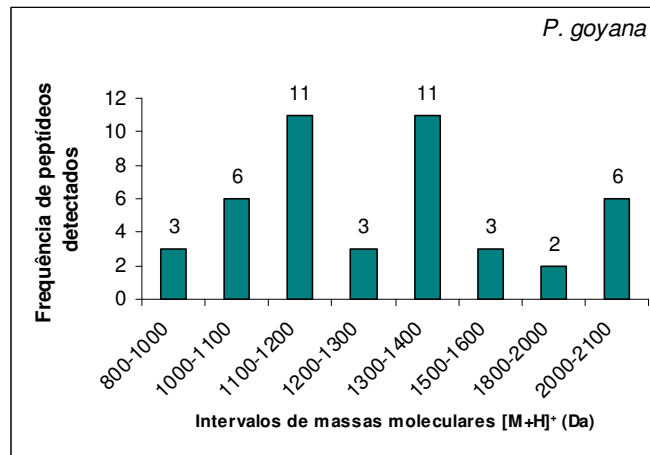


Figura 15. Frequência da composição peptídica da secreção cutânea de *P. goyana* representadas em grupos de massas moleculares monoisotópicas obtidas pela análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF nos modos refletido (matriz ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxi-cinâmico) e linear (matriz ácido sinapínico). O ensaio foi realizado empregando-se as frações provenientes de uma corrida de RP-HPLC.

A figura 16. Apresenta a distribuição dos componentes moleculares detectados em função da suas massas moleculares na análise por MALDI-TOF MS com relação aos seus tempos de retenção em sistema RP-HPLC. Todas as frações observadas apresentam massas moleculares abaixo de 2.4 kDa (utilizando uma faixa de prospecção de m/z de 500 à 20.000).

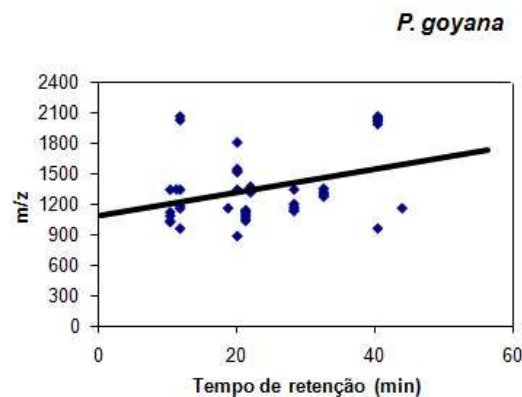


Figura 16. Distribuição dos componentes moleculares detectados em função da suas massas moleculares na análise por MALDI-TOF MS com relação aos seus tempos de retenção em sistema RP-HPLC.

#### 5.1.4. Purificação de peptídeos bioativos

A fim de se obter um maior número de frações puras, a fração bioativa 22 foi submetida à recromatografia para purificação dos componentes responsáveis pela atividade biológica apresentada (Figura 17).

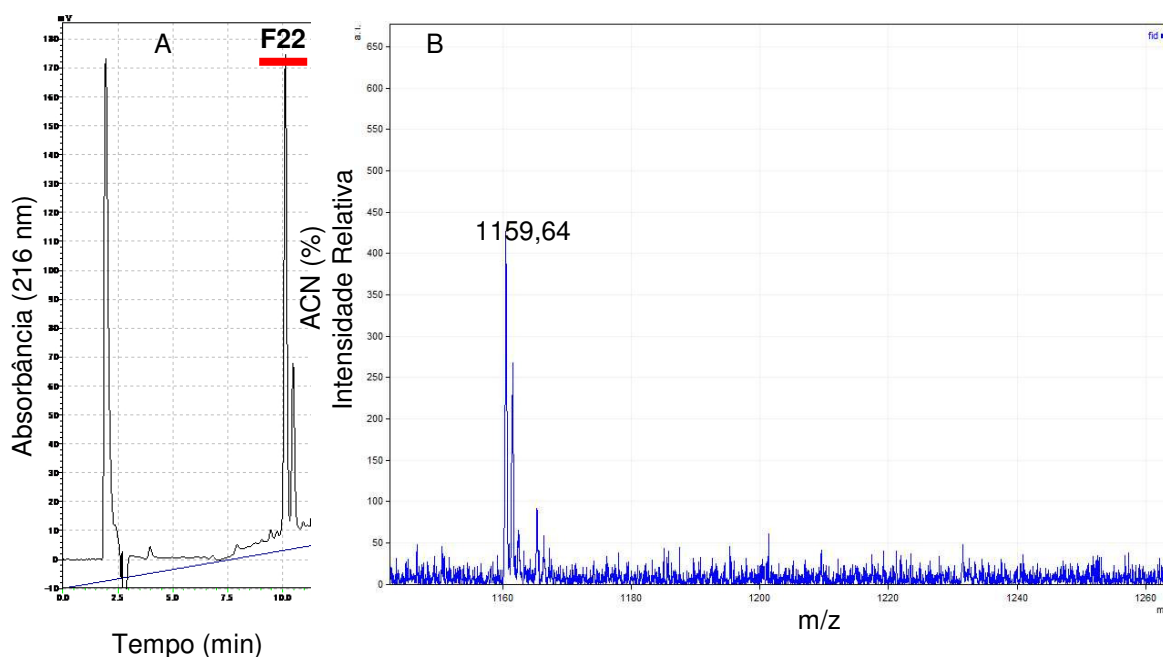


Figura 17. (A) Purificação do peptídeo bioativo 22 de *P. goyana*. Recromatografia realizada em sistema de RP-HPLC em coluna analítica C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS 4,6 x 150 mm). A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min, com um gradiente de 0-20% de acetonitrila/TFA 0,1% em 30 minutos. (B) Espectrograma de massa em sistema MALDI-TOF, modo refletido, matriz reconstituída de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) da fração 22 (indicada como F.22).

## 5.2. *Physalaemus fuscumaculatus*

### 5.2.1. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea

Alíquotas de 5,0 mg da secreção bruta de *Physalaemus fuscumaculatus* foram inicialmente fracionadas em coluna C<sub>18</sub> por RP-HPLC a um fluxo de 1 mL/min, obtendo-se o perfil cromatográfico abaixo (Figura 18). O perfil apresentou uma boa reprodutibilidade ao longo das corridas cromatográficas realizadas, totalizando uma média de 112 frações coletadas manualmente.

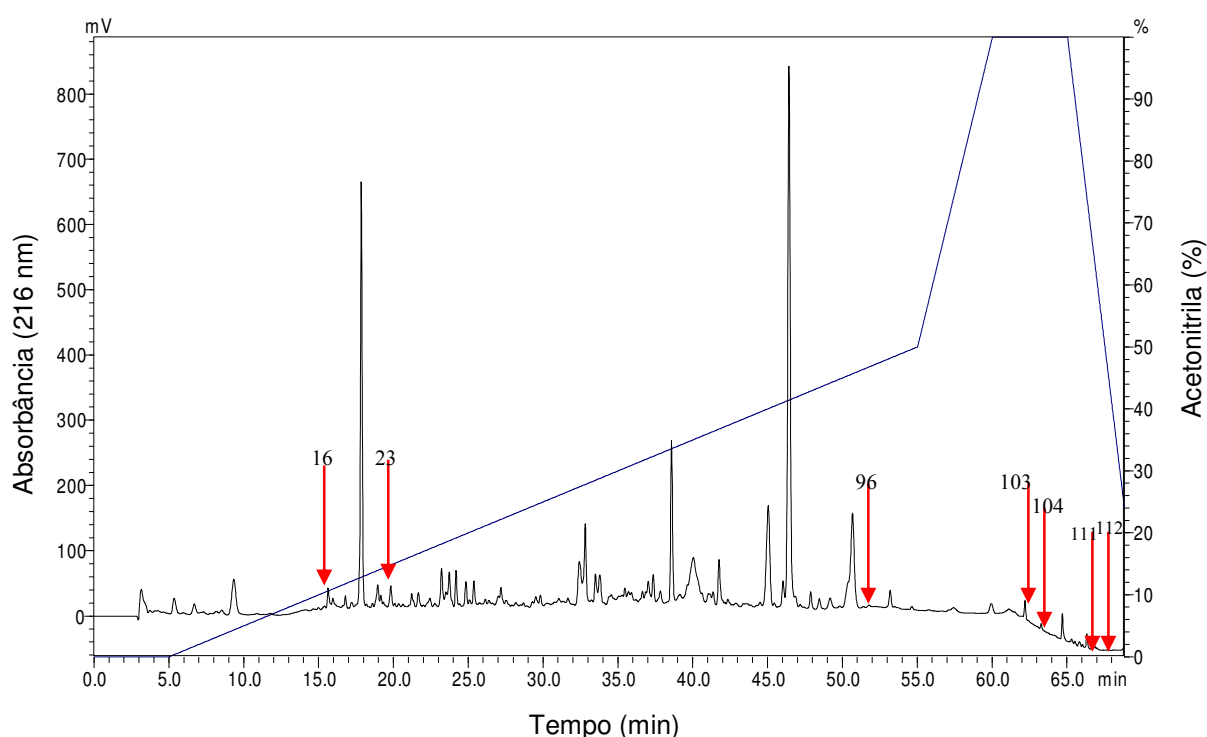


Figura 18. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *P. fuscumaculatus* em coluna C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS, 6.0 x 150 mm) em sistema HPLC da Shimadzu com emprego de gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila. A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min. As frações contendo os peptídeos utilizados ao longo do presente trabalho estão indicadas com números que correspondem à sua ordem de eluição e possuem os seguintes tempos de retenção: Fração **16**: 16.04; Fração **23**: 19.25; Fração **96**: 51.83; Fração **103**: 62.25; Fração **104**: 63.37; Fração **111**: 66.86 e Fração **112**: 67.24 min.

## 5.2.2. Ensaios preliminares das atividades antimicrobiana e hemolítica

A partir das frações cromatográficas obtidas de uma única corrida cromatográfica, realizou-se um ensaio preliminar para avaliação da atividade antimicrobiana (empregando-se as bactérias Gram-positiva *S. aureus* e Gram-negativa *P. aeruginosa*). Sete das frações testadas apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento microbiano das linhagens bacterianas testadas.

Atividades inibitórias foram detectadas em quatro frações testadas contra *S. aureus* e três frações foram ativas contra *P. aeruginosa* (Tabela 3). As frações 103, 104, 111, e 112 foram ativas contra *S. aureus*, apresentando uma inibição do crescimento bacteriano de até 70%. As frações 16, 23 e 96 demonstraram atividade inibitória sobre o crescimento da bactéria *P. aeruginosa*, com uma inibição de até 37%.

Também foi realizado ensaio biológico com o intuito de constatar a presença de atividade hemolítica nas frações testadas. Nenhuma das 112 frações foi capaz de promover hemólise nas concentrações utilizadas.

Tabela. 3. Avaliação da atividade inibitória sobre o crescimento das bactérias patogênicas *S. aureus* e *P. aeruginosa* das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da secreção cutânea *P. fuscumaculatus* em RP-HPLC C<sub>18</sub>.

Fração cromatográfica	Bactéria empregada	Taxa de inibição do crescimento bacteriano (%)
16	<i>P. aeruginosa</i>	24.1
23	<i>P. aeruginosa</i>	19.7
96	<i>P. aeruginosa</i>	36.8
103	<i>S. aureus</i>	30.5
104	<i>S. aureus</i>	59.4
111	<i>S. aureus</i>	19.1
112	<i>S. aureus</i>	70.5



### 5.2.3. Análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF das frações bioativas

As frações cromatográficas que apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento microbiano foram reunidas e analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (Tabela 4).

Tabela 4. Massas moleculares  $[M+H]^+$  dos componentes moleculares detectados presentes nas frações cromatográficas obtidas com o fracionamento em RP-HPLC da secreção cutânea de *P. fuscumaculatus*. Dados obtidos a partir de análise em espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF, nos modos refletido e linear.

Fração cromatográfica	Massa molecular $[M+H]^+$ dos componentes moleculares detectados					
2	1142,36	1142,34	1296,16	<b>1338,47</b>		
4	869,31	888,54	<b>1338,47</b>			
16	<b>888,54</b>	907,77	1080,82	<b>1103,89</b>	1507,67	<b>2661,33</b>
23	887,36	1032,46	1139,39	1466,37	<b>2663,02</b>	<b>3136,53</b>
27	852,99	<b>1341,77</b>	<b>3136,53</b>			
32	<b>965,98</b>	1341,14	<b>1544,09</b>			
87	1410,23	<b>1546,78</b>	2179,88	4048,15		
96	<b>1543,74</b>	1710,97	<b>2293,18</b>			
100	1722,45	<b>2288,26</b>	2319,01			
101	1532,22	<b>1874,22</b>	2289,50	<b>2320,04</b>	<b>2717,00</b>	
103	1543,74	1766,72	<b>1803,88</b>			
104	866,55	1336,79	<b>1544,44</b>	1617,72		
105	890,98	<b>1287,94</b>	1336,79			
111	<b>1293,52</b>					
112	<b>1671,42</b>					

\*Algumas frações cromatográficas não foram relacionadas devido a falhas na sua ionização ou em virtude de baixa quantidade de material disponível

\*\*Em negrito, destacam-se os componentes moleculares mais abundantes nas frações cromatográficas analisadas.

As massas moleculares monoisotópicas dos componentes moleculares presentes nas frações cromatográficas bioativas responsáveis pela atividade biológica é mostrada a seguir.

É importante ressaltar que a grande maioria das frações cromatográficas analisadas não se apresentaram puras, com exceção das duas últimas frações eluídas com o gradiente empregado, ambas ativas contra *S. aureus*, com componentes de massa molecular de 1293,52 Da  $[M+H]^+$  e 1671,42 Da  $[M+H]^+$ , respectivamente (Figuras 19 e 20).

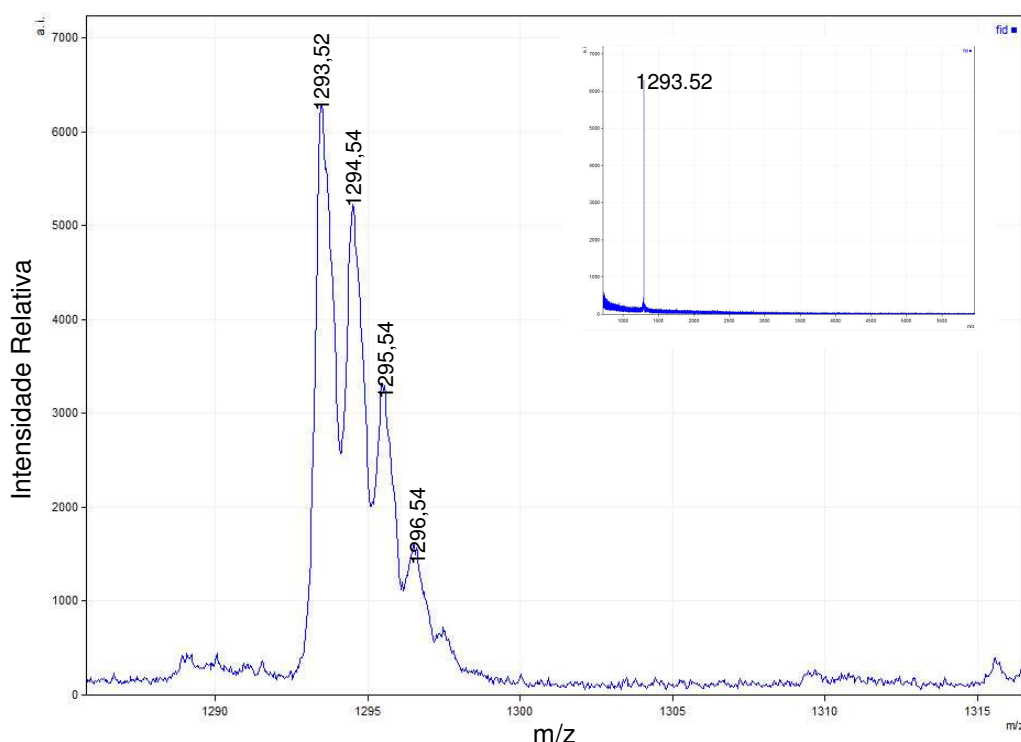


Figura 19. Espectrograma da fração bioativa 111 isolada da secreção cutânea de *P. fuscumaculatus*, com massa molecular 1293.52 Da  $[M+H]^+$ , ativa contra a bactéria *S. aureus*, com uma inibição de cerca de 19%. Inseto. Visão ampla do espectro evidenciando o grau de pureza dessa fração.

