



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

# Prospecção de Bradicininas de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*

**Nathália Carolina Côrtes Rocha Mundim**

ORIENTADOR: Prof. Luciano Paulino da Silva

Brasília – DF  
2008



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

# Prospecção de Bradicininas de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*

**Nathália Carolina Côrtes Rocha Mundim**

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

**ORIENTADOR: Prof. Luciano Paulino da Silva**

Brasília – DF

2008

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus amados pais (Joel e Natalice), meu irmão Pedro e a toda minha família por todo amor, apoio, educação, exemplo, confiança e incentivo durante toda minha vida. Não teria conseguido nada se não fossem eles.

Ao Luciano pela amizade construída, confiança depositada, pela paciência e orientação, ensinamentos e estímulos e incentivos durante todo o tempo.

Ao Carlos Bloch pela oportunidade, confiança e por me mostrar um novo caminho da ciência.

À Maura pela amizade, sábios conselhos, apoio, por ter me ensinado tanto, pelo exemplo e inspiração.

A todos do LEM (Laboratório de Espectrometria de Massa) pela amizade, ajuda, apoio, incentivo e momentos memoráveis! Agradeço ao Guil, Mari, Carol, Tati, Cíntia, Sophia, Flávio, Sifu, Lindomar, Marta, Yuri e Renato. Agradeço também aos agregados do LEM, Ingrid, Gabriel, Eder, Felipe e Stephan. E aos antigos membros Zé, Fernandinha, Dani e Vlad.

À Karlinha pela amizade, ajuda sempre fosse nos experimentos ou nos problemas cotidianos, pelas idéias e por não ter me dado (aparentemente) nenhum apelido inesquecível.

À Bia pela ajuda na concretização dos experimentos, nos cálculos e pelas boas risadas.

Ao Saulo que seguiu essa jornada desde o começo sempre ao meu lado, fosse me ajudando e apoiando, fosse me tirando do sério. Tudo isso só fortaleceu ainda mais nossa amizade.

Ao Jorge Taquita por ter me ensinado muita coisa no laboratório e pela amizade.

Ao Marcelo Bemquerer por ter me ensinado e ajudado a sintetizar os peptídeos.

À Grazi Joanitti por ter cedido seu tempo e seu espaço no Laboratório de Morfologia e Morfogênese da UnB e me ajudado na realização do experimento com células cancerígenas.

Ao Marco Aurélio Ramirez do Instituto de Ciências Biológicas da USP pela realização do experimento com a produção de óxido nítrico.

À todos os colaboradores que me ajudaram a tornar esse projeto possível.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Recursos Genéticos e Biotecnologia por permitir o uso das instalações e por toda a infra-estrutura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro em parte do mestrado.

Aos amigos que me acompanham desde do colégio e sempre me apoiaram e incentivaram em todos os aspectos da minha vida e mestrado mesmo não entendendo nada do meu projeto. Em especial as amigas Bruna, Leca, Edi, Lari, Ju, Kelly, Nina, Mônica, Aninha, Lius, Loca por terem se tornado irmãs e aos amigos Hugo, Jun, Rô, Hanks, Negão.

## RESUMO

A pele dos anfíbios tem um papel chave na sobrevivência e na capacidade de explorar os mais diversos tipos de ambientes e por isso é capaz de produzir uma grande variedade de componentes muitos dos quais são descritos como mecanismo de defesa para evitar a invasão por patógenos ou a ingestão por predadores. Um exemplo é a bradicinina, um nonapeptídeo originado do sistema cinina-caliceína e que nos anfíbios pode estar relacionado com mecanismos de defesa contra a ingestão por predadores e por esse motivo, pode sofrer alteração em sua estrutura primária de acordo com variações geográficas e nicho das espécies, permitindo uma adaptação do anuro ao ambiente no qual se encontra. Em mamíferos as bradicininas podem apresentar vários efeitos tais como vasodilatação, contração de músculo liso, mediar à inflamação, entre outros. Nesse estudo a secreção de três espécies do gênero *Phyllomedusa*, *Phyllomedusa tomopterna*, *Phyllomedusa rohdei* e *Phyllomedusa burmeisteri*, de diferentes regiões do Brasil foram analisadas quanto à presença de análogos de bradicinina. A secreção foi obtida de espécimes adultos por eletroestimulação. O extrato total foi analisado por espectrometria de massa após etapas de purificação e fracionamento por Cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC) utilizando colunas semi-preparativas. Diversos análogos de bradicininas já descritos na literatura e novos análogos foram encontrados. Peptídeos selecionados foram sintetizados e submetidos a ensaios biológicos relacionados com a inflamação e de ação mitogênica para a determinação de sua atividade biológica.

## ABSTRACT

Amphibian skin has a crucial role on the survival and on the capacity of the animal of exploring the most different ambients, That is the reason why they are capable of producing the plethora of compounds, described as defensive mechanisms to avoid pathogen invasion or ingestion by predators. One of these compounds, known as bradykinin, is a nonapeptide originated from the kallikrein-kinin system and may be related to an anti-predation mechanism against the ingestion by predators and that may be the reason that they might have geographic variation allowing an adaptation of amphibians to the ambient where they live. In mammals, bradykinin can cause various physiological effects such as vasodilatation, contraction of smooth muscle and mediate inflammation. The present study describes the molecular screening of BK analogs found in the secretion of three *Phyllomedusa* genus species from two regions of Brazil. The skin secretion was obtained from adult frog specimens by mild electric stimulation and the crude secretion was submitted to RP-HPLC using semi-preparative columns. Novel bradykinin related peptides were described as well as 18 peptides already characterized in the literature. Selected peptides were synthesized and submitted to biological assays in order to assess their mode of action during inflammation and mitogenic processes.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACN** - Acetonitrila

**BK** - Bradicinina, do inglês “Bradykinin”

**BRP** - Peptídeos relacionados à bradicinina, do inglês “Bradykinin-related peptides”

**Da** - Dalton

**DMF** - Dimetilformamida

**DMEM** - Meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco, do inglês “Dulbecco’s modified Eagle’s Medium”

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**ECA** - Enzima conversora de angiotensina

**Fmoc** - “Fluorenylmethoxycarbonyl”

**HMWK** - Cininogênio de alta massa molecular, do inglês “High Molecular Weight Kininogen”

**LIFT** - “Laser induced forward transfer”

**LMWK** - Cininogênio de baixa massa molecular, do inglês “Low Molecular Weight Kininogen”

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**MALDI-TOF** - “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time-of-flight”

**MS** - Espectrometria de Massa, do inglês “Mass spectrometry”

**MS/MS** - Espectrometria de Massa *in tandem*, do inglês “Tandem Mass spectrometry”

**MTT** - brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

**PBS** - Tampão fosfato-salina

**PK** - Filocinina, do inglês “Phyllokinin”

**ESI Q-TOF** - “Electrospray ionization Quadrupole Time-of-flight”

**RP-HPLC** - Cromatografia Líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês “Reverse Phase High performance liquid chromatography”

**RPMI** - meio de cultura rico em sais e aminoácidos, do inglês “Roswell Park Memorial Institute Medium”

**TFA** - Ácido trifluoracético

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Distribuição geográfica no Brasil das espécies em estudo.	3
Figura 2. Vias de formação das cininas no plasma sanguíneo e nos tecidos. (Baseado em Walker <i>et al.</i> , 1995). HMWK (cininogênio de alta massa molecular); LMWK (cininogênio de baixa massa molecular).	6
Figura 3. Representação do gene codificador do cininogênio de alta e baixa massa molecular (HMWK) (modificado de Kaplan <i>et al.</i> , 2002).	7
Figura 4. Comparação da estrutura primária dos análogos de bradicinina gerada no plasma de diferentes espécies de vertebrados. (*) indica que o resíduo é idêntico ao encontrado nos mamíferos (Baseado em Conlon, 1999).	7
Figura 5. Cromatogramas dos extratos totais das secreções cutâneas de <i>P. rohdei</i> (A), <i>P. tomopterna</i> (B) e <i>P. burmeisteri</i> (C). As amostras foram fracionadas em uma coluna C <sub>18</sub> Vydac 218TP510 e equilibradas com água 0,1% TFA. A eluição ocorreu utilizando-se um gradiente linear de ACN (5-95%) com um fluxo de 2,5 mL/min. A cromatografia foi monitorada nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (cinza).	33
Figura 6. Região cromatográfica contendo a identificação das frações analisadas. (A) <i>P. rohdei</i> , (B) <i>P. tomopterna</i> e (C) <i>P. burmeisteri</i> .	34
Figura 7. Análise individual da relação massa-carga (m/z 500-1800) e o percentual de acetonitrila (ACN) em que eluíram os componentes moleculares de <i>P. burmeisteri</i> (108 íons detectados), <i>P. tomopterna</i> (128 íons detectados) e <i>P. rohdei</i> (166 íons detectados).	36
Figura 8. Análise comparativa entre a relação massa-carga (m/z 500-1800) e o percentual de acetonitrila (ACN) em que eluíram os componentes moleculares das três espécies do gênero <i>Phyllomedusa</i> .	37
Figura 9. Gráfico de caixa da análise comparativa entre as três espécies de <i>Phyllomedusa</i> quanto ao número de componentes detectados e a relação massa-carga (m/z).	38
Figura 10. Gráfico de caixa da análise comparativa entre as três espécies de <i>Phyllomedusa</i> quanto ao número de componentes detectados e o tempo de retenção em coluna semi-preparativas de RP-HPLC.	39
Figura 11. Seqüenciamento <i>De Novo</i> de BK clássica [M + H] = 1060.5 Da. Os fragmentos apresentados permitiram a identificação completa das séries y e b. As seqüências peptídicas usando código de uma letra estão indicadas na parte superior do espectro. Os íons não selecionados representam íons das séries complementares ou da fragmentação interna.	40
Figura 12. Seqüenciamento <i>De Novo</i> de BK2 [M + H] = 1233.5 Da. Os fragmentos apresentados permitiram a identificação completa das séries y e b. As seqüências peptídicas usando código de uma letra estão indicadas na parte superior do espectro. Os íons não selecionados representam íons das séries complementares ou de fragmentação interna.	41
Figura 13. Cromatogramas dos peptídeos PSLEM 07/012 (A) e PSLEM 07/013 (B). As amostras foram fracionadas em uma coluna C <sub>18</sub> Vydac 218TP510 e equilibradas com água 0,1% TFA. A eluição ocorreu utilizando-se um gradiente linear de ACN (5-95%) com um fluxo de 2,5 mL/min. A cromatografia foi monitorada nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (cinza).	43