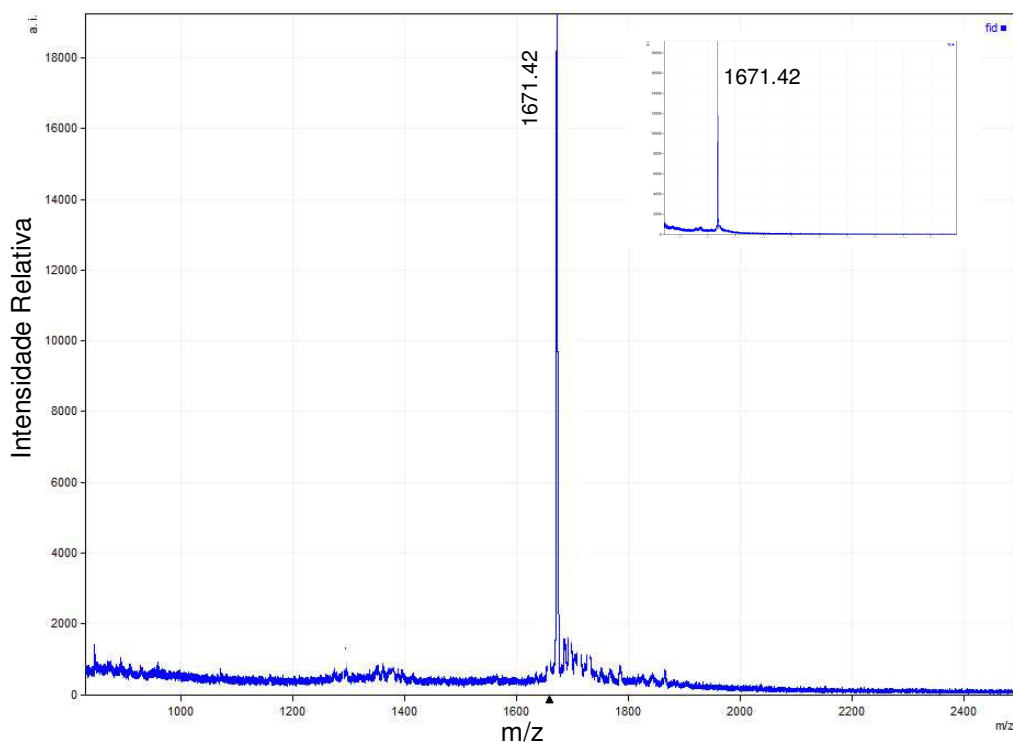


Figura 20. Espectrograma da fração bioativa 112 isolada da secreção cutânea de *P. fuscumaculatus*, com massa molecular 1671.42 Da  $[M+H]^+$ , ativa contra a bactéria *S. aureus*, com uma inibição de cerca de 70%. Inseto. Visão ampla do espectro evidenciando o grau de pureza dessa fração.

Também foi realizado o agrupamento dos componentes moleculares detectados em todas as frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da secreção cutânea de *P. fuscumaculatus* por RP-HPLC em coluna  $C_{18}$  (Figura 21).

Pode-se observar claramente a predominância de peptídeos de baixa massa molecular (abaixo de 1.7 kDa), no entanto diferentemente do observado para a secreção cutânea de *P. goyana*, observa-se a presença de peptídeos com massas moleculares mais altas entre 1.7 e 4.1 kDa.

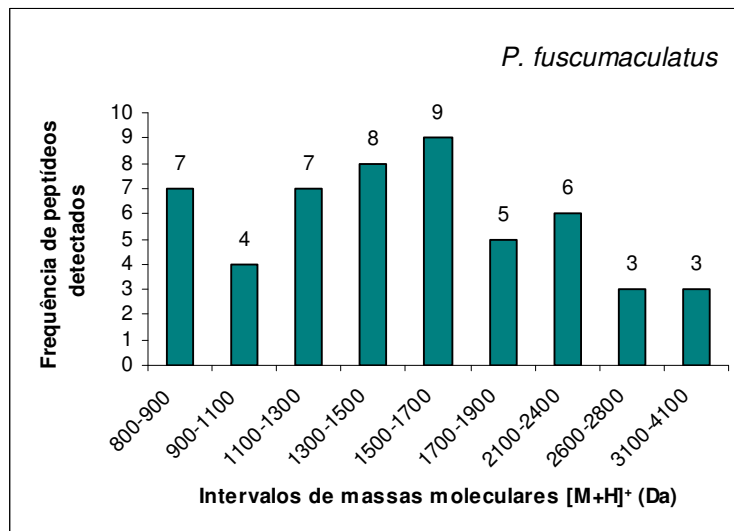


Figura 21. Frequência da composição peptídica da secreção cutânea de *P. fuscumaculatus* representadas em grupos de massas moleculares monoisotópicas obtidas pela análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF nos modos refletido (matriz ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxi-cinâmico) e linear (matriz ácido sinapínico). O ensaio foi realizado empregando-se as frações provenientes de uma corrida de RP-HPLC.

A figura 22. apresenta a distribuição dos componentes moleculares detectados em função da suas massas moleculares na análise por MALDI-TOF MS com relação aos seus tempos de retenção em sistema RP-HPLC. Todas as frações observadas apresentam massas moleculares abaixo de 4.2 kDa (utilizando uma faixa de prospecção de  $m/z$  de 500 à 20.000).

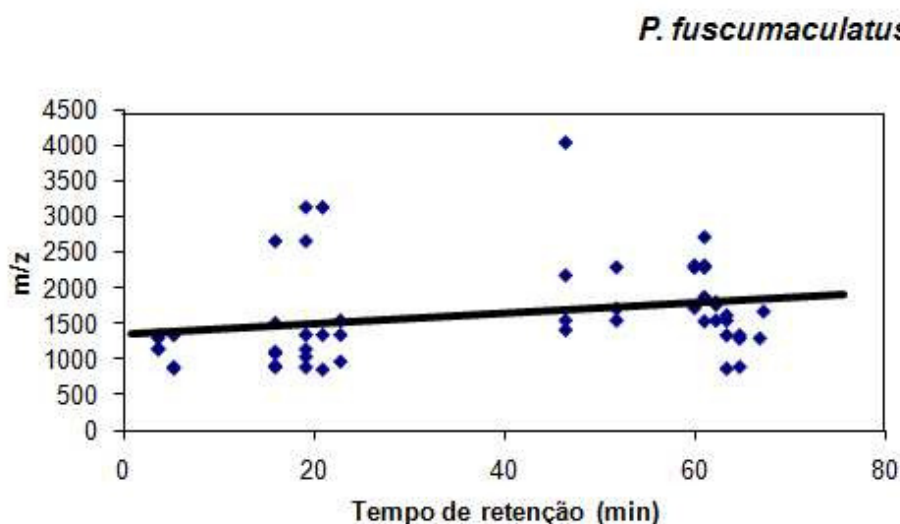


Figura 22. Distribuição dos componentes moleculares detectados em função da suas massas moleculares na análise por MALDI-TOF MS com relação aos seus tempos de retenção em sistema RP-HPLC.

## 5.2.4. Purificação de peptídeos bioativos

A fim de se obter um maior número de frações puras, a fração bioativa 23 foi submetida à recromatografia para purificação dos componentes responsáveis pela atividade biológica apresentada (Figura 23).

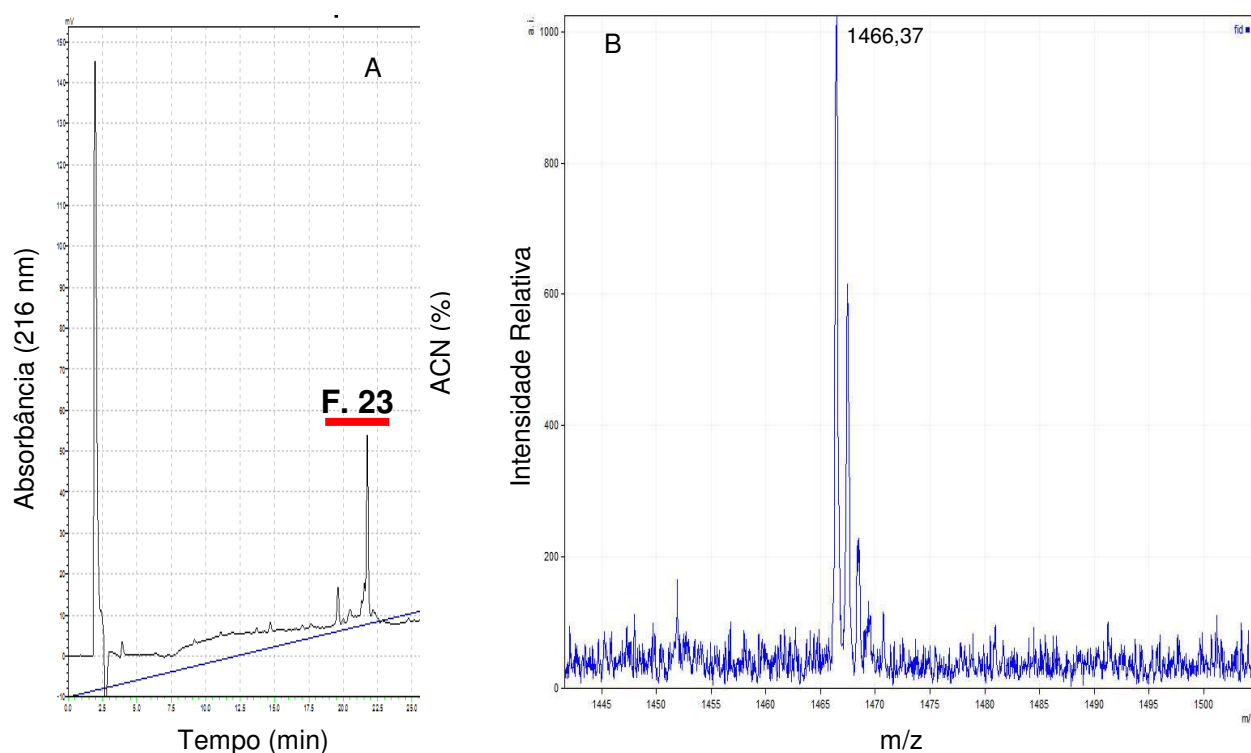


Figura 23. (A). Purificação do peptídeo bioativo 23 de *P. fuscumaculatus*. Recromatografia realizada em sistema de RP-HPLC em coluna analítica C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS 4,6 x 150 mm). A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min, com um gradiente de 0-25% de acetonitrila/TFA 0,1% em 30 minutos. (B). Espectrograma de massa em sistema MALDI-TOF, modo refletido, matriz reconstituída de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) da fração 23 (indicada como F.23).

### 5.3. *Physalaemus centralis*

#### 5.3.1. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea

Alíquotas de 5,0 mg da secreção bruta de *Physalaemus centralis* foram inicialmente fracionadas em coluna C<sub>18</sub> por RP-HPLC a um fluxo de 1 mL/min, obtendo-se o perfil cromatográfico abaixo (Figura 24). O perfil apresentou uma boa reprodutibilidade ao longo das corridas cromatográficas realizadas, totalizando uma média de 120 frações coletadas manualmente.

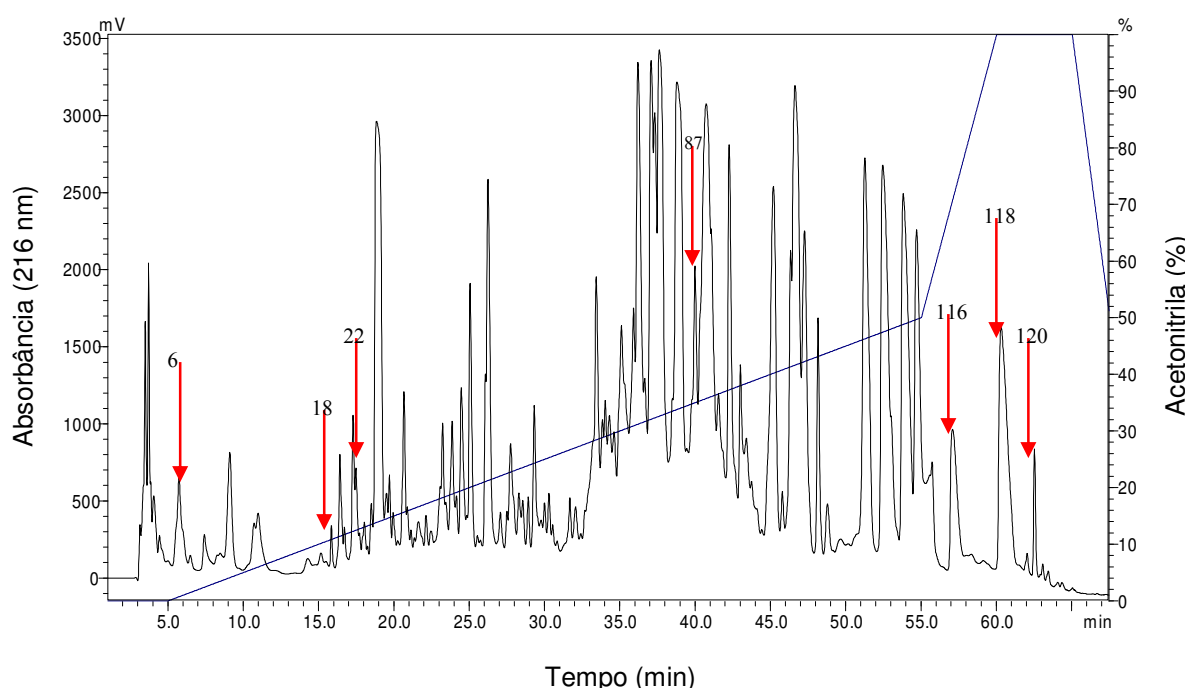


Figura 24. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *P. centralis* em coluna C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS, 6.0 x 150 mm) em sistema HPLC da Shimadzu com emprego de gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila. A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min. As frações contendo os peptídeos utilizados ao longo do presente trabalho estão indicadas com números que correspondem à sua ordem de eluição e possuem os seguintes tempos de retenção: Fração **6**: 5.78; Fração **18**: 15.89; Fração **22**: 17.54; Fração **87**: 40.02; Fração **116**: 57.13; Fração **118**: 60.38 e Fração **120**: 62.55.

### 5.3.2. Ensaios preliminares das atividades antimicrobiana e hemolítica

A partir das frações cromatográficas obtidas de uma única corrida cromatográfica, realizou-se um ensaio preliminar para avaliação da atividade antimicrobiana (empregando-se as bactérias Gram-positiva *S. aureus* e Gram-negativa *P. aeruginosa*). Atividades inibitórias sobre o crescimento de *S. aureus* foram detectadas em seis frações e apenas uma fração foi ativa contra *P. aeruginosa* (Tabela 5).

As frações 6, 22, 87, 116, 118, e 120 foram ativas contra *S. aureus* e apresentaram um percentual de inibição de até 31%. Somente a fração 18 mostrou-se capaz de promover leve inibição (em torno de 20%) no crescimento da bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*.

Também foi realizado ensaio biológico com o intuito de constatar a presença de atividade hemolítica nas frações testadas. Nenhuma das 120 frações foi capaz de promover hemólise nas concentrações utilizadas.

Tabela. 5. Avaliação da atividade inibitória sobre o crescimento das bactérias patogênicas *S. aureus* e *P. aeruginosa* das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da secreção cutânea *P. centralis* em RP-HPLC C<sub>18</sub>.

Fração cromatográfica	Bactéria empregada	Taxa de inibição do crescimento bacteriano (%)
6	<i>S. aureus</i>	14.0
18	<i>P. aeruginosa</i>	20.0
22	<i>S. aureus</i>	30.5
87	<i>S. aureus</i>	27.1
116	<i>S. aureus</i>	30.8
118	<i>S. aureus</i>	14.5
120	<i>S. aureus</i>	23.7

### 5.3.3. Análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF das frações bioativas

As frações cromatográficas que apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento microbiano foram reunidas e analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (Tabela 6).

Tabela 6. Massas moleculares  $[M+H]^+$  dos componentes moleculares detectados presentes nas frações cromatográficas obtidas com o fracionamento em RP-HPLC da secreção cutânea de *P. centralis*. Dados obtidos a partir de análise em espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF, nos modos refletido e linear.