Figura 14. Cromatograma do peptídeo PSLEM 07/013 digerido com tripsina. A amostra foi fracionada em uma coluna C <sub>18</sub> Vydac 218TP510 e equilibrada com água 0,1% TFA. A eluição ocorreu utilizando-se um gradiente linear de ACN (5-95%) com um fluxo de 2,5 mL/min. A cromatografia foi monitorada nos comprimentos de onda de 216nm (preto) e 280nm (cinza).	44
Figura 15. Análise gráfica da viabilidade em macrófagos murinos J774 sob diferentes concentrações de BK1 e BK2. M1 representa as células viáveis observadas e M2 as células com alterações significativas.	45
Figura 16. Análise da fragmentação do DNA de macrófagos tratados com BK1 e BK2 em diferentes concentrações. M1 representa as células com DNA fragmentado observadas e M2 as células com DNA intacto.	46
Figura 17. Atividade hemolítica das BKs (BK, BK1 e BK2). O experimento controle para a obtenção da hemólise total foi realizado com a adição de 50 µL de H <sub>2</sub> O milli-Q a 150 µL de suspensão de eritrócitos. A concentração máxima (128 µg/mL) apresentou < 5% de hemólise.	47
Figura 18. Representação gráfica da relação da concentração do peptídeo e a concentração de nitrito liberado pelas células. (A) BK, (B) BK1 e (C) BK2 após 24 horas de incubação. * Diferença estatisticamente significativa (P < 0.05) em relação ao controle sem LPS.	48
Figura 19. Representação gráfica da relação da concentração do peptídeo e a concentração de nitrito liberado pelas células. (A) BK, (B) BK1 e (C) BK2 após 48 horas de incubação.	49
Figura 20. (A) Relação entre o controle e as amostras da altura da região plantar dos camundongos após a administração das BKs. (B) Relação entre o peso da pata controle e a com a administração da droga.	50
Figura 21. Análise da absorção do azul de Evans em 620nm das patas controle e tratadas com as BKs (BK, BK1 e BK2) (A) Leitura após 18 horas de incubação a 37°C. (B) Leitura após 24 horas de incubação a 37°C.	51
Figura 22. Análise em microscópio de contraste de fase das células do câncer tratadas com a BK. (A) Controle, (B) [16 µg/mL], (C) [32 µg/mL] e (D) [64 µg/mL]. Barras = 100µm.	52
Figura 23. Análise em microscópio de contraste de fase das células do câncer tratadas com a BK1. (A) Controle, (B) [16 µg/mL], (C) [32 µg/mL] e (D) [64 µg/mL]. Barras = 100µm.	53
Figura 24. Análise em microscópio de contraste de fase das células do câncer tratadas com a BK2. (A) Controle, (B) [16 µg/mL], (C) [32 µg/mL] e (D) [64 µg/mL]. Barras = 100µm.	54
Figura 25. Análise comparativa das células viáveis (%) observadas em cada concentração dos peptídeos BK, BK1 e BK2.	55
Tabela 1. Efeitos fisiológicos dos receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> (Regoli, 1997).	10
Tabela 2. Bradicininas e análogos já descritos e encontrados na pele de anfíbios do gênero <i>Phyllomedusa</i> . Em negrito os peptídeos selecionados para síntese química.	42

## TABELA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Sigla (Código 3 letras)	Representação (Código 1 letra)	MM monoisotópica (Resíduo)
Glicina	Gly	G	57.02
Alanina	Ala	A	71.03
Serina	Ser	S	87.03
Prolina	Pro	P	97.05
Valina	Val	V	99.06
Treonina	Thr	T	101.04
Cisteína	Cys	C	103.00
Isoleucina	Ile	I	113.08
Leucina	Leu	L	113.08
Asparagina	Asn	N	114.11
Ácido aspártico	Asp	D	115.02
Glutamina	Gln	Q	128.05
Lisina	Lys	K	128.09
Ácido Glutâmico	Glu	E	129.04
Metionina	Met	M	131.04
Histidina	His	H	137.05
Fenilalanina	Phe	F	147.06
Arginina	Arg	R	156.10
Tirosina	Tyr	Y	163.06
Triptofano	Trp	W	186.07

## SUMÁRIO

Agradecimentos	i
Resumo	lii
Abstract	iv
Lista de abreviaturas	v
Lista de figuras e tabelas	vi
Tabela de aminoácidos	viii
Sumário	ix
1. Introdução	1
1.2 Bradicinina	4
1.3 Bradicinina em anfíbios	8
1.4 Receptores B1 e B2	9
1.5 Efeitos	10
2. Justificativa	12
3. Objetivos	14
3.1 Objetivo geral	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. Material e métodos	16
4.1 Anfíbios	17
4.2 Extração da secreção da pele	18
4.3 Purificação dos peptídeos obtidos da secreção da pele	18
4.4 Identificação molecular e estrutura primária dos peptídeos	18
4.5 Síntese dos peptídeos	29
4.6 Digestão enzimática da PSLEM 07/013	21
4.7 Quantificação dos peptídeos	21
4.8 Ensaio biológico	22
4.8.1 Teste hemolítico	22
4.8.2 Análise da integridade da membrana celular e da fragmentação de DNA de macrófagos murinos	22
4.8.2.1 Preparo da amostra	22
4.8.2.2 Integridade da membrana	23
4.8.2.3 Fragmentação do DNA nas células	23
4.8.3 Produção de NO	23
4.8.4 Análise da permeabilidade vascular e formação de edema	24
4.8.5 Cultura de células	25
4.8.5.1 Linhagem celular	25
4.8.5.2 Manutenção da cultura de células	25
4.8.5.3 Preparação das amostras de BK, BK1 e BK2 para o tratamento das células.	26
4.8.5.4 Tratamento das células com peptídeos	27
4.8.5.5 Viabilidade Celular	28
4.8.5.6 Microscopia de contraste de fase	29
4.9 Análises estatísticas	29
5. Resultados	31
5.1 Cromatografia	32
5.2 Análise dos componentes detectados	35
5.3 Identificação molecular (estrutura primária)	40
5.4 Cromatografia dos peptídeos sintéticos	42

5.5 Cromatografia da digestão da PSLEM07/013	44
5.6 Ensaio biológico	45
5.6.1 Análise da viabilidade e fragmentação de macrófagos murinos	45
5.6.2 Teste hemolítico	47
5.6.3 Produção de NO	47
5.6.4 Extravasamento vascular e formação de edema	50
5.6.5 Teste anti-câncer oral humano	52
6. Discussão	56
7. Conclusão	62
8. Bibliografia	64

# **1. INTRODUÇÃO**

Por centenas de anos, as plantas constituíram a principal fonte de compostos bioativos para uso farmacêutico. Entretanto, nas últimas décadas a busca por fontes de biomoléculas de origem animal tornou-se cada vez mais evidente. Inúmeros animais têm tido suas secreções, venenos ou peçonhas estudados, como por exemplo, serpentes (Koh *et al.*, 2006), vespas (Beleboni *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2006), aranhas (Escoubas, 2006; Volsi *et al.*, 2006), escorpiões (Favreau *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2008) e anfíbios (Nascimento *et al.*, 2003; Brand *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, a pele dos anfíbios tem sido objeto de interesse e estudo de vários grupos de pesquisa, assim como de indústrias farmacêuticas, devido à abundância e diversidade de moléculas biologicamente ativas e com potencial para aplicações biotecnológicas (Batista *et al.*, 1999; Clarke, 1997; Lewis *et al.*, 2003; Stewart, 2004; Moreau *et al.*, 2005).

A pele dos anfíbios tem um papel chave na sobrevivência desses animais e na sua capacidade de habitar ambientes tão heterogêneos. A função da pele não se resume somente à respiração, regulação hídrica, defesa contra predadores e microrganismos, mas também atua na excreção, controle de temperatura, reprodução e camuflagem. Todas as funções têm que atuar em sinergismo para que uma não iniba a ação da outra e sua secreção é extremamente rica em moléculas (Clarke, 1997). A secreção cutânea de anfíbios é constituída na maior parte por peptídeos ou proteínas, aminas biogênicas, esteróides, alcalóides, entre outras (Chen *et al.*, 2006; Lacombe *et al.*, 2000).

Esta secreção é liberada por glândulas altamente especializadas em situações de ataque (ex: predadores) ou de estresse (ex: invasão por organismos patogênicos). Diferentemente de outros organismos que introduzem subcutaneamente a peçonha nos predadores e presas utilizando de métodos invasivos como órgãos inoculadores de peçonha, ferrão e outros, o veneno dos anfíbios é simplesmente secretado na superfície da pele mediante um estímulo. Isto sugere que algumas destas toxinas são liberadas para inibir a ingestão pelos predadores, pois vários componentes do veneno podem sofrer ativação oralmente por enzimas. Uma resposta observada do predador comumente é uma ânsia de vômito seguida da regurgitação da presa (Thompson *et al.*, 2006).

O Brasil possui uma das mais ricas anfíbiofaunas do mundo, o que favorece a pesquisa de novas biomoléculas extraídas das secreções cutâneas desses animais. Dentre as espécies mais estudadas destacam-se aquelas pertencentes ao gênero *Phyllomedusa*, sendo que, atualmente, são conhecidas 33 espécies de *Phyllomedusas* que estão amplamente distribuídas por várias regiões do Brasil e da América do Sul (Frost, 2007). Estes animais possuem algumas características peculiares, tais como, coloração, pupila vertical, presença de glândulas lipídicas na pele, morfologia do girino, modo peculiar de locomoção e de reprodução (Brandão e Fajardo, 2001). As espécies *P. rohdei* (Mertens, 1926) e *P. burmeisteri* (Boulenger, 1882) são encontradas na região sudeste, mais precisamente na região da Mata Atlântica. A espécie *P. tomopterna* (Cope, 1868) se encontra na região Amazônica brasileira e em algumas regiões da Amazônia colombiana e boliviana. A Figura 1 demonstra a distribuição espacial dessas espécies no Brasil.



Figura 1. Distribuição geográfica no Brasil das espécies em estudo.

Dentre as moléculas bioativas encontradas nas secreções cutâneas de anfíbios do gênero *Phyllomedusa* destacam-se as centenas de peptídeos bioativos descritos até o momento (Brand *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007). Os peptídeos bioativos são biomoléculas formadas pela ligação covalente (ligação peptídica) de dois ou mais aminoácidos que atuam na defesa e adaptação aos diversos ambientes. Seu tamanho pequeno e de fácil síntese química, sua estabilidade estrutural e a atuação específica fazem deles importantes fontes de potenciais agentes farmacológicos (Lewis *et al.*, 2003).

Os peptídeos de venenos precisam ser estáveis o suficiente para sobreviver à degradação química em solução e temperatura ambiente, e também à degradação enzimática por meio do processamento pelas proteases muitas vezes presentes no próprio veneno. Essa estabilidade é geralmente obtida naturalmente pela presença de modificações pós-traducionais e/ou pontes dissulfeto que dobram o peptídeo em uma estrutura mais estável. Enzimas específicas são usadas durante a produção de peptídeos de veneno para introduzir essas modificações em sítios específicos que podem contribuir para aumentar a biodisponibilidade, potência e a estabilidade (Lewis *et al.*, 2003).