Fração cromatográfica	Massa molecular $[M+H]^+$ dos componentes moleculares detectados						
1	893,40	1141,15	<b>1165,93</b>	<b>1178,31</b>	1271,22		
6	1196,89	1271,22	<b>1295,99</b>	1314,58	1333,16	1351,74	5730,60
13	<b>959,83</b>	1156,64	<b>2029,95</b>				
18	818,38	1082,83	<b>1156,64</b>	1285,79	1341,14		
21	1445,69	<b>1507,19</b>	1544,09	1802,40	2202,15		
22	1082,83	1138,18	1341,14	<b>1507,19</b>	2177,55	<b>2663,41</b>	
25	1081,97	1269,20	<b>1487,64</b>				
26	1156,64	1341,14	1470,29	<b>1507,19</b>	2177,55	<b>2663,41</b>	
37	<b>886,03</b>	1156,64	<b>1341,14</b>	1445,69	1814,70	2177,55	
40	955,11	<b>1158,26</b>	<b>1336,78</b>	<b>1484,52</b>	1539,92		
46	959,83	1138,18	1193,54	<b>1341,14</b>	<b>1488,74</b>	1544,09	
87	910,63	<b>1624,04</b>	<b>1671,20</b>	2085,30	2565,01		
89	<b>976,48</b>	994,80	1013,12	<b>2087,97</b>	<b>3205,57</b>		
91	<b>1475,61</b>	<b>1797,69</b>	<b>2578,10</b>	3754,90			
93	<b>1512,77</b>	<b>1797,69</b>	3247,02	3624,84			
95	1457,03	<b>1512,77</b>	<b>1779,11</b>	3878,78			
96	1562,32	1636,65	<b>1673,81</b>	1710,97	<b>1766,72</b>	2776,30	3005,46
116	1562,32	<b>1673,81</b>	1692,39	1766,72	1822,46	2776,30	3005,46
118	<b>1791,76</b>						
120	1611,87	1766,72	<b>1810,07</b>				

\*\*Algumas frações não estão relacionadas devido as suas massas não terem sido ionizadas ou não detectadas.

\*\*\* Em negrito destacam-se os dois componentes mais abundantes e freqüentes.



As frações ativas contra *S. aureus* foram analisadas por MALDI-TOF MS, a fim de se avaliar seu grau de homogeneidade, bem como determinar as massas moleculares dos componentes presentes nessas amostras. É importante ressaltar que as frações analisadas não se apresentaram puras (como pode ser observado na tabela 6), com exceção apenas da penúltima fração eluída com o gradiente empregado, ativa contra *S. aureus*, com componente de massa molecular 1774,92 Da  $[M+H]^+$  (Figura 25).

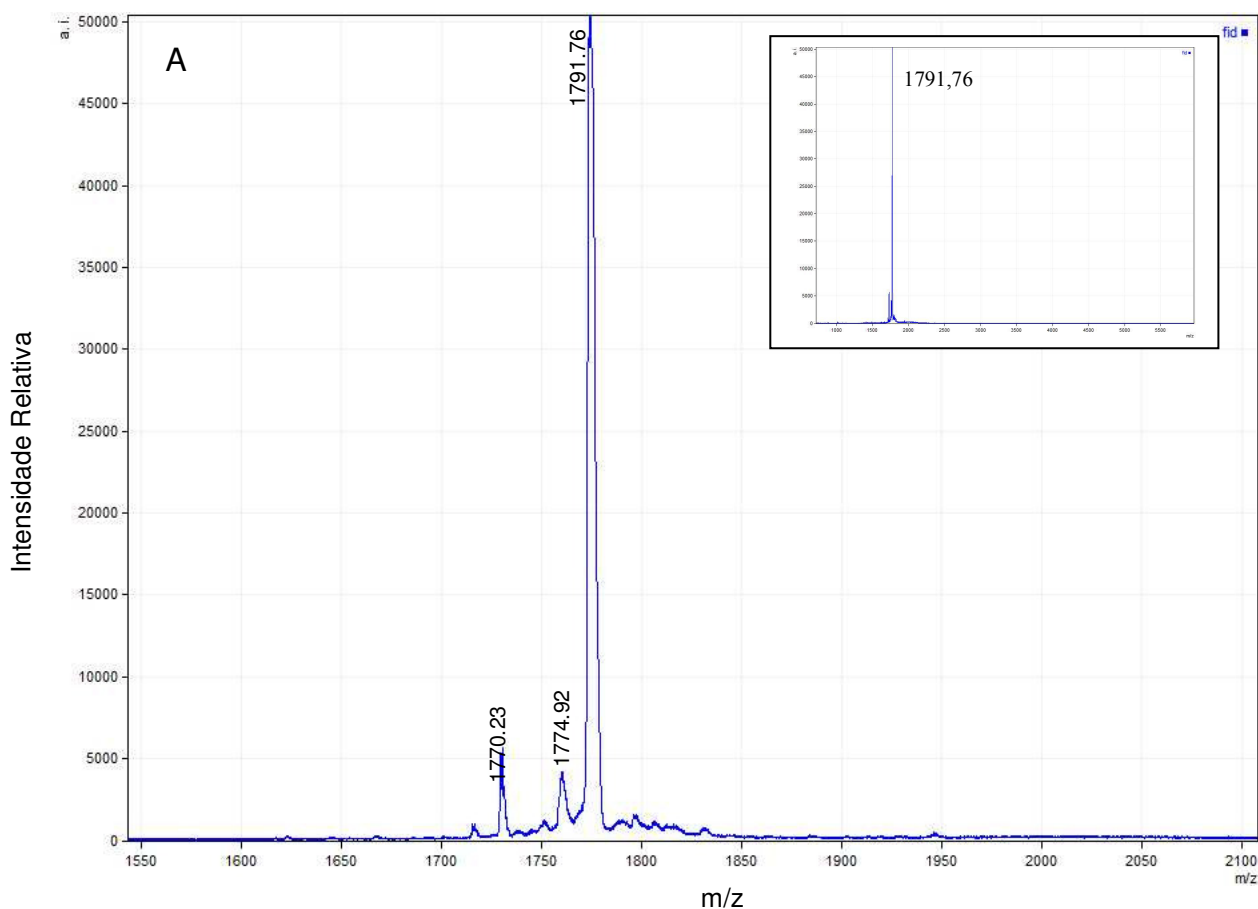


Figura 25. Espectrograma da fração bioativa 118 isolada da secreção cutânea de *P. centralis*, com massa molecular 1774.92 Da  $[M+H]^+$ , ativa contra a bactéria *S. aureus*, com uma inibição de cerca de 15%. Inseto. Visão ampla do espectro evidenciando o grau de pureza dessa fração.

Também foi realizado o agrupamento dos componente moleculares detectados em todas as frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da secreção cutânea de *P. centralis* por RP-HPLC em coluna  $C_{18}$  (Figura 26).

Pode-se observar claramente a predominância de peptídeos na faixa de massa molecular de 1.3 a 1.7 kDa.

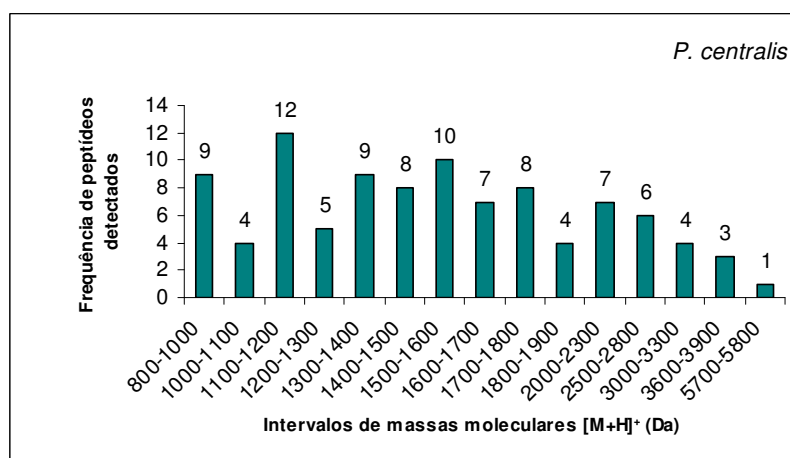


Figura 26. Frequência da composição peptídica da secreção cutânea de *P. centralis* representadas em grupos de massas moleculares monoisotópicas obtidas pela análise por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF nos modos refletido (matriz ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxi-cinâmico) e linear (matriz ácido sinapínico). O ensaio foi realizado empregando-se as frações provenientes de uma corrida de RP-HPLC.

A figura 27 mostra a distribuição de massas moleculares encontradas na secreção cutânea de *P. centralis* por MALDI-TOF com relação ao tempo de retenção e porcentagem de acetonitrila necessária para a eluição em sistema RP-HPLC. Todas as frações observadas apresentam massas moleculares abaixo de 6 kDa (utilizando intervalo de faixa de prospecção de 500 à 20000 m/z).

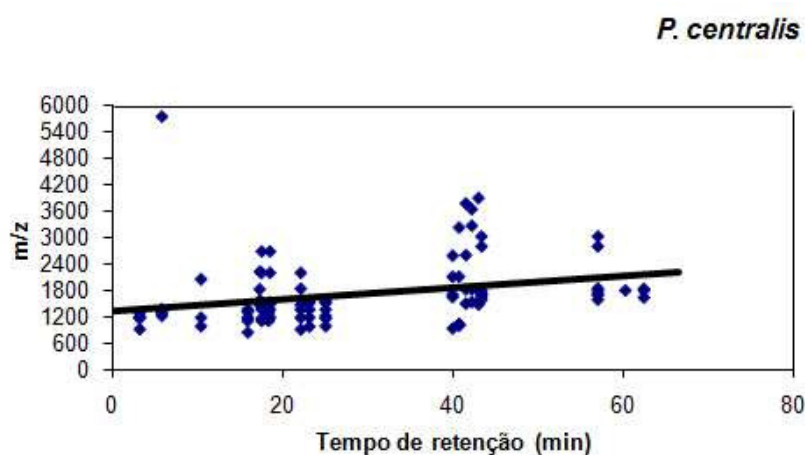


Figura 27. Distribuição dos componentes moleculares detectados em função da suas massas moleculares na análise por MALDI-TOF MS com relação aos seus tempos de retenção em sistema RP-HPLC.

### 5.3.4. Purificação de peptídeos bioativos

A fim de se obter um maior número de frações puras, a fração bioativa 87 (Figura 26) foi submetida à recromatografia para purificação dos componentes responsáveis pela atividade biológica apresentada.

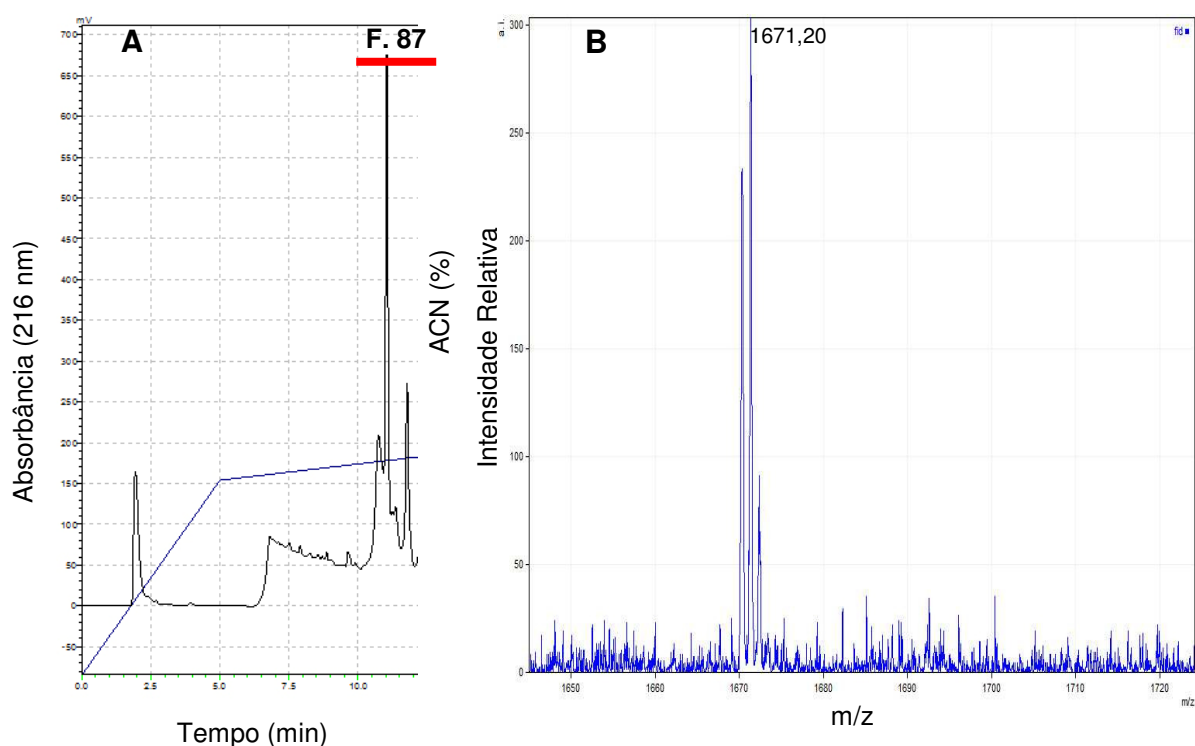


Figura 28. (A) Purificação do peptídeo bioativo 87 de *P. centralis*. Recromatografia realizada em sistema de RP-HPLC em coluna analítica C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS 4,6 x 150 mm). A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min, com um gradiente de 30-40% de acetonitrila/TFA 0,1% em 25 minutos. (B) Espectrograma de massa em sistema MALDI-TOF, modo refletido, matriz reconstituída de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) da fração 87 (indicada como F87)

## 5.4. *Hypsiboas albopunctatus*

### 5.4.1. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) para os peptídeos *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus*

As duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu ou Ile na porção C-terminal foram testadas frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de modo a se determinar seus MICs nas condições experimentais empregadas. Foi possível observar que as duas versões possuem atividades semelhantes frente as linhagens bacterianas Gram-negativas (Tabela 7) e Gram-positivas (Tabela 8) empregadas.

Tabela 7. Atividade antimicrobiana (MICs) das duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu ou Ile na porção C-terminal frente a linhagens bacterianas Gram-negativas.

MIC ( $\mu\text{M}$ )					
Peptídeo <i>ceratoxin-like</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
ILE	4 $\mu\text{M}$	8 $\mu\text{M}$	4 $\mu\text{M}$	Não houve inibição	4 $\mu\text{M}$
LEU	4 $\mu\text{M}$	8 $\mu\text{M}$	4 $\mu\text{M}$	Não houve inibição	4 $\mu\text{M}$

Tabela 8. Atividade antimicrobiana (MICs) das duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu ou Ile na porção C-terminal frente a linhagens bacterianas Gram-positivas.

MIC ( $\mu\text{M}$ )				
Peptídeo <i>ceratoxin-like</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
ILE	2 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	4 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$
LEU	2 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	4 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$

## 5.4.2. Tratamento das células cancerígenas e normais com os peptídeos *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus*

### 5.4.2.1. Efeitos sobre a viabilidade celular

As duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu ou Ile na porção C-terminal foram dissolvidos em meio de cultura DMEM completo (tamponado com bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico) e incubados por 48 horas com linhagens celulares de câncer de mama humano (MCF-7), de colo uterino humano (HeLa) e de melanoma murino (B16F10) para avaliação de seus efeitos sobre a viabilidade celular. Para fins de comparação dos efeitos citotóxicos sobre as células tumorais e sobre células normais humanas, tais peptídeos foram também incubados com uma linhagem de células de fibroblastos normais (NHI3T3) pelo mesmo período de tempo.

Os resultados experimentais com as linhagens melanoma murino (B16F10) e com a linhagem celular de câncer de mama (MCF-7) não foram conclusivos, uma vez que as células cresceram demais após o período de 48 horas, inviabilizando assim a sua utilização no caso da B16F10 ou não conseguiram aderir corretamente à placa a placa no caso da MCF-7, inviabilizando também a sua utilização.

O crescimento das linhagens de células HeLa (células de câncer de colo uterino) e de fibroblastos normais (NHI3T3) foram satisfatórias a realização dos experimentos empregando-se as duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* como ilustrado pelas curvas de morte celular e de viabilidade celular apresentadas nas figuras 29 e 30.