Peptídeos bioativos em anfíbios podem ser antimicrobianos (associados com processos de defesa contra patógenos), regulatórios ou hormonais. Estes últimos são em sua maioria análogos a hormônios e neuropeptídeos de mamíferos (Bevins *et al.*, 1990; Lazarus *et al.*, 1993, Brand *et al.*, 2006), sendo que um exemplo representativo é o das bradicininas identificadas na secreção cutânea de diversas espécies de anfíbios das Américas, África, Europa e Ásia (Liang *et al.*, 2006).

## **1.2 Bradicinina**

A história das cininas começa em 1909 quando dois cirurgiões franceses Abelous e Bardier observaram uma brusca queda na pressão sanguínea de um cachorro após a injeção intravenosa de frações extraídas de urina humana (Abelous *et al.*, 1909; Costa-Neto *et al.*, 2008).

Em 1928, Frey e Kraut atribuíram o efeito hipotensor da urina à presença de uma substância termolábil e não dialisável. A busca pela glândula



produtora dessa molécula resultou na descoberta de um princípio hipotensor similar no pâncreas e a essa substância foi dado o nome de “calicreína” (Kallikreas, pâncreas em Grego) (Kraut *et al.*, 1930). Algum tempo depois a literatura ficou repleta de artigos sobre efeitos hipotensores em várias espécies. Em 1937, enquanto realizava estudos com calicreína misturada a plasma sanguíneo, Eugen Werle concluiu que provavelmente uma nova substância deveria ser gerada e que esta seria capaz de contrair o íleo isolado de cobaias. A ação dessa substância era similar àquela da calicreína, mas apresentava um baixo peso molecular e era termoestável. Assim concluiu que era um polipeptídeo, primeiramente denominado DK e posteriormente calidina (Regoli *et al.*, 1980; Costa-Neto *et al.*, 2008).

A bradicinina (BK) foi descoberta em meio a estudos sobre a histamina por Rocha e Silva em 1948. A BK é um nonapeptídeo encontrado inicialmente nas plaquetas de mamíferos, sendo liberado na corrente sanguínea pelo sistema cinina-calicreína, processo que envolve uma seqüência de processamentos realizados por inúmeras enzimas proteolíticas (Figura 2).

Em síntese, a ativação do Fator XII (Fator de Hageman) no sangue e em tecidos lesionados ou até mesmo *in vitro* pelo contato com superfícies carregadas resulta na ativação da pré-calicreína plasmática e na subsequente geração de BK pela clivagem do cininogênio de alta massa molecular (HMWK).

O cininogênio é codificado por um gene composto por 11 éxons, onde os nove primeiros correspondem à cadeia pesada (Figura 3). O décimo éxon codifica a BK enquanto o décimo primeiro codifica a cadeia leve da calidina (Moreau *et al.*, 2005). Por serem muito conservados no domínio das BKs, os cininogênios podem ser uma ferramenta útil no estudo da filogenia dos vertebrados (Zhou *et al.*, 2008).

Os análogos de BK encontrados em outros vertebrados (aves, répteis e peixes) diferem das moléculas dos mamíferos na estrutura primária onde ocorrem substituições de aminoácidos, truncamento e eventualmente até mesmo extensão tanto da região N- quanto da região C- terminal (Conlon *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2002; Brand *et al.*, 2006). Algumas estruturas primárias dessas moléculas encontradas no plasma são mostradas na Figura 4. Muitos destes análogos também já foram isolados e identificados na secreção cutânea de anfíbios (Zhou *et al.*, 2007).

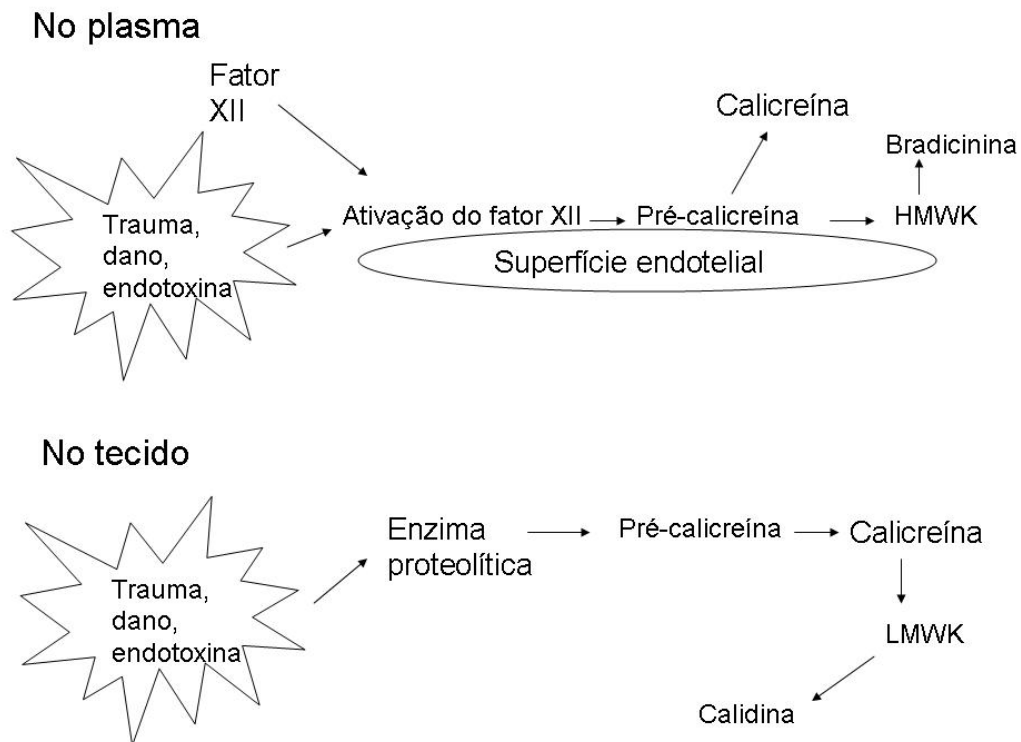


Figura 2. Vias de formação das cininas no plasma sanguíneo e nos tecidos. (Baseado em Walker *et al.*, 1995). HMWK (cininogênio de alta massa molecular); LMWK (cininogênio de baixa massa molecular).