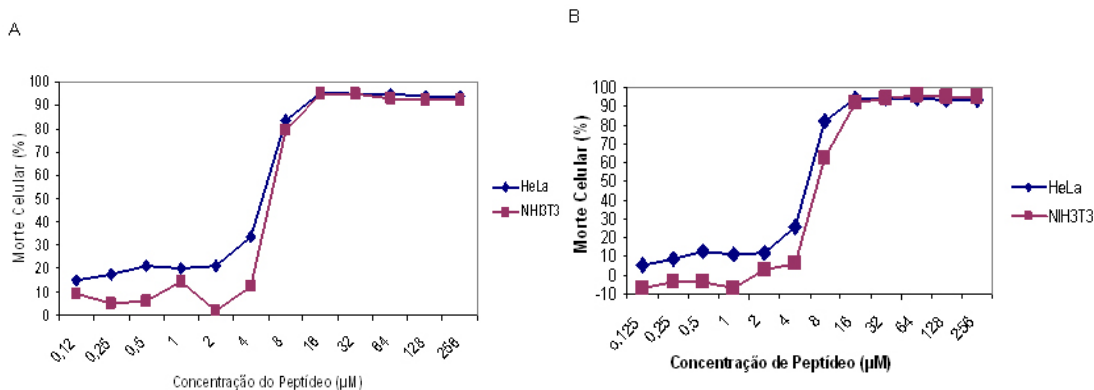


Figura 29. (A) Porcentagem de células mortas das linhagens celulares de câncer de colo uterino (HeLa) e de fibroblasto normal (NIH3T3) após a incubação por 48 horas com diferentes concentrações do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile. Os valores são expressos como média  $\pm$  SD de um experimento feito em duplicata. (B) Porcentagem de células mortas das linhagens celulares de câncer de colo uterino (HeLa) e de fibroblasto normal (NIH3T3) após a incubação por 48 horas com diferentes concentrações do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu. Os valores são expressos como média  $\pm$  SD de um experimento feito em duplicata.

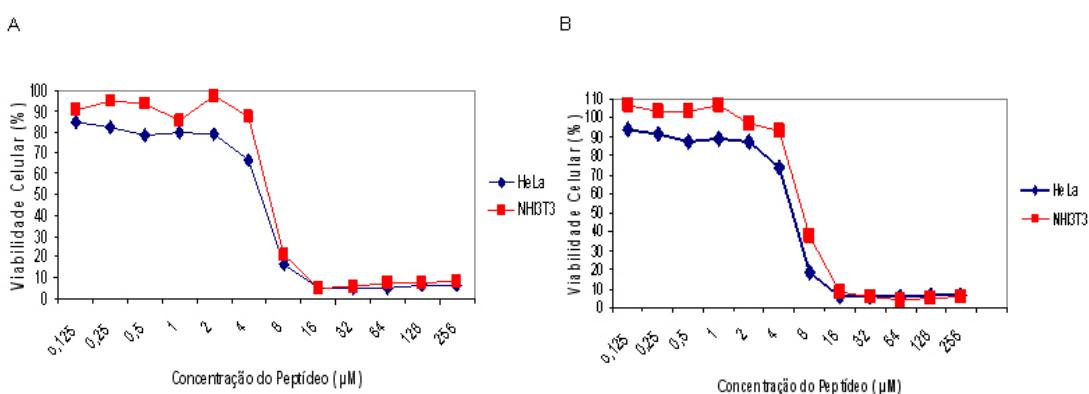


Figura 30. (A) Porcentagem de células viáveis das linhagens celulares de câncer de colo uterino (HeLa) e de fibroblasto normal (NIH3T3) após a incubação por 48 horas com diferentes concentrações do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile. Os valores são expressos como média  $\pm$  SD de um experimento feito em duplicata. (B) Porcentagem de células viáveis das linhagens celulares de câncer de colo uterino (HeLa) e de fibroblasto normal (NIH3T3) após a incubação por 48 horas com diferentes concentrações do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu. Os valores são expressos como média  $\pm$  SD de um experimento feito em duplicata.

#### 5.4.2.2. Efeitos sobre a morfologia celular

As células de câncer de colo uterino (HeLa) e as células de fibroblastos normais foram inspecionadas quanto à alterações na morfologia celular empregando-se microscopia de contraste de fase após incubação na presença dos peptídeos *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus*.

As células dos controles empregados nos experimentos realizados (ou seja, incubação por 48 horas na ausência dos peptídeos-teste) apresentaram morfologia bem definida, membrana citoplasmática íntegra, núcleo e nucléolos definidos (Figuras 31A, 32A, 33A, e 34A).

No caso das células incubadas por 48 horas com os peptídeos-teste na concentração máxima de 256  $\mu\text{M}$ , foi observado alterações na perda do formato celular, ausência de núcleo e nucléolos definidos (Figuras 31C, 32C, 33C, e 34C).

As linhagens celulares em estudo foram incubadas com os peptídeos-teste desde a concentração máxima de 256  $\mu\text{M}$  até a concentração de 8  $\mu\text{M}$  (Figuras 31D, 32D, 33D, e 34D), resultado de diluições seriadas realizadas nas placas. Foi possível perceber claramente o efeito dose-dependente do tratamento, onde altas concentrações dos peptídeos-teste provocaram alterações significativas na morfologia celular, como perda da integridade da membrana e presença de *debris* celulares, ao passo que, na concentração mais baixa empregada de 0,125  $\mu\text{M}$  (Figuras 31B, 32B, 33B, e 34B), a morfologia celular mostrou-se semelhante aos controles empregados, sem alterações morfológicas relevantes.

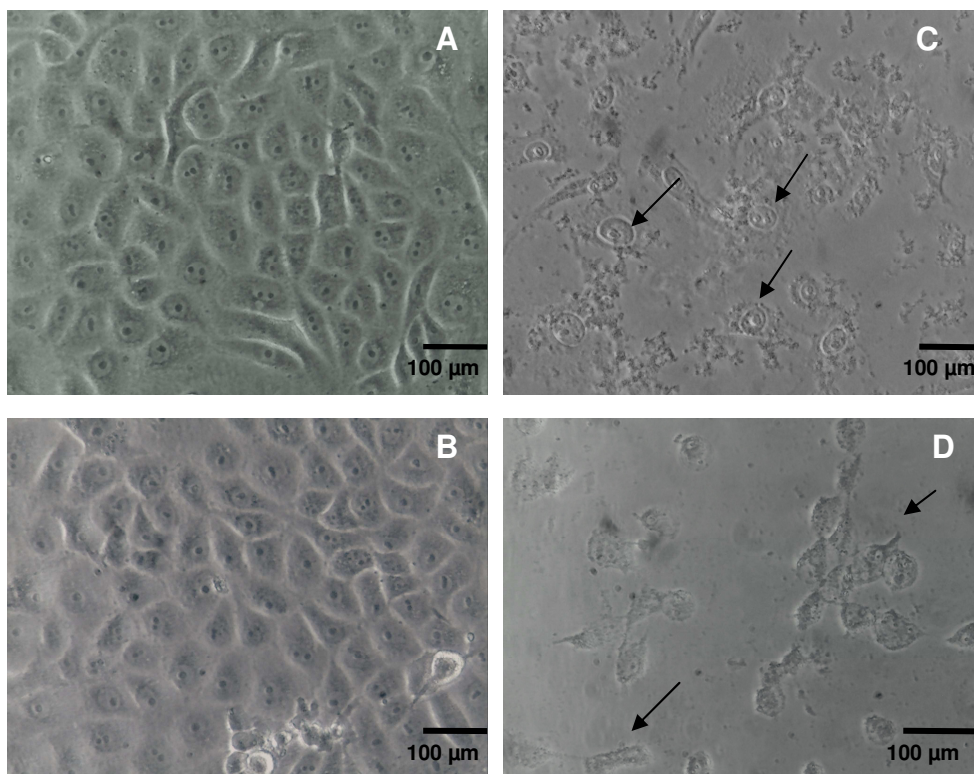


Figura 31. (A) Fotomicrografias de células de câncer de colo do útero (HeLa) após 48 horas de incubação na ausência do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile (controle); (B) Após incubação na menor concentração empregada ( $0,125 \mu\text{M}$ ) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile, onde pode-se observar conservação da morfologia celular à semelhança da situação controle exibida no inserto A; (C) Após incubação na maior concentração empregada ( $256 \mu\text{M}$ ) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile, onde pode-se observar perda da integridade da membrana plasmática e a presença de *debris* celulares (setas); (D) Após incubação na concentração de  $8 \mu\text{M}$  do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile, onde ainda pode-se observar efeitos citotóxicos relevantes. Imagens obtidas por microscópio de contraste de fase. Barra =  $100 \mu\text{m}$ .



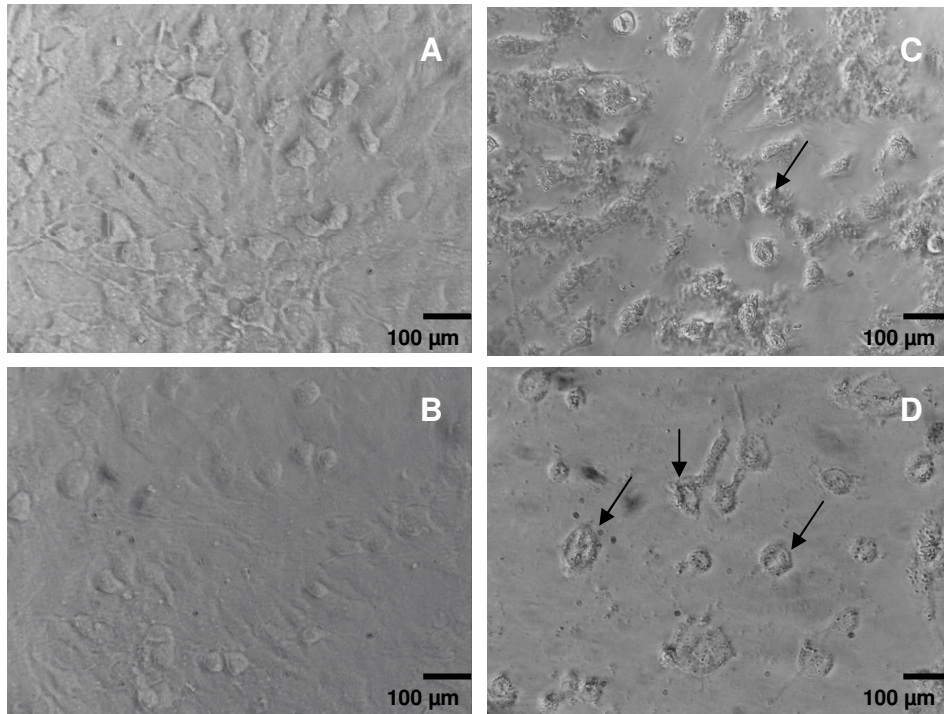


Figura 32. (A) Fotomicrografias de células de fibroblasto normal (NIH3T3) após 48 horas de incubação na ausência do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile (controle); (B) Após incubação na menor concentração empregada (0,125  $\mu\text{M}$ ) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile; (C) Após incubação na maior concentração empregada (256  $\mu\text{M}$ ) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile; (D) Após incubação na concentração de 8  $\mu\text{M}$  do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile. Imagens obtidas por microscópio de contraste de fase. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .

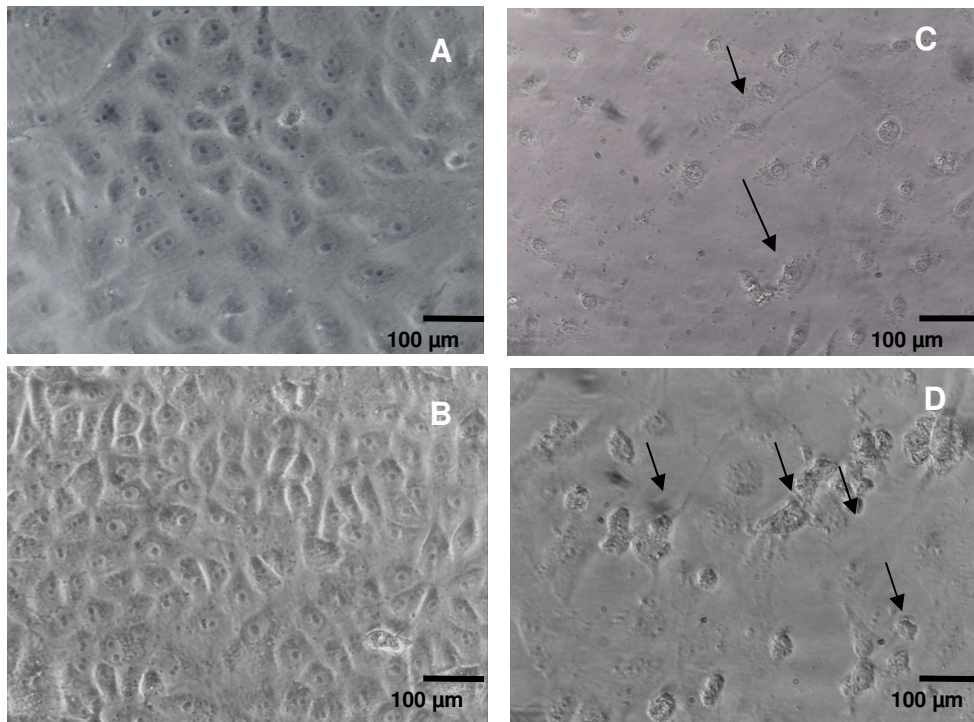


Figura 33. (A) Fotomicrografias de células de câncer de colo do útero (HeLa) após 48 horas de incubação na ausência do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu (controle); (B) Após incubação na menor concentração empregada (0,125  $\mu\text{M}$ ) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu, onde pode-se observar conservação da morfologia celular à semelhança da situação controle exibida no inserto A; (C) Após incubação na maior concentração empregada (256  $\mu\text{M}$ ) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu, onde pode-se observar perda da integridade da membrana plasmática e a presença de *debris* celulares (setas); (D) Após incubação na concentração de 8  $\mu\text{M}$  do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu, onde ainda pode-se observar efeitos citotóxicos relevantes. Imagens obtidas por microscópio de contraste de fase. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .

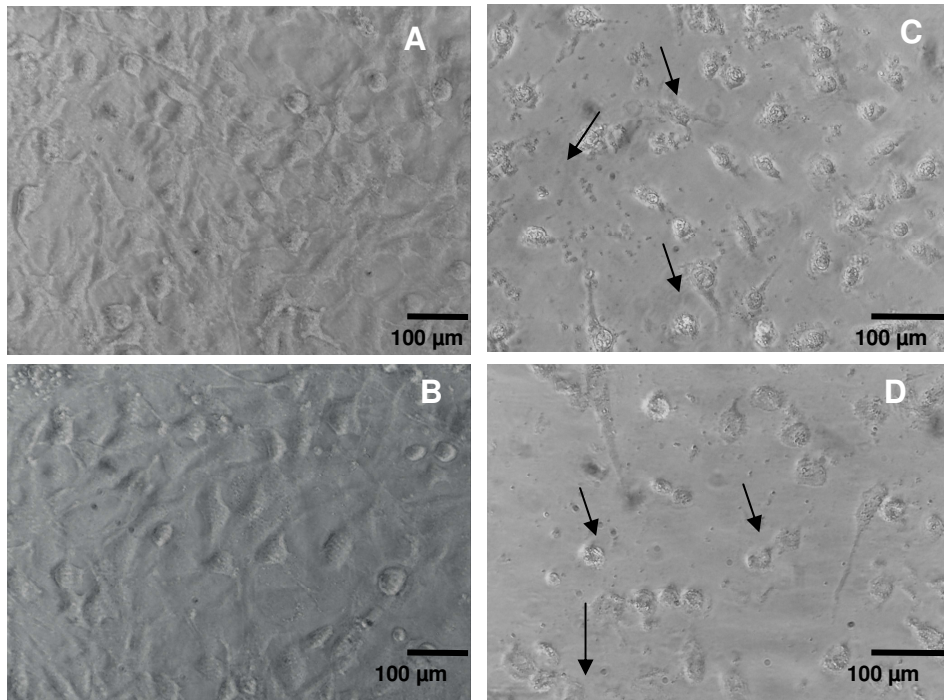


Figura 34. (A) Fotomicrografias de células de fibroblasto normal (NIH3T3) após 48 horas de incubação na ausência do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu (controle); (B) Após incubação na menor concentração empregada (0,125  $\mu\text{M}$ ) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu; (C) Após incubação na maior concentração empregada (256  $\mu\text{M}$ ) do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu; (D) Após incubação na concentração de 8  $\mu\text{M}$  do peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu. Imagens obtidas por microscópio de contraste de fase. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .

A interpretação das curvas dose-resposta obtidas para os dois peptídeos-teste sobre as linhagens (HeLa) e de fibroblastos normais permitiu determinar a concentração capaz de inviabilizar 50% das células ( $IC_{50}$ ). Na figura 35 estão representados os  $IC_{50}$  das duas versões dos peptídeos *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus*. Pode-se constatar claramente um acentuado efeito citotóxico para os dois peptídeos-teste, visto que apresentam atividade deletéria em baixas concentrações (unidade de  $\mu M$ ). Não se pode afirmar que o peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile seja mais potente do que aquele que apresenta Leu no resíduo C-terminal, visto que devem ser realizadas repetições dos experimentos feitos de modo a se avaliar se tais diferenças são estatisticamente significativas.

Os efeitos biológicos deletérios dos peptídeos-teste observados frente à linhagem de câncer de colo uterino (HeLa) também se repetiram quando os peptídeos-teste foram incubados com células de fibroblastos normais, evidenciando certo grau de inespecificidade associado à interação dos peptídeos-teste com membranas biológicas.

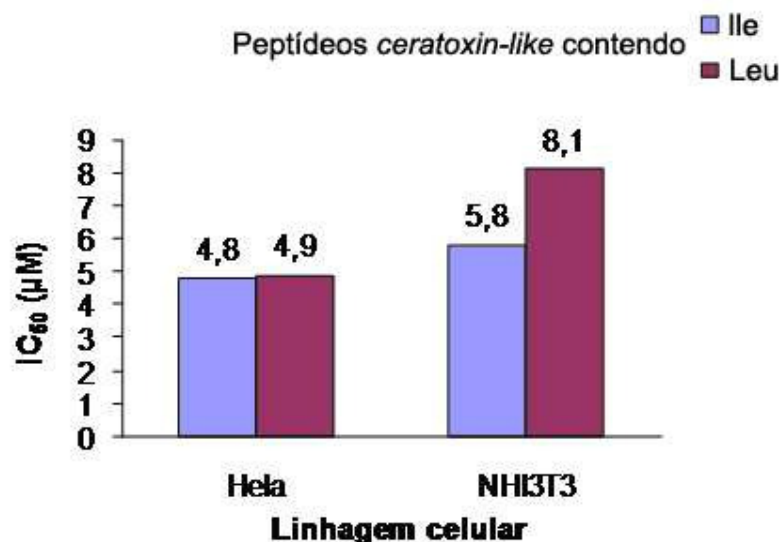


Figura 35. Concentração capaz de reduzir em 50% ( $IC_{50}$ ) a viabilidade celular de células de câncer de colo uterino (HeLa) e de fibroblastos normais (NIH3T3) dos peptídeos *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus* após 48 horas de incubação a 37°C.

## *6. Discussão*

---

## 6. DISCUSSÃO

As secreções cutâneas dos anuros *Proceratophrys goyana*, *Physalaemus fuscumaculatus*, *Physalaemus centralis* e *Hypsiboas albopunctatus* em termos de seu conteúdo peptídico foram objeto de estudo do presente trabalho de mestrado. Tais secreções mostraram-se bastante ricas quimicamente resultando em uma média de 100 a 120 frações eluídas por RP-HPLC em coluna C18 (Figuras 12, 18 e 24).

As secreções glandulares de anfíbios anuros são ricas em componentes moleculares com variadas funções farmacológicas, destacando-se uma grande quantidade de análogos de hormônios de mamíferos e peptídeos com atividade antimicrobiana (Castro *et al* 2009).

O fracionamento de venenos de origem animal com a finalidade de prospecção molecular é comumente realizado com o emprego da cromatografia líquida de alta eficiência em colunas de fase reversa tipo C<sub>18</sub> (RP-HPLC) como etapa inicial. A cromatografia de fase reversa é baseada na hidrofobicidade das moléculas a serem analisadas, e não na polaridade das mesmas, como é observado na cromatografia de fase normal (Joseph e Marsden, 1986). É bom salientar que a cromatografia de fase reversa pode ser utilizada tanto em escala analítica como preparativa. Moléculas que possuem algum grau de hidrofobicidade, tais como proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, compostos orgânicos de baixa massa molecular, podem ser rapidamente fracionadas (Palma *et al.*, 2007) e, em seguida, analisadas por espectrometria de massa.

Nos últimos anos, a espectrometria de massa revolucionou o estudo de proteínas e peptídeos, proporcionando identificação rápida e com alta sensibilidade de amostras procedentes de géis 1D, 2D e de cromatografias líquidas em sistema HPLC. As vantagens na identificação de moléculas empregando-se a espectrometria de massa incluem: alta sensibilidade na escala de femtomoles, identificação de várias proteínas em uma amostra, checagem da pureza de proteínas e peptídeos, identificação de isoformas protéicas, quantificação de cisteínas e localização de

pontes dissulfeto, seqüenciamento de proteínas, identificação de proteínas em análise de proteomas, pesquisa de novas drogas (Cunha *et al.*, 2006; Palma *et al.*, 2007).

Devido à sua complexidade e diversidade, as secreções cutâneas desses animais representam uma fonte abundante de compostos bioativos (principalmente de natureza peptídica ou protéica) e, graças ao desenvolvimento de novas tecnologias, tem sido possível a realização de estudos na área de Toxinologia com pequenas quantidades dessas secreções (Favreau *et al.*, 2006; Editorial, 2006).

A espectrometria de massa tem se constituído em uma das principais ferramentas utilizadas em estudos proteômicos. Trata-se de uma técnica analítica que permite a determinação precisa das massas moleculares dos compostos químicos através da separação dos íons moleculares de acordo com sua relação massa/carga ( $m/z$ ) (Siuzdak, 1996).

Na análise proteômica, é comum o emprego da técnica de MALDI do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, que é um método que produz vaporização e ionização de macromoléculas biológicas não voláteis, direto da fase sólida para a fase gasosa. Nesse caso, o analito é misturado com uma matriz, que é geralmente um composto orgânico de baixa massa molecular, que se cristaliza juntamente com o analito. A presença da matriz protege o analito de degradação, transferindo parte da energia vinda do laser às macromoléculas, resultando em uma leve ionização, permitindo assim, a sua detecção numa forma intacta (Cunha *et al.*, 2006).

A análise dos perfis cromatográficos das secreções cutâneas das três espécies de anuros que foi alvo do presente trabalho, e até momento, nunca estudadas anteriormente, apresentou nos resultados por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF a imensa riqueza química dessas secreções (Tabelas 2, 4 e 6).

De acordo com Zheng e colaboradores (2005), o perfil peptídico da secreção cutânea de anfíbios possui o potencial de ser utilizado para a elucidação de questões de taxonomia biológica, já que o perfil peptídico da secreção de espécimes

da mesma espécie é significativamente similar e, entre espécies do mesmo gênero, existe alguma similaridade.

Outra importante aplicação do perfil peptídico é na identificação de peptídeos funcionais comuns entre diferentes espécies. Entretanto, essa metodologia é limitada para peptídeos sem pontes dissulfeto com massa molecular entre 300 a 4.000 Da (Favreau *et al.*, 2006).

As frações resultantes do fracionamento cromatográfico das espécies *P. goyana*, *P. fuscumaculatus* e *P. centralis* foram submetidas a ensaios biológicos para avaliação de atividades biológicas, antimicrobiana e hemolítica. Tais ensaios foram realizados inicialmente como ensaios de varredura (*screening*) e conduziram à identificação de frações com atividade inibitória sobre o crescimento das bactérias testadas (Gram-positiva *S. aureus* e Gram-negativa *P. aeruginosa*) (Tabelas 1, 3 e 5). Também foi possível constatar que tais frações (nas mesmas concentrações empregadas nos ensaios anti-bacterianos) não exibiram atividade hemolítica.

De acordo com os resultados do trabalho realizado por Zelezetsky *et al.* (2005), pequenas alterações nas características químicas do peptídeo, como tamanho da face polar, profundidade do setor hidrofóbico e o gradiente longitudinal de hidrofobicidade, podem produzir grandes impactos na atividade biológica.

As diferenças de potência observadas nos ensaios antimicrobianos realizados com as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Tabelas 1, 3 e 5) podem provavelmente estar relacionadas às diferenças na composição da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente. A parede celular bacteriana é um obstáculo a ser ultrapassado pelos peptídeos antimicrobianos, pois dificulta o acesso à superfície com cargas negativas da membrana (Bechinger, 1999).

Desta maneira, há diferença na atividade biológica desses peptídeos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido as suas diferentes paredes celulares. Uma vez vencidas as barreiras de acesso à membrana, é necessária a interação com a superfície negativamente carregada e o acúmulo de uma



concentração limiar de peptídeos para que estes possam atuar na camada lipídica (Yeaman e Yount, 2003; Bechinger, 1999).

As propriedades antimicrobianas e citolíticas dos peptídeos são determinadas pela complexa interação entre cationicidade, hidrofobicidade, capacidade de adotar a conformação  $\alpha$ -hélice anfipática (Yeaman & Yount 2003). Dessa forma, estudos demonstram que a conformação em  $\alpha$ -hélice anfipática é fundamental para a nocividade contra bactérias Gram-positivas, mas menos necessária contra Gram-negativas (Giangaspero *et al.*, 2001). Desde que a cationicidade e a hidrofobicidade sejam mantidas, peptídeos com pouca anfipaticidade ainda são ativos, como é observado nos peptídeos de *Leptodactylus*. Semelhantemente, foi demonstrado que o aumento do momento hidrofóbico promove a atividade hemolítica contra eritrócitos humanos (Dathe & Wieprecht, 1999).

A importância dos parâmetros estruturais dos peptídeos consiste nos seus diferentes papéis na interação com as membranas de células procarióticas e eucarióticas (Dathe & Wieprecht, 1999). A comparação e a compreensão desses parâmetros podem auxiliar no desenho de novos antibióticos, suprimindo a urgente necessidade de novos fármacos para combater linhagens de microrganismos resistentes (Oren *et al.*, 1999). Considerando a especificidade das bactérias para certas doenças, onde: *S. aureus* causa doenças de pele e infecções alimentares e *P. aeruginosa* é agente causador de infecções urinárias e respiratórias, o grande número de peptídeos com possível atividade antimicrobiana encontrado em cada espécie vai de encontro com a idéia de que tais peptídeos, apesar de apresentarem um amplo espectro de ação são muitas vezes seletivos a um determinado grupo de microrganismos, como demonstrado para as dermaseptinas encontradas em *P. sauvagei* e *P. hypochondrialis* (Mor *et al.*, 1994, Brand *et al.*, 2006a).

A possibilidade de uma ação sinérgica entre PAMs e uma expressão induzida pelo contato com determinados patógenos possibilita uma defesa mais eficaz contra um maior número desses organismos (Mor *et al.*, 1994). A ação sinérgica entre peptídeos da mesma família já foi descrita anteriormente (Mor *et al.*, 1994). Considerando a crescente dificuldade de conter infecções rotineiras em humanos, animais e plantas, o estudo de peptídeos antimicrobianos conduz para um

novo campo de produção de fármacos com objetivo de conter o avanço de patógenos (Morton *et al.*, 2007).

A expressão, produção, e acúmulo de peptídeos com atividade antimicrobiana apesar de serem única nos mais diferentes grupos de animais, apresenta uma enorme variedade qualitativa, quanto aos peptídeos encontrados em cada espécie (Mor *et al.*, 1991; Krugliack *et al.*, 2000; Lorin *et al.*, 2005;).

Além da identificação de novos peptídeos antimicrobianos nas secreções cutâneas dos anuros dos *P. goyana*, *P. fuscumaculatus* e *P. centralis* empregando RP-HPLC e espectrometria de massa, foi avaliada a atividade antibacteriana e citotóxica de duas versões do peptídeo *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus*.

Vale destacar que o peptídeo isolado da rã *H. albopunctatus* apresenta similaridade com peptídeos antimicrobianos isolados de glândulas acessórias reprodutivas femininas da mosca da fruta *Ceratitis capitata*, conhecidos como *ceratoxinas*, (Saint *et al.*, 2003). Como pode ser observado no multi-alinhamento apresentado nos Anexos, Figura 37. No presente trabalho, as duas versões sintéticas do peptídeo antibacteriano de *H. albopunctatus* foram denominadas peptídeo *ceratoxin-like* contendo Ile e peptídeo *ceratoxin-like* contendo Leu.

Os resultados obtidos demonstraram que as duas versões do peptídeo são ativas contra oito das nove bactérias testadas, sendo inócuos contra o patógeno Gram-negativo *Proteus mirabilis* (Tabelas 7 e 8).

Tal resultado é intrigante, visto que as versões sintéticas dos peptídeos de *H. albopunctatus* foram bastante ativos contra as demais linhagens bacterianas testadas com MICs variando de 2 a 8  $\mu$ M. Tal inatividade frente ao patógeno *Proteus mirabilis* merece uma maior investigação visto que trata-se de um patógeno relevante em casos de infecções urinárias.

Os resultados obtidos para as demais bactérias evidenciou que a presença de um resíduo de leucina ou isoleucina no C-terminal não possui reflexo na atividade biológica. Tal fato era esperado visto que leucina e isoleucina são dois aminoácidos

bastante parecidos quimicamente, não promovendo tal substituição alterações significativas em termos estruturais.

Como alguns dos PAMs catiônicos com amplo espectro de ação também são citotóxicos para células de câncer (Tabela 9), as duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus* foram avaliadas quanto à sua ação anticarcinogênica.

Tabela 9. Comparação das características químicas e biológicas de vários PAMs isolados da secreção cutânea de anfíbios e que também apresentam atividade antitumoral. Os parâmetros comparados são a massa molecular monoisotópica (Mm); anfifilicidade, como momento hidrofóbico médio ( $\langle\mu H\rangle$ ); hidrofobicidade média ( $\langle H\rangle$ ); carga em pH neutro; ponto isoelétrico (pI), porcentagem de resíduos hidrofóbicos (%H); atividade contra Gram-positivas (+) e Gram-negativas (-); predição da estrutura secundária. (modificado de Libério, 2008).

Peptídeo	Seqüência	Mm (Da)	$\langle\mu H\rangle$	$\langle H\rangle$	Carga	pI	%H	Atividade	Estrutura	Espécie
<i>Fallaxin</i>	GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL-NH <sub>2</sub>	2547	0.07	-0.14	+3.1	10.5	68	+/-	$\alpha$ -hélice	<i>L. fallax</i> <i>L. pentadactylus</i> <i>L. labyrinthicus</i>
<i>Pentadactylin</i>	GLLDTLKGAAKNVVGLSLASKVMEKL-NH <sub>2</sub>	2541	0.09	-0.16	+3.0	10.5	64	+/-	$\alpha$ -hélice	<i>L. pentadactylus</i> <i>L. labyrinthicus</i>
<i>Magainin 2</i>	GIGKFLHSAKFKGAFVGEIMNS-NH <sub>2</sub>	2465	0.36	-0.15	+4.1	11.0	65	+/-	$\alpha$ -hélice	<i>X. laevis</i>
<i>Gaegurin 5</i>	FLGALFKVASKVLPVKCAITKKC-OH	2550	0.27	-0.15	+4.9	10.4	71	+/-	$\alpha$ -hélice	<i>Rana rugosa</i>
<i>Gaegurin 6</i>	FLPLLAGLAANFLPTIICFISYKC-OH	2627	0.10	0.19	+0.9	8.3	87	+/-	$\alpha$ -hélice	<i>Rana rugosa</i>
<i>Aurein 1.2</i>	GLFDIIKKIAESF-NH <sub>2</sub>	1479	0.48	-0.06	+1.0	9.9	62	+/-	$\alpha$ -hélice	<i>Litoria raniformis</i>
<i>Citropin 1.1</i>	GLFDVIKKVASVIGGL-NH <sub>2</sub>	1614	0.37	0.05	+2.0	10.6	75	+	$\alpha$ -hélice	<i>Litoria citropia</i>
<i>Maculatin 1.1</i>	GLFGVLAKVAHVPAIAEHF-NH <sub>2</sub>	2145	0.25	0.16	+1.2	10.1	90	+/-	$\alpha$ -hélice	<i>Litoria genimaculata</i>

A literatura indica que muitos dos peptídeos antimicrobianos ativos contra um amplo espectro de microrganismos também desempenham uma função antitumoral (Tabela 9). Comparado ao grande número de PAMs já isolados de anuros, poucos estudos foram realizados para a verificação de atividade contra linhagens de câncer e sobre o mecanismo de ação (Cruz-Chamorro *et al.*, 2006). Frequentemente, os PACs possuem o C-terminal amidado, apesar dessa característica não ser uma regra. Todavia, peptídeos pouco catiônicos como a *gaegurina 6* também podem ser citotóxicos ou citostáticos contra células carcinogênicas. O controle da proliferação

celular em células tumorais é considerado uma eficiente estratégia para prevenir ou retardar o crescimento tumoral (Molinari, 2000).