Os precursores de bradicininas identificados até o momento na pele dos anuros Phyllomedusíneos possuem uma única seqüência codificadora de peptídeo relacionado à bradicinina (BRP) apesar da variedade de BRPs que podem ser gerados pelas modificações pós-traducionais de diferentes sítios (Sin *et al.*, 2008).

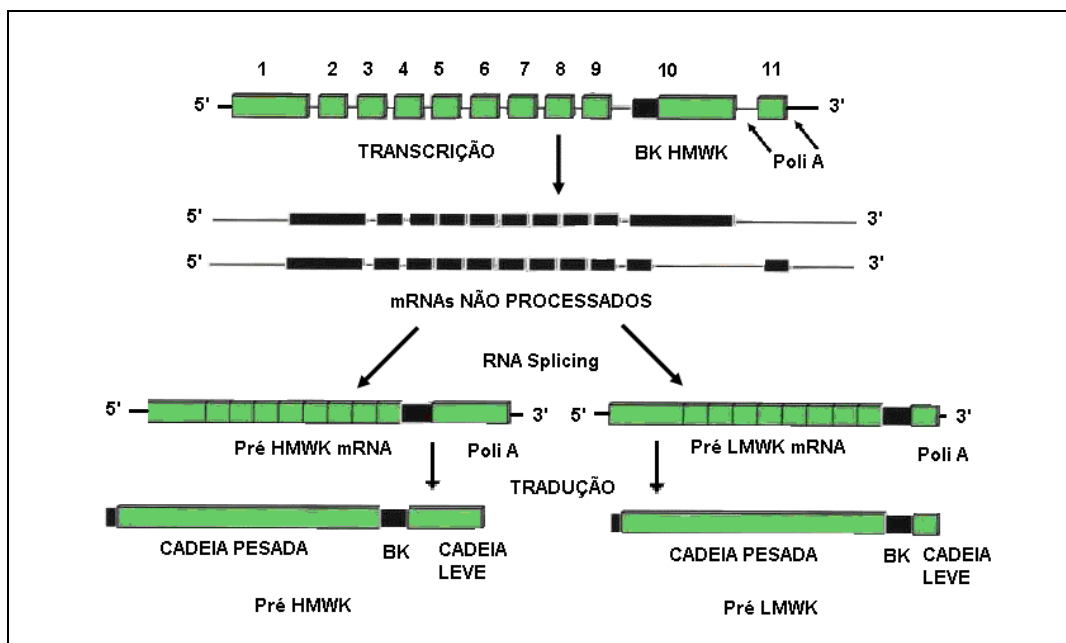


Figura 3. Representação do gene codificador do cininogênio de alta e baixa massa molecular (HMWK) (modificado de Kaplan *et al.*, 2002).

<b>Mamíferos</b>	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg
<b>Galinha</b>	*	*	*	*	*	Thr	*	Leu	*
<b>Jacaré</b>	*	*	*	*	*	Thr	*	*	*
<b>Tartaruga</b>	*	*	*	*	*	Thr	*	*	*
<b>Monstro de Gila</b>	*	Leu	*	*	*	Thr	*	*	*
<b>Pítón</b>	Ala	*	*	*	*	Thr	*	*	*
<b>Colubridae</b>									
<b>(Coachwhip)</b>	Val	*	*	*	*	Thr	*	*	*
<b>Colubridae</b>									
<b>(Bullsnake)</b>	Val	*	*	*	*	Thr	*	*	*
<b>Viperidae</b>									
<b>(Crotalus)</b>	Val	*	*	*	*	Thr	*	*	*
<b>Amphiuma</b>	Phe	Ile	*	*	Leu	*	*	*	*
<b>Dipnóicos</b>	Tyr	Gly	*	*	*	*	Ala	Pro	*
<b>Truta</b>	*	*	*	*	Trp	*	*	Leu	*
<b>Bacalhau</b>	*	*	*	*	Trp	*	*	Leu	*
<b>Amiidae</b>	*	*	*	*	Trp	*	*	*	*
<b>Semionotiformes</b>	*	*	*	*	Trp	*	*	*	*
<b>Esturjão</b>	*	*	*	*	Met	*	*	*	*

Figura 4. Comparação da estrutura primária dos análogos de bradicinina gerados no plasma de diferentes espécies de vertebrados. (\*) indica que o resíduo é idêntico ao encontrado nos mamíferos (Baseado em Conlon, 1999).

A BK é rapidamente degradada, primeiramente na circulação pulmonar pela ação das carboxipeptidases N (cininase I), enzima conversora de angiotensina (ECA ou cininase II) e endopeptidases (Colon, 1999).

Dentre seus efeitos, a BK causa vasodilatação, ou seja, aumento do calibre dos vasos sanguíneos devido ao relaxamento das fibras musculares lisas que constituem suas paredes. Assim, o fluxo sanguíneo aumenta e a pressão arterial é reduzida (Conlon *et al.*, 1997; Conlon, 1999; Fernandez *et al.*, 2004). A BK também pode contrair o tecido muscular liso em alguns órgãos, bem como em alguns mamíferos, contrair o músculo bronquial mais lentamente que a histamina, por isso a origem de seu nome (brad = lentamente). Em mamíferos, a produção de BK resulta em vasodilatação, que ocorre pela diminuição da resistência arteriolar, aumento da permeabilidade vascular, promove broncoconstrição, induz contração dos músculos lisos gastrointestinais e uterino, estimula a secreção eletrolítica pelos rins, promove a ativação primária dos neurônios sensoriais (ou sensoriais) aferentes, estimula a liberação de citocinas e possivelmente possui efeito mitogênico. Em algumas terminações nervosas sensíveis à BK, pode ainda promover a ativação das vias da dor, sendo uma das causas de processos inflamatórios (Chen *et al.*, 2007).

### **1.3 Bradicinina em anfíbios**

A BK e diversos BRP foram encontrados recentemente em certos venenos de serpentes (Koh *et al.*, 2006), vespas (Beleboni *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2006) e anfíbios (Nascimento *et al.*, 2003). A BK e análogos (incluindo uma forma estendida denominada filocinina, PK) foram encontrados em secreções cutâneas de várias espécies de pererecas arborícolas do gênero *Phyllomedusa*, como por exemplo, a *P. sauvagei*, que apresentou nove análogos a BK em seu extrato cutâneo (Chen *et al.*, 2003), assim como a *P. hypochondrialis* que apresentou dezoito análogos (Brand *et al.*, 2006).

Apesar de vários análogos de BK terem sido encontrados na secreção de anfíbios, um precursor circulante no sangue ainda não foi identificado (Thompson *et al.*, 2006). Recentemente foi encontrado, por meio de análises

de cDNAs, um precursor de BK diretamente em fragmentos de pele, indicando que a expressão desse peptídeo se dá diretamente nesse tecido e não pelo sistema cinina-caliceína como nos mamíferos e diversos outros vertebrados (Thompson *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). Entretanto, a estrutura gênica de tal molécula não se assemelha àquela descrita para os cininogênios de outros vertebrados, possuindo estrutura similar àquela encontrada em outros peptídeos bioativos de anfíbios (peptídeo sinal-peça acídica-peptídeo maduro). O significado biológico da presença de BKs e PKs na secreção cutânea dos anuros não está claro, mas o que se pressupõe é que essas moléculas são relacionadas com a defesa contra potenciais predadores (Conlon *et al.*, 1999; Conlon *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Volsi *et al.*, 2006). Interessantemente e corroborando com esse ponto, na pele de diversos anfíbios foram encontrados análogos de BKs de diversos grupos de vertebrados incluindo répteis, aves e mamíferos que são os potenciais predadores desses anfíbios (Thompson *et al.*, 2006; Sin *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008). Alguns autores afirmam ainda que as BKs podem atuar sozinhas ou sinergisticamente com outros compostos presentes na secreção (Liang *et al.*, 2006). Exemplos desses análogos encontrados em diversas espécies de vertebrados podem ser observado na Figura 4.

#### **1.4 Receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>**

As cininas são conhecidas como peptídeos que participam em processos fisiológicos vasculares e inflamatórios. Esses peptídeos são gerados pela ação das caliceínas sobre os cininogênios e atuam pela ligação a dois tipos de receptores, nomeados B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, que pertencem à família de receptores acoplados às proteínas-G. Esses receptores são diferenciados farmacologicamente pela possibilidade de selecionar fortemente agonistas e antagonistas (Colon, 1998).

Powell e colaboradores em 1992 demonstraram que o receptor B<sub>2</sub> em humanos está localizado no cromossomo 14 e Chai em 1996 evidenciou que o B<sub>1</sub> está contido no mesmo cromossomo e próximo ao gene do B<sub>2</sub>. Os

receptores humanos B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> possuem respectivamente 353 e 364 aminoácidos (Regoli *et al.*, 1997).

Em contraste com os receptores B<sub>2</sub>, que são expressos em uma grande variedade de células e tecidos sob condições fisiológicas, os receptores B<sub>1</sub> são geralmente pouco expressos em tecidos saudáveis, mas sua expressão aumenta rapidamente sob condições patológicas ou pela exposição a antagonistas do receptor B<sub>1</sub> (Costa-Neto *et al.*, 2008). O receptor B<sub>2</sub> é sensível a BK e calidina e o B<sub>1</sub> sensível a BK e seus metabólitos (Vazini *et al.*, 2005).

Tabela 1. Efeitos fisiológicos dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (Regoli *et al.*, 1997).

<b>B<sub>1</sub> (sob indução)</b>	<b>B<sub>2</sub> (efeitos gerais)</b>
Vasoconstrição	Vasodilatação (aumento do fluxo sanguíneo, hipotensão)
Vasodilatação	Venoconstrição (extravasamento do plasma, edema)
Estimulação de nervos sensoriais, músculos lisos e de várias células	Estimulação do sistema nervoso (dor, reflexos) e músculos lisos
Venoconstrição	Migração celular (inflamação)

O receptor B<sub>1</sub> aparenta ser parte de um grupo especial de proteínas porque este não é constitutivamente expresso em condições normais, mas apenas quando há estímulo inflamatório, infeccioso ou traumático (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005; Calixto *et al.*, 2004). Porém, os receptores B<sub>1</sub> possuem um papel importante nas diversas doenças crônicas envolvendo dor e inflamação, tais como asma, artrite, osteoartrite, septicemia e câncer. Isto sugere que moléculas que interagem com os receptores de cininas podem ser as novas drogas para tratamento da dor crônica. (Campos *et al.*, 2006).