Estudos detectaram uma maior incidência dos resíduos de aminoácido I e K nos PACs do que nos PAMs e que o balanço inversamente proporcional entre anfifilicidade e hidrofobicidade é importante para os PACs na invasão das membranas celulares das células tumorais (Dennison *et al.*, 2006). A análise da tabela 9 nos permite verificar que os PACs menos catiônicos apresentam maior hidrofobicidade média ( $\langle H \rangle$ ), contudo, também sugere que, como na atividade antimicrobiana, a atividade anticarcinogênica é decorrente de um sinergismo de características químicas do peptídeo.

Os dados obtidos nos ensaios de atividade anticarcinogênica indicam que os peptídeo *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus* contendo isoleucina no C-terminal (Figuras 31 e 32) e contendo leucina no C-terminal (Figuras 33 e 34) são ativos contra as linhagens celulares testadas. De acordo com os valores de IC<sub>50</sub> determinados (concentração capaz de inviabilizar 50% das células) (Figura 35), as duas versões do *peptídeo ceratoxin-like* de *H. albopunctatus* apresentam atividade citotóxica sobre células cancerígenas HeLa semelhantes, no entanto observou-se uma leve diferença sobre a atividade desses peptídeos sobre os fibroblastos normais, com um IC<sub>50</sub> maior. No entanto, tais experimentos devem ser repetidos de modo a se avaliar se tais diferenças são estatisticamente significativas.

Caso essa diferença se confirme, uma vez que o mecanismo anticarcinogênico desses peptídeos pode se dar via membrana, a diferença encontrada nos valores de IC<sub>50</sub> para as diferentes linhagens celulares testadas pode sugerir que a atividade das duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus* é dependente da composição da membrana plasmática da célula testada. Assim, a interação entre as características do peptídeo e a composição da membrana das células utilizadas é que determina a especificidade e a potência da atividade desempenhada pelo peptídeo (Dennison *et al.*, 2006).

As duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus* mostraram-se eficazes e podem vir a ser usados como uma alternativa no combate

ao câncer, no entanto alterações estruturais devem ser propostas de modo a diminuir os efeitos deletérios sobre células normais. Pesquisas revelaram que peptídeos análogos compostos de D- e L-aminoácidos possuem a sua especificidade contra célula tumoral aumentada, sendo a seletividade provavelmente determinada principalmente pela atração eletrostática dos peptídeos aos componentes acídicos (mucinas O-glicosiladas) da superfície das células de câncer, mas podendo ser influenciada pela maior superfície de contato (microvilos) dessas células. Além da redução da toxicidade, a composição simples desses análogos, a sua estabilidade frente à degradação enzimática e inativação por componentes do soro e a reduzida antigenicidade fazem desses peptídeos excelentes candidatos a novos quimioterápicos (Papo & Shai, 2003).

Os PACs citotóxicos também para células normais geralmente provocam a morte celular via modelo *barrel-stave*. Outra forma de morte de células tumorais causada por PACs é pela formação de poros toroidais, caracterizado pela formação de poros temporários. Enquanto abertos, esses poros também podem permitir a entrada dos peptídeos dentro da célula, atingindo alvos celulares e desencadeando a via apoptótica, assim a ação dos PACs pode ter múltiplos alvos (Dennison *et al.*, 2006).

Geralmente, a alteração na membrana plasmática é uma característica atribuída ao tipo de morte celular denominado necrose. Resumidamente, a necrose inicia com danos físicos severos à célula, levando à ruptura abrupta da membrana plasmática e à liberação do seu conteúdo citoplasmático (Majno, 1995). No entanto, é preciso ter cautela ao associar essa característica somente à necrose. Células em estágios avançados de apoptose são semelhantes às células necróticas. Essa semelhança é de tal ordem que alguns autores sugeriram um termo para caracterizar esse estágio: “necrose apoptótica” (Majno, 1995). Sendo assim, células na fase final da apoptose também apresentam alterações na estrutura e na função de transporte da membrana plasmática (Leist *et al.*, 2001). A morfologia de células apoptóticas é caracterizada pela desidratação e redução do volume e granulosidade celular, ondulações na membrana plasmática, aumento do volume mitocôndrial e condensação do material genético (Majno, 1995; Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

Considerando que a toxicidade para as células normais também é uma característica dos quimioterápicos convencionais, estratégias desenvolvidas para aumentar a sua eficiência também podem ser empregadas no uso desses peptídeos. Dessa forma, uma alternativa poderia ser o direcionamento desses peptídeos anticarcinogênicos para a célula tumoral por meio do uso de vetores, como peptídeos que se ligam especificamente a determinadas células tumorais (Enbäch & Laakkonen, 2007) e vírus (Guo, Thorne & Bartlett, 2008).

Alterações da viabilidade celular das linhagens testadas também foram confirmadas pela observação em microscópio de contraste de fase das células tratadas com as duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus* (Figuras 31 a 34). Notou-se que todas as linhagens tratadas com as maiores concentrações de peptídeo tiveram a sua morfologia celular modificada, isto é bem evidente pela observação da perda da integridade da membrana celular e indefinição do núcleo e do nucléolo. Nas maiores concentrações testadas, foi possível a observação de uma grande quantidade de *debris* celulares, evidenciando uma forte atividade contra a integridade da membrana dessas células.

Podemos avaliar de forma positiva a ação das duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus*, uma vez que foram capazes de inibir o crescimento das células cancerígenas do colo uterino (HeLa) mesmo na concentração de 8  $\mu\text{M}$ .

As células cancerígenas do grupo controle (sem a presença dos peptídeos) (Figuras 31A e 33A) possuem uma morfologia bem definida com a membrana citoplasmática íntegra, núcleo e do nucléolo evidentes e uma morfologia celular poligonal.

A citotoxicidade pode resultar em apoptose que é um modo ativo e fisiológico de morte celular sujeito a processos regulatórios complexos (Darzynkiewicz *et al.*, 1997). Ainda não se sabe se apoptose, senescência, necrose, autofagia e catástrofe mitótica são programas independentes ou que se relacionam em algum grau; e se ocorrem sucessivamente ou simultaneamente. Um importante aspecto da

tumorigenicidade e do desenvolvimento de resistência a drogas anticâncer é a resistência a morte celular, principalmente via apoptose.

Durante o início do processo apoptótico ocorre a perda da assimetria dos fosfolipídeos da membrana plasmática, levando à exposição de fosfatidilserina na face externa, tornando a membrana mais suscetível à desestabilização pelo peptídeo, levando à necrose da célula. A perda de integridade de membrana observada sob altas concentrações de PAMs pode indicar o mecanismo de ação *carpet-like*, pois pode ser que a destruição da membrana dependa da concentração de peptídeos ligados atingir um limiar específico, levando ao colapso com inúmeros poros toroidais formados (Dennison *et al.*, 2006). Esse mecanismo de ação (carpete/poro toroidal) foi recentemente descrito para o peptídeo *melittina* (Allende, Simon & McIntosh, 2005). Outro mecanismo pelo qual as células tratadas poderiam perder a sua integridade de membrana seria pelo modelo *Shai-Matsuzaki-Huang*, no qual ocorre um adelgaçamento da membrana seguido da formação de poros transientes e colapso da membrana. Nesse caso, os poros também permitiriam que os peptídeos atingissem alvos intracelulares capazes de desencadear o processo apoptótico antes da desintegração da membrana (Dennison *et al.*, 2006).

Assim, novas estratégias capazes de induzir o processo apoptótico em células de câncer são estratégicas, uma vez que modulam a sensibilidade do tumor e das células normais aos agentes antitumorais, via os mecanismos regulatórios da apoptose (Okada & Mak, 2004).

Além do papel antimicrobiano dos peptídeos catiônicos de anuros, várias evidências já indicam o seu uso na terapêutica do câncer, visto que os peptídeos anticarcinogênicos apresentam uma potente atividade contra células tumorais, são pouco imunogênicos e são pequenos, reduzindo os custos da síntese. Uma vez que nada adianta ser ativo e potente quando o alto custo inviabiliza o medicamento. Vale ressaltar que a maior parte dos estudos foram realizados em modelos *in vitro*, portanto o desempenho desses peptídeos anticarcinogênicos pode ser totalmente alterado *in vivo*.

O mecanismo de ação e o desenvolvimento de estratégias capazes de aumentar a potência, seletividade e resistência a componentes do soro podem representar um importante avanço dos modelos terapêuticos (Kim *et al.*, 2003; Shadidi & Sioud, 2003; Cruz-Chamorro *et al.*, 2006). Contudo, ainda não está claro se o animal utiliza a atividade anticâncer dos peptídeos anticarcinogênico, ou se essa atividade é apenas uma consequência da atividade membranolítica desses peptídeos (Doyle *et al.*, 2003).

Dessa maneira, nota-se significativa atuação da pressão evolutiva na conservação da sequência dos aminoácidos dos peptídeos antimicrobianos. Essa observação é consistente com a hipótese de que muitos PAMs são relacionados evolutivamente, tendo surgido de múltiplas duplicações de um gene ancestral que existia antes da radiação das várias famílias de anfíbios. A diversificação dos PAMs poderia então ser parte de uma estratégia evolutiva direcionada pela rápida evolução dos patógenos (Duda Jr. *et al.*, 2002).

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



## *7. Conclusão*

---

## 7. CONCLUSÃO

Este trabalho teve como propósito ampliar o conhecimento acerca da composição bioquímica da secreção cutânea das espécies *Proceratophrys goyana*, *Physalaemus fuscumaculatus*, *Physalaemus centralis* e *Hypsiboas albopunctatus* comumente encontrados na fauna do Cerrado brasileiro.

No presente estudo constatou-se a enorme riqueza peptídica presente nas secreções cutâneas provenientes das espécies *Proceratophrys goyana*, *Physalaemus fuscumaculatus* e *Physalaemus centralis*. Toda essa variedade possui relevante potencial para o desenvolvimento de novas drogas, principalmente contra bactérias ou células tumorais resistentes aos fármacos convencionais.

A estratégia experimental adotada no fracionamento das secreções brutas das espécies estudadas foi adequada e permitiu constatar-se a grande diversidade de moléculas presentes nestas secreções, com a eluição de mais de 300 frações (no total) que foram analisadas por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF, resultando na detecção de diversos componentes com massas moleculares distintas.

Os peptídeos antimicrobianos caracterizados biologicamente neste trabalho, duas versões sintéticas do peptídeo *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus* apresentaram efeitos biológicos relevantes com potente atividade antibacteriana e citotóxica contra células cancerígenas.

A descoberta de novas moléculas antitumorais é de extrema importância devido ao surgimento de resistência aos quimioterápicos disponíveis no mercado.

A síntese química constitui uma alternativa para obtenção de quantidades moderadas desses peptídeos ainda que a sua obtenção em larga escala ainda seja bastante onerosa. Entretanto, por meio dessa metodologia é possível a realização de experimentos que permitam analisar e concluir muitos parâmetros importantes para a atividade antimicrobiana, facilitando assim o desenvolvimento de alternativas

menos dispendiosas para o controle de doenças baseadas em estudos com os peptídeos antimicrobianos.

As aplicações dos peptídeos antimicrobianos pela agroindústria, assim como pela indústria farmacêutica, são inúmeras. Um estudo sistemático de bioprospecção dessas moléculas, com identificação e síntese química em larga escala, possibilitará, não somente um grande avanço na produção de novas drogas, mas também o reconhecimento do valor de cada uma delas, como novas categorias de recursos genéticos e, por fim, a necessidade de preservação desses animais.

Dessa forma, compostos ativos vêm sendo sintetizados e testados visando à fabricação de drogas de amplo espectro e de múltipla aplicabilidade. Sendo assim, é de extrema relevância a investigação desses compostos, uma vez que podem auxiliar no esclarecimento de questões taxonômicas, na identificação de potenciais drogas terapêuticas e no entendimento da biologia destes animais.

## *8. Referências Bibliográficas*

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGERBERTH, B., LEE, J.Y., BERGMAN, T., CARLQUIST, M., BOMAN, H.G., MUTT, V., JORNVALL, H. Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. **Eur. J. Biochem.** v. 202, p. 849-854, 1991.

AICR (American Institute for Cancer Research). Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. **Washington: American Institute for Cancer Research.** p. 517, 2007.

ALLENDE, D., SIMON, S. A., MCINTOSH, T. J. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores. **Biophys. J.** v. 88, p. 1828–1837, 2005.

ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., REINA, L. C. B., MONTANARI, C. A., DONNICI, C. L., LOPEZ, M. T. P. **Quim. Nova.** v. 28, p. 118, 2005.

APPONYI, M.A., PUKALA, T.L., BRINKWORTH, C.S., MASELLI, V.M., BOWIE, J.H., TYLER, M.J., BOOKER, G.W., WALLACE, J.C., CARVER, J.A., SEPAROVIC, F., DOYLE, J., LLEWELLYN, L.E. Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. **Peptides.** v. 25, p. 1035-1054, 2004.

AUSTIN, D.J., KRISTINSSON, K.G., ANDERSON, R.M. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 96, p. 1152- 1156, 1999.

BASTOS, R., MOTTA, J.A.O., GUIMARÃES, L.D. Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia, Estado de Goiás, Goiânia. **Stylo Gráfica e Editora.** p. 82, 2003.

BECHINGER, B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1462, p. 157-183, 1999.

BECHINGER, B. & LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1758, p. 1529-1539, 2006.

BECHINGER, B., ZASLOFF, M., OPELLA, S.J. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Protein Sci.** v. 2, p. 2077-2084, 1993.

BEGGIN, P. & SANSOM, M. Interactions of  $\alpha$ -helices with bilayers: a review of simulation studies. **Biophys. Chem.** v. 76, p. 161-183, 1999.

BESSIN, Y., SAINT, N., MARRI, L., MARCHINI, D., MOLLE, G. Antibacterial activity and pore-forming properties of ceratotoxins: a mechanism of action based on the barrel stave model. **Biochim Biophys Acta.** v. 1667(2), p. 148-156, 2004.

BHUTIA, S. K. & MAITI, T. K. Targeting tumors with peptides from natural sources. **Trends Biotechnol.** v. 26, p. 210–217, 2008.

BOMAN, H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **J. Intern. Med.** v. 254, p. 197-215, 2003.

BOMAN, H. G., AGEBERTH, B., BOMAN, A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. **Infect. Immun.** v.61, p. 2978-2984, 1993.

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

BRANDAO, R. A.; A herpetofauna da Estacao Ecologica de Aguas Emendadas. In: MARINHO FILHO, J.; RODRIGUES, F.; GUIMARAES, M. (Ed.). **Vertebrados da Estação Ecológica de Águas Emendadas: historia natural e ecologia em um fragmento de cerrado do Brasil Central**. Brasília: SEMATEC, p. 9-21, 1998.

BRANDAO, R. A.; ARAUJO, A. F. B. de. A herpetofauna associada as matas de galeria no Distrito Federal. In: RIBEIRO, J. F.; FONSECA, C. E. L. da; SOUSA-SILVA, J. C. (Ed.). **Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria. Planaltina: Embrapa Cerrados**, p.561-604. 2001.

BRANDÃO, H. N., DAVID, J. P., COUTO, R. D., NASCIMENTO, J. A. P., DAVID, J. M., Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas. **Quim. Nova**. Vol. 33, p.1359-1369, 2010.

BRANNON-PEPPAS, L. & BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 56, p. 1649–1659, 2004.

BRASILEIRO, C.A. *Physalaemus centralis*: Male-male combat. **Herpetological Review**. v. 29, p. 165, 1998.

BRASILEIRO, C.A., SAWAYA, R. J., KIEFER, M.C., MARTINS, M. Amphibians of an open cerrado fragment In southeastern Brasil. **Biota Neotropica**. v. 5, p. 1-17, 2005.