### 1.5 Efeitos

Os principais efeitos farmacológicos das bradicininas quando mediados pela ativação do receptor B<sub>1</sub> são vasodilatação, extravasamento de proteína do plasma, dor, ativação da interação das células endoteliais e leucócitos e

acúmulo de leucócitos (Walker *et al.*, 1995; Saleh *et al.*, 1997; Kaplan *et al.*, 2001; Calixto *et al.*, 2000; Stewart, 2004). A ação do receptor B<sub>1</sub> difere entre espécies (Ellis e Fozard, 2002). Os receptores B<sub>1</sub> de ratos e camundongos apresentam grande identidade de seqüência (Ellis *et al.*, 2002).

A BK pode tanto contrair quanto dilatar o músculo liso vascular por ativação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> dependendo dos tecidos específicos. *In situ*, a resposta predominante é a vasodilatação pelo estímulo da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) nas células endoteliais vasculares para produzir óxido nítrico (NO) e prostaglandina (Walker *et al.*, 1995; Witherow *et al.*, 2003).

Nos processos alérgicos, a desgranulação dos mastócitos ocorre pelo estímulo da produção e liberação de prostanóides e citocinas em vários tecidos, incluindo fibroblastos e células endoteliais, que podem estimular outras células do sistema imune a ampliar a resposta inflamatória (Walker *et al.*, 1995). As cininas ativam os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e promovem a liberação de outros agentes inflamatórios tais como as prostaglandinas, leucotrienos, histamina, fator de ativação de plaquetas, óxido nítrico, citocinas, entre outros derivados de leucócitos, macrófagos, mastócitos e células endoteliais causando ou influxo celular ou extravasamento vascular do plasma. (Banthon *et al.*, 1991; Cruwys *et al.*, 1994).

Nas vias aéreas esses efeitos incluem broncoconstrição e broncodilatação, aumento da secreção de muco, tosse, estimulação do sistema colinérgico e edema resultando no extravasamento microvascular. Contudo o mecanismo continua não esclarecido. A broncoconstrição ocasionada pela BK é mediada pelo receptor B<sub>2</sub> (Ellis *et al.*, 2002).

Em Brand *et al.* 2006, a atividade da [Val]<sup>1</sup>, [Thr]<sup>6</sup>,-bradicinil-QS (BK2) foi detectada em culturas celulares que expressam o receptor B<sub>2</sub> assim como na contração do preparado células de íleo de cobaia, porém quando comparada a potência da resposta apresentada por este análogo com a da BK como controle positivo, observa-se uma resposta mais atenuada. Isso ocorre possivelmente devido a especificidade do sítio de ligação do receptor.

## **2. JUSTIFICATIVA**



A possibilidade de se encontrar novos componentes nas secreções dos anfíbios, assim como análogos a moléculas já descritas em outras espécies, tem despertado um crescente interesse em diversos grupos de pesquisa. No caso das *Phyllomedusas*, vem sendo observada uma grande variação na composição molecular da secreção cutânea de uma espécie para outra, mesmo entre aquelas que habitam uma mesma região e não raramente dentro da mesma espécie.

A abundância e diversidade dos peptídeos variam entre as espécies. Ricas fontes de moléculas foram encontradas nos gêneros *Phyllomedusa* e *Xenopus*. Uma descoberta importante é que certos peptídeos são prevalentes entre espécies de anfíbios residentes em uma região geográfica específica. Por exemplo, as ceruleínas são encontradas em diferentes espécies de anuros geograficamente situados na América Central, sudeste da África e da Austrália, enquanto análogos de bombesina foram encontrados em uma diferente distribuição geográfica. Isso prediz reflexos da adaptação fisiológica para fatores específicos da ecologia dessas zonas, mas o porque disso ocorrer ainda não foi elucidado (Bevins *et al.*, 1990).

Uma emergente explicação revelou pela análise de análogos de BK no sangue de vários táxons de vertebrados que para cada receptor endógeno dos vertebrados predadores, que cada espécie de anfíbio individualmente enfrenta com seus diferentes biótipos, há uma variedade na secreção do anfíbio (Sin, 2008).

Essa análise juntamente com testes biológicos específicos pode evidenciar a existência de peptídeos até mesmo mais efetivos (seletividade e/ou potência) que os já utilizados, permitindo a obtenção de novos modelos apropriados ao desenvolvimento de fármacos, por exemplo para o controle da pressão arterial. Desta forma, os possíveis análogos de BK encontrados poderão apresentar uma maior seletividade, ou seja, atuando em receptores de células específicas, potencializando a disponibilização do medicamento e inovando os tratamentos terapêuticos.

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1 Geral

Realizar a bioprospecção de análogos de bradicininas a partir da secreção cutânea de anfíbios do gênero *Phyllomedusa* encontrados na região de Mata Atlântica (*Phyllomedusa burmeisteri* e *Phyllomedusa rohdei*) e na Floresta Amazônica (*Phyllomedusa tomopterna*).

### 3.2 Específicos

- 1) Purificar por meio de técnicas cromatográficas as frações de interesse;
- 2) Determinar a estrutura primária dos peptídeos encontrados;
- 3) Interpretar as seqüências obtidas e comparar com seqüências disponíveis em banco de dados;
- 4) Correlacionar às características físico-químicas dos componentes moleculares detectados com a região geográfica na quais as espécies são encontradas;
- 5) Sintetizar alguns análogos escolhidos para ensaios de atividade biológica;
- 6) Realizar testes de atividade biológica dos análogos selecionados.
  - 