BRENTANI, M. M., COELHO, F. R. G., KOWALSKI, L. P. Bases da Oncologia. 2. ed. São Paulo: **Editora Marina e Tecmedd**. p. 452, 2003.

BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. Biology of Microorganisms. **Ed. Prentice Hall**. Upper Saddle River, NJ, 1994.

BROGDEN, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat. Rev. Microbiol.** v. 3, p. 238-250, 2005.

BROWN, K.L., & HANCOCK, R.E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Curr. Opin. Immunol.** v. 18 (1), p. 24–30, 2006.

BULET, P., STOCKLIN, R., MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunol. Rev.** v. 198, p. 169-184, 2004.

BULET, P. & STOCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein Peptide Lett.** v. 12, p. 3-11, 2005.

BURGIERMAN, M., MALDONADO, R., ULIANA, S., FAZIO, M.A., MIRANDA, M.T., DAFFRE, S. Gomesian activity against *Leishmania SP* e *Trypanosoma Cruzi*. **Rev.Inst. Med. Trop.** São Paulo. v. 44, p. 110, 2002.

CASTRO, M.S., CILLI, E.M., FONTES, W. Combinatorial synthesis and directed evolution applied to the production of alpha-helix forming antimicrobial peptides analogues. **Curr. Protein Pept. Sci.** v. 7, p. 473-478, 2006.

CASTRO, M.S., FERREIRA, T.C.G., CILLI, E.M., CRUSCA E.JR., MENDESGIANNINI, M.J.S., SEBEN, A., RICART, C.A.O., SOUSA, M.V., FONTES, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides.** v.30, p.291-296, 2009.

CHEN, H. & HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Rev. in Food Sci. and Food Safety.** Chicago. v. 2, p. 82-100, 2003.

CHIN, Y. W., BALUNAS, M. J., CHAI, H. B., KINGHORN, A. D. **The AAPS J.** v.8, p. 239, 2006.

CONLON, J. M. *et al.* Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. **Methods.** v. 42, p. 349–357, 2007.

CONLON, J.M., IWAMURO, S., KING, J.D., ANN, N.Y. Dermal cytolytic peptides and the system of innate immunity in anurans, **Acad Sci.** v. 1163, p. 75-82, 2009.



CRUZ, C.A.G., PRADO, G.M., IZECKSOHN, E. Nova espécie de *Proceratophrys* Miranda-Ribeiro, 1920 do Sudeste do Brasil (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Arquivos do Museu Nacional**. v. 63(2), p. 289-295, 2005.

CRUZ-CHAMORRO, L. *et al.* In vitro biological activities of magainin alone or in combination with nisin. **Peptides**. v. 27, p. 1201–1209, 2006.

CUNHA, R.B., CASTRO, M.S., FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 36, p. 40-46, 2006.

DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.* Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis an accidental cell death (necrosis). **Cytometry**. v. 27, p. 1–20, 1997.

DATHE, M. & WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1462, p. 71–87, 1999.

DE SMET, K. & CONTRERAS, R. Human antimicrobial peptides: defensins cathelicidins and histatins. **Biotechnol. Lett.** v. 27, p. 1337-1347, 2005.

DELFINO, G., BRIZZI, R., CALLONI, C. **Zool. Anz.** v. 5/6, p. 295-319, 1990.

DENNISON, S. R. *et al.* Anticancer  $\alpha$ -helical peptides and structure/function relationships underpinning their interactions with tumour cell membranes. **Current Protein and Peptide Science**. v. 7, p. 487–499, 2006.

DIAZ-ACHIRICA, P., UBACH, J., GUINEA, A., ANDREU, D., RIVAS, L. The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA(1-8)M(1-18), a synthetic cecropin a-melittin hybrid peptide. **Biochem. J.** v. 330, p. 453-460, 1998.

DIEP, D.B. & NES, I.F. Ribosomally Synthesized Antibacterial Peptides in Gram Positive Bacteria. **Current Drug Targets**. Hilversum. v. 3, p. 107-122, 2002.

DOMIN, M.A. Highly virulent pathogens – a post antibiotic era. **Br. J. theatre Nurs.** v. 8, p. 14-18, 1998.

DOYLE, J. *et al.* nNOS inhibition, antimicrobial and anticancer activity of the amphibian skin peptide, citropin 1.1 and synthetic modifications- The solution structure of a modified citropin 1.1. **Eur. J. Biochem.** v. 270, p. 1141–1153, 2003.

DUELLMAN, E.W. & TRUEB, L. Biology of amphibians. **McGraw-Hill Book Company.** p. 1- 371, 1986.

DUDA JR., T. F., VANHOYE, D., NICOLAS, P. Roles of diversifying selection and coordinated evolution in the evolution of amphibian antimicrobial peptides. **Mol. Biol. Evol.** v. 19, p. 858–864, 2002.

EDITORIAL. Mass spectrometry in toxinology: A 21st-century technology for the study of biopolymers from venoms. **Toxicon.** v. 47, p. 609-613, 2006.

ENBÄCH, J. & LAAKKONEN, P. Tumour-homing peptides: tools for targeting, imaging and destruction. **Biochemical Society Transactions.** v. 35, p. 780–783, 2007.

ETEROVICK, P.C. & SAZIMA, I. New Species of *Proceratophrys* (Anura: Leptodactylidae) From Southeastern Brazil. **Copeia.** v. 1998, n. 1, p. 159–164, 1998.

ETEROVICK, P. C. & SAZIMA, I. Structure of an Anuran Community in a Montane Meadow in Southeastern Brazil: Effects of Seasonality, Habitat, and Predation. **Amphibia-Reptilia.** v. 21, p. 439–461, 2000.

FAHRNER, R.L., DIECKMANN, T., HARWING, S.S., LEHRER, R.I., EISENBERG, D., FEIGON, J. Solution structure of protegrin-1 A. Broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. **Chem. Biol.** v. 3, p. 543-550, 1996.

FAVREAU, P., MENIN, L., MICHALET, S., PERRET, F., CHENEVAL, O., STOCKLIN, M., BULET, P., STOCKLIN, R. Mass spectrometry strategies for venom

mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case applications with single arthropod specimen. **Toxicon**. v. 47, p. 676-687, 2006.

FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nature Reviews: Cancer**. v. 5, p. 876-885, 2005.

FIMLAND, G. *et al.* Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. **J. Peptide Sci. Chichester**. v. 11, p. 688-696, 2005.

FRENCH, G.L. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Rev.** Amsterdam. v. 57, p. 1514-1527, 2005.

FRIEDRICH, C.L., ROZEK, A., PATRZYKAT, A., HANCOCK, R.E. Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivate with improved activity against gram-positive bacteria. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 2415-2422, 2001.

FROST, D. R.. Amphibian Species of the World: An Online Reference. American Museum of Natural History, New York 2009, USA. Version 5.3. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php2009>.

FROST, D.R., GRANT, T., FAIVOVICH, J, BAIN, R.H., HAAS, A., HADDAD, C.F.B., SÁ, R.O., CHANNING. A., WILKINSON, M., DONNELLAN, S.C., RAXWORTHY, C.J., CAMPBELL, J.A., BLOTTO, B.L., MOLER, P., DREWES, R.C., NUSSBAUM, R.A., LYNCH, J.D., GREEN, D.M., WHEELER, W.C. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v. 297, p. 1370, 2006.

GHOBRIAL, I. M., WITZIG, T.E., ADJEI, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**. v. 55, p. 178-194, 2005.

GIANGASPERO, A., SANDRI, L., TOSSI, A. Amphipathic  $\alpha$ -helical peptides. A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. **Eur. J. Biochem**. v. 268, p. 5589–5600, 2001.

GIARETTA, A.A. & FACURE, K.G. Reproduction and Habitat of ten Brazilian Frogs (Anura). **Contemporary Herpetology**. v. 2008, n. 3, p. 1–4, 2008.

GIARETTA, A. A. & SAZIMA, I. Nova Espécie de *Proceratophrys* Mir. Rib. do Sul de Minas Gerais, Brasil (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Revista Brasileira de Biologia**. v. 53, p. 13–19, 1993.

GIARETTA, A.A.; BERNARDE, P.S., KOKUBUM, M.N.C. A New Species of *Proceratophrys* (Anura: Leptodactylidae) From The Amazon Rain Forest. **Journal of Herpetology**. v. 34, n. 2, p. 173–178, 2000.

GIFFORD, J.L., HUNTER, H.N., VOGEL, H.J. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. **Cell. Mol. Life Sci**. v. 62, p. 2588-2598, 2005.

GOLDSTEIN, B.P. *et al.* Activity of nisin against *Streptococcus pneumoniae*, *in vitro*, and in a mouse infection model. **The J. of Antimicrob. Chemother.** Londres, Nova York. v. 42, p. 277-278, 1998.

GRANT, T.; FROST, D.R.; CALDWELL, J.P.; GAGLIARDO, R.; HADDAD, C.F.B.; KOK, P.J.R.; MEANS, D.B.; NOONAN, B.P.; SCHARGEL, W.E., WHEELER, W.C. Phylogenetic Systematics of dartpoison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v. 299, p. 1262, 2006.

GUO, Z.S., THORNE, S.H., BARTLETT, D.L. Oncolytic virotherapy: Molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1785, p. 217–231, 2008.

HADDAD, C.F.B., & PRADO, C.P.A. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**. v. 55, p. 207-217, 2005.

HANCOCK, R.E.W. & CHAPPLE, D.S. Peptide Antibiotics. **Antimicrob. Agents and Chemother.** Washington. v. 43, p. 1317-1323, 1999.

HANCOCK, R.E.W. & LEHRER, R.I. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends Biotechnol.** v. 21, p. 82-88, 1998.

HANCOCK, R.E.W. & SAHL, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat. Biotechnol.** v. 24, p. 1551-1557, 2006.

HEINEMANN, J.A., ANKENBAUER, R.G., AMÁBILE-CUEVAS, C.F. Do antibiotics maintain antibiotic resistance? **Drug discovery today.** v. 5(5), p. 195-204, 2000.

HOSKIN, D.W. & RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1778, p. 357–375, 2008.

IGNEY, F.H. & KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews: Cancer.** v. 2, p. 277-288, 2002.

IZADPANA, A. & GALLO, R.L. Antimicrobial peptides. **J. American Acad. Dermatol.** St. Louis. v. 52, p. 381-390, 2005.

IZECKSOHN, E. & PEIXOTO, O.L. Uma Grande Concentração de Indivíduos de *Proceratophrys Laticeps* (Amphibia; Anura; Leptodactylidae). **Revista da Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro: Série Ciência e Vida.** v. 18, p. 105–107, 1996.

JENSSEN, H., HAMILL, P., HANCOCK, R.E. Peptide antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 19, p. 491-511, 2006.

JIN, Z. & EL-DEIRY, W.S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biology & Therapy.** v. 4, p. 139-163, 2005.

JOHANSSON, J., GUDMUNDSSON, G.H., ROTTENBERG, M.E., BERNDT, K.D., AGERBERTH, B. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 3718-3724, 1998.

JOSEPH, M.H. & MARSDEN, C.A. HPLC of small molecules a practical approach. Oxford. **IRL Press Limited.** p 100, 1986.

KAVANAGH, K. & DOWD, S. Histatins antimicrobial peptides with therapeutic potencial. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 56, p. 285-289, 2004.

KELLOFF, G.J. *et al.* Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. **J Nutr.** v. 130, p. 467S–71S, 2000.

KIM, S. *et al.* In vitro activities of native and designed peptide antibiotics against drug sensitive and resistant tumor cell lines. **Peptides.** v. 24, p. 945–953, 2003.

KRAGOL, G., LOVAS, S., VARADI, G., CONDIE, B.A., HOFFMANN, R., OTVOS, L.Jr. The antibacterial peptide pyrrocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. **Biochem.** v. 40, p. 3016-3026, 2001.

KRUGLIAK, M., FEDER, R., ZOLOTAREV, V.Y., GAIDUKOV, L., DAGAN, A., GINSBURG, H., MOR, A. Antimalarial activities of dermaseptin S4 derivatives. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 44, p. 2442-51, 2000.

KRUSZEWSKA, D. *et al.* Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. **The J. of Antimicrob. Chemother.** Londres, Nova York. v. 54, p. 648-653, 2004.

KWET, A. & FAIVOVICH, J. *Proceratophrys Bigibbosa* Species Group (Anura, Leptodactylidae), with Description of a New Species. **Copeia.** v. 2001, n. 1, p. 203–215, 2001.

LEE, S.Y., LEE, B.L., SÖDERHÄLL, K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 7927-7933, 2003.

LEIST, M. & JAATTELA, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology.** v. 2, p. 589-598, 2001.

LEITE, J.R.S.A., SILVA, L.P., RODRIGUES, M.I.S., PRATES, M.V., BRAND, G.D., LACAVALA, B.M., AZEVEDO, R.B., BOCCA, A.L., ALBUQUERQUE, S., BLOCH Jr., C. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides, USA.** v. 26 (4), p. 565-573, 2005.

LIBÉRIO, M. S. Caracterização química e biológica da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*: peptídeos antimicrobianos e anticarcinogênicos, fosfolipases e peptidases. **Dissertação de mestrado em Biologia Animal da UnB.** Brasília, 2008.

LIBÉRIO, M.S., JOANITTI, G.A., AZEVEDO, R.B., CILLI, E.M., ZANOTTA, L.C., NASCIMENTO, A.C., SOUSA, M.V., PIRES Jr., O.R., FONTES, W., CASTRO, M.S. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. **Amino Acids** v. 40, p. 51-59, 2011.

LOHNER, K. & PRENNER, E.J. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimic systems. **Biochim. Biophys. Acta.** Amsterdam. v. 1462, p. 141-156, 1999.

LORIN, C., SAIDI, H., BELAID, A., ZAIRI, A., BALEUX, F., HOCINI, H., BELEC, L., HANI, K., TANGY, F. The antimicrobial peptide Dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. **Virology.** v. 334, p. 264-75, 2005.

LYNCH, J.D. Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of leptodactyloid frogs. **Miscellaneous Publication, Museum of Natural History, University of Kansas.** v. 53, p. 1238, 1971.

MAGALHÃES, B.S., MELO, J.A., LEITE, J.R., SILVA, L.P., PRATES, M.V., VINECKY, F., BARBOSA, E.A., VERLY, R.M., MEHTA, A., NICOLI, J.R., BEMQUERER, M.P., ANDRADE, A.C., BLOCH, C.Jr. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 26; 377(4), p. 1057-61, 2008.

MAJNO, G. & JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American Journal of Pathology.** v. 146, p. 3-15, 1995.

MANDARD, N., BULET, P., CAILLE, A., DAFFRE, S., VOVELLE, F. The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider. **Eur. J. Biochem.** v. 269, p. 1190-1198, 2002.

MARCHINI, D., GIORDANO, P.C., AMONS, R., BERNINI, L.F., DALLAI, R. Purification and primary structure of ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata* (Insecta:Diptera). **Insect Biochem Mol Biol.** v. 23(5), p. 591-598, 1993.

MARSHALL, S.H. & ARENAS, G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. **Electronic J. Biotechnol.** Valparaiso. v. 6, p. 271-284, 2003.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1462, p. 1-10, 1999.

MATSUZAKI, K., SUGISHITA, K.I., HARADA, M., FUJII, N., MIYAJIMA, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1376, p. 391-400, 1998.



McELHANEY, R.N. & PRENNER, E.J. The interaction of antimicrobial peptides with model lipid bilayer and biological membranes. **Biochim. Biophys. Acta.** Netherlands. v. 1462, p. 1-234, 1999.

MECKE, A., LEE, D. K., RAMAMOORTHY, A., BRADFORD, G. Orr., BANASZAK, M. M. H. Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding - An atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers. **Biophys J BioFAST.** v. 23, 2005.

MEINCKEN, M., HOLROYD, D.L., RAUTENBACH, M. Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and chemotherapy.** v. 49 (10), p. 4085–4092, 2005.

MENIN, M. & GIARETTA, A.A. Predation on foam nests of Leptodactyline frogs (*Anura: Leptodactylidae*) by larvae of *Beckeriell niger* (Diptera: Ephydridae). **Journal of Zoology.** v. 261, p. 239-243, 2003.

MIRANDA, A., MIRANDA, M.T.M., JOUVENSAL, L., VOVELLE, F., BULET, P., DAFFRE, S. Gomesin: a powerful antimicrobial peptide isolated from the brazilian tarantula spider *Acanthoscurria Gomesiana*. Animal toxins: state of the art. Perspectives in health and biotechnology. **Res. Signpost.** Kerala, India, 2008.

MOLINARI, M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Proliferation.** v. 33, p. 261-274, 2000.

MOOKHERJEE, N. & HANCOCK, R.E. Cationic host defense peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. **Cell. Mol. Life. Sci.** v. 64, p. 922-933, 2007.

MOR, A. & NICOLAS, P. The NH<sub>2</sub>-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 1934–1939, 1994.

MOR, A., NGUYEN, V.H., DELFOUR, A., MIGLIORE-SAMUR, D., NICOLAS, P. Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. **Biochem.** v. 30, p. 8824-8830, 1991.

MORTON, C.O., DOS SANTOS, S.C., COOTE, P. An amphibian-derived, cationic, alpha-helical antimicrobial peptide kills yeast by caspase-independent but AIF-dependent programmed cell death. **Mol. Microbiol.** v. 65, p. 494-507, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods.** v. 65, p. 55–63, 1983.

MUNIZ, K. P. R., GIARETTA, A. A., SILVA, W. R., FACURE, K. G. Auto - ecologia de *Hypsiboas albopunctatus* (Anura, *hylidae*) em área de Cerrado no sudeste do Brasil. **Iheringia.** v. 98(2), p. 254 - 259, 2008.

NASCIMENTO, A. C. C. *et al.* **Protein and Peptide Letters.** v. 10, p. 227, 2003.

NASCIMENTO, L.B., CARAMASCHI, U., CRUZ, C.A.G. Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-la-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, *Leptodactylidae*). **Arquivos do Museu Nacional.** v. 63, p. 297-320, 2005.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K. M. **Nat. Prod. Rep.** v. 17, p. 215, 2000.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. **Nat. Prod. Rep.** v. 66, p. 1022, 2003.

NIU, W.W. & NEU, H.C. Activity of mersacidin, a novel peptide, compared with that of vancomycin, teicoplanin, and daptomycin. **Antimicrob. Agents and Chemother.** Washington. v. 35, p. 998-1000, 1991.

OKADA, H. & MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews: Cancer.** v. 4, p. 592-603, 2004.

OKEKE, I.N. *et al.* Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. **The Lancet Infectious diseases**. Nova York. v. 5, p. 481-493, 2005.

ONUMA, Y. *et al.* Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. **Toxicon**. v. 37, p. 55–65, 1999.

OREN, Z., HONG, J., SHAI, Y. A comparative study on the structure and function of a cytolytic  $\alpha$ -helical peptide and its antimicrobial  $\alpha$ -sheet diastereomer. **Eur. J. Biochem**. v. 259, p. 360-369, 1999.

O'SULLIVAN, L. *et al.* Potential of bacteriocin producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**. Paris. v. 84, p. 593-604, 2002.

PALMA, M., MENDES, M., MARQUES, M., SOUZA, B., SANTOS, L., SANTOS, K. Fundamentos em análise proteômica, parte I. **Laboratório de biologia estrutural**. p. 110, 2007

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnol. Advances**. Oxford, Nova York. v. 21, p. 465-499, 2003.

PAPO N. & SHAI, Y. New lytic peptides based on the DL-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. **Biochemistry**. v. 42, p. 9346–9354, 2003.

PAPO, N. & SHAI, Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. **Cell. Mol. Life Sci**. v. 62, p. 784–790, 2005.

PARK, C.B., KIM, H.S., KIM, S.C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. v. 244, p. 253-257, 1998.

PETERS, W. Über die von Spix in Brasilien gesammelten Batrachier des Königl. Naturalienkabinetts zu München. **Monatsber. Berl. Akad. Wiss.** p. 196–227, 1872.

POWELL, W.A., CATRANIS, C.M., MAYNARD, C.A. **Mol. Plant. Microbe Interact.** v. 8(5), p. 792-794, 1995.

POWERS, J.P.S. & HANCOCK, R.E.W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides.** v. 24, p. 1681-1691, 2003.

PUKALA, T.L., BOWIE, J.H., MASELLI, V.M., MUSGRAVE, I.F., TYLER, M.J. Hostdefence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. **Nat. Prod. Rep.** v. 23, p. 368-393, 2006.

RIBEIRO R.S., TABOSA-DO-EGITO G.T.B., HADDAD C.F.B. Chave de identificação: anfíbios anuros da vertente de Jundiáí da Serra do Japi, Estado de São Paulo. **Biota Neotropica.** v. 5 (2), p. 1–15, 2005.

RINALDI, A. C. **Current Opinion in Chemical Biology.** v. 6, p. 799, 2002.

RODRIGUES, E.G. *et al.* Effective topical treatment of subcutaneous murine B16F10-Nex2 melanoma by the antimicrobial peptide gomesin. **Neoplasia.** v. 10, p. 61-68, 2008.

ROSSA-FERES, D.C., JIM, J., FONSECA, M.G. Diets of tadpoles from a temporary pond in southeastern Brazil (Amphibia, Anura). **Revista Brasileira de Zoologia.** v. 21(4), p. 745-754, 2004.

ROSETTO, M., DE FILIPPIS, T., MANDRIOLI, M., ZACHAROPOULOU, A., GOURZI, P., MANETTI, A.G., MARCHINI, D., DALLAI, R. Ceratotoxins: female-specific X-linked genes from the medfly *Ceratitis capitata*. **Genome.** v. 43(4), p. 707-11, 2000.

SAHL, H. G., PAG, U., BONNESS, S., WAGNER, S., ANTCHEVA, N., TOSSI, A. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. **J. Leukoc. Biol.** v. 77, p. 466–475, 2005.

SAINT, N., MARRI, L., MARCHINI, D., MOLLE, G. The antibacterial peptide ceratotoxin A displays alamethicin-like behavior in lipid bilayers. **Peptides.** v. 24, p. 1779-1784, 2003.

SANTOS, T.G., CASATTI, L., ROSSA-FERES, D.C. Diversidade e distribuição espaço-temporal de anuros em região com pronunciada estação seca no sudeste do Brasil. **Iheringia.** v. 97, p. 37-49, 2007.

SAVILL, J. & FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature.** v. 407, p. 784-788, 2000.

SELSTED, M.E., HARWIG, S.S., GANZ, T., SCHILLING, J.W., LEHRER, R.I. Primary structures of three human neutrophil defensins. **J. CLIN. INVEST.** v. 76, p. 1436-1439, 1985.

SELSTED, M.E., NOVOTNY, M.J., MORRIS, W.L., TANG, Y.Q., SMITH, W., CULLOR, J.S. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 4292-4295, 1992.

SHADIDI, M. & SIOUD, M. Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides. **Drug Res. Updates.** v. 6, p. 363–371, 2003.

ROTEM, S. & MOR, A. ***Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties.*** **Biochimica et biophysica acta.** v. 1788(8), p. 1582-1592, 2009.

SHADIDI, M. & SIOUD, M. Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides. **Drug Res. Updates.** v. 6, p. 363–371, 2003.

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

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers.** v. 66, p. 236–248, 2002.

SILVA, P.I.Jr., DAFFRE, S., BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, NA 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 3464-3470, 2000.

SIMMACO, M., MIGNOGNA, G., BARRA, D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? **Biopolymers.** v. 47, p. 435-450, 1998.

SIUZDAK, G. Mass spectrometry for biotechnology. San Diego, **Academic Press**, p. 161, 1996.

STEFFEN, H., RIEG, S., WIEDEMANN, I., KALBACHER, H., DEEG, M., SAHL, H.G., PESCHEL, A., GOTZ, F., GARBE, C., SCHITTEK, B. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.50, n.8, p.2608-2620, 2006.

STEWART, B.W. & COATES, A.S. Cancer prevention: a global perspective. **J Clin Oncol.** v. 23, p. 392–403, 2005.

SUBBALAKSHMI, C. & SITARAM, N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. **FEMS Microbiol. Lett.** Amsterdam. v. 160, p. 91-96, 1998.

TOLEDO, R.C. & JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Camp. Biochem. Physiol.** v. 111 (1), p. 1-29, 1995.

TOLEDO, L.F., ZINA, J. HADDAD, C.F.B. Distribuição espacial e temporal de uma comunidade de anfíbios anuros do Município de Rio Claro, São Paulo, Brasil. **Holos Environment**. v. 3, p. 136-149, 2003.

TOSSI, A., SAHL, H.G., PAG, U., OEDENKOVEN, M., SASS, V., SHAI, Y., SHAMOVA, O., ANTCHEVA, N. Analysis of in vitro activities and modes of action of synthetic antimicrobial peptides derived from an alpha-helical sequence template. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 61, p. 341-352, 2008.

ULVATNE, H. & VORLAND, L.H. Bactericidal kinetics of 3 lactoferricins against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Scand. J. Infect Dis.** v. 33, p. 507-511, 2001.

VAN ZOGGEL, H., HAMMA-KOURBALI, Y., GALANTH, C., LADRAM, A., NICOLAS, P., COURTY, J., AMICHE, M., DELBÉ, J. Antitumor and angiostatic peptides from frog skin secretions. **Amino Acids**. p. 815-825, 2010.

VASCONCELOS, T.S. & ROSSA-FERES, D.C. Diversidade, distribuição espacial e temporal de anfíbios anuros (Amphibia, Anura) na região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**. v. 5, p. 1-14, 2005.

WEINBERG, R.A. The Biology of Cancer. **New York: Garland Science, Taylor & Francis Group**. p. 850, 2006.

WIEPRECHT, T., DATHE, M., KRAUSE, E., BEYERMANN, M., MALOY, W. L., MACDONALD, D. L., BIENERT, M. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. **FEBS Lett.** v. 3, n. 417 (1), p. 135-140, 1997.

YEAMAN, M.R. & YOUNT, N.Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacol. Rev.** v. 55, p. 27-55, 2003.

YOULE, R.J. & STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**. v. 9, p. 47-59, 2008.

YOUNT, N.Y., BAYER, A.S., XIONG, Y.Q., YEAMAN, M.R. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. **Biopolymers**. v. 84, p. 435-458, 2006.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 84, p. 5449-5453, 1987.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nat.** v. 415, p. 389-395, 2002.

ZELEZETSKY, I. *et al.* Controlled alteration of the shape and conformational stability of  $\alpha$ -helical cell-lytic peptides: effect on mode of action and cell specificity. **Biochem. J.** v. 390, p. 177–188, 2005.

ZHENG, H. *et al.* A computational approach for peptidomic analysis in taxonomic study of amphibian species. **IEE Transactions on Nanobioscience**. v. 4, p. 241–247, 2005.

ZHU, Z. & WITTE, L. Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor. **Investigational New Drugs**. v. 17, p. 195–212, 1999.

ZINA, J., ENNSER, J., PINHEIRO, S.C.P., HADDAD, C.F.B., TOLEDO, L.F. Taxocenose de anuros de uma mata semidecídua do interior do Estado de São Paulo e comparações com outras taxocenoses do Estado, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**. v. 7, p. 1-9, 2007.

<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/incidence/age/>, acessada em Janeiro 2011.

<http://www.cancer.gov>, acessada em Janeiro 2011.

<http://www.inca.gov.br>, acessada em Janeiro 2011.



## *9. Anexos*

---

## 9. ANEXOS

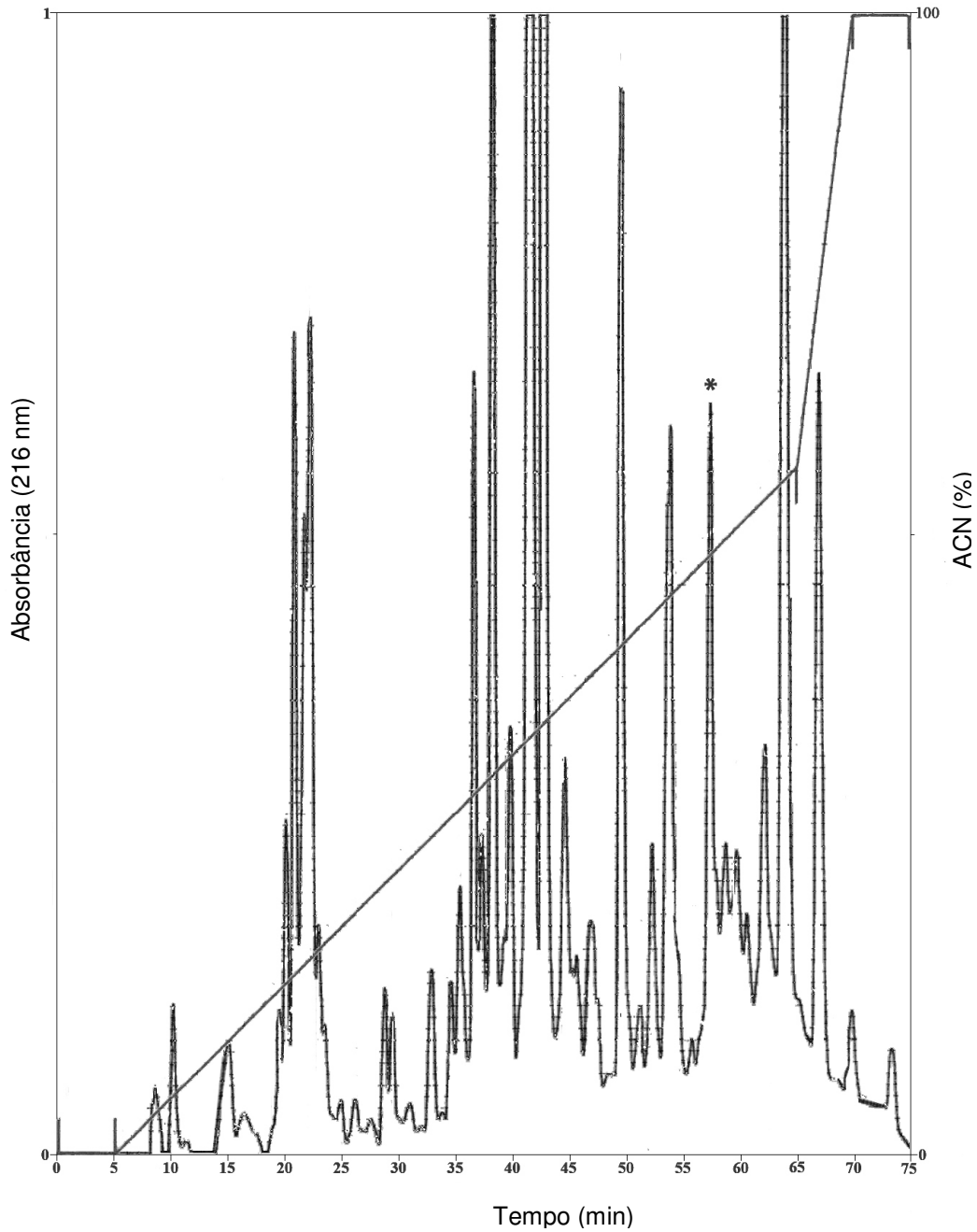


Figura 36. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *Hypsiboas albopunctatus* na coluna C<sub>8</sub> (Sephadex C<sub>8</sub>, 4.6 x 250 mm, Pharmacia Biotech, Sweden) em sistema HPLC com emprego de gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila. A detecção foi monitorada a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min. A fração contendo o peptídeo antimicrobiano caracterizado no presente estudo está indicada com um asterisco.

CeratotoxinA_C_capitata	SIGSALKKALPVAKKIGKIALPIAKAALPVAAG---	33
CeratotoxinA2_C_capitata	SIGSALKKALPVAKKIGKIALPIAKAALPVAAGLVG	36
CeratotoxinB2_C_capitata	SIGSAFKKALPVAKKIGKAALPIAKAALPVVA----	32
CeratotoxinB1_C_capitata	SIGSAFKKALPVAKKIGKAALPIAKAALPVVA----	32
CeratotoxinB_C_capitata	SIGSAFKKALPVAKKIGKAALPIAKAALP-----	29
Ceratoxin_like_H_albopunctatus	--G-----WLDVAKKIGKAAFNVAKNFL-----	21
	*           *       *****   *:   :***   *	

Figura 37. Multi-alinhamento entre as *ceratotoxinas* e o peptídeo *ceratoxin-like* de *H. albopunctatus* contendo leucina como resíduo C-terminal. "\*" indica resíduos idênticos e ":" indica substituições conservativas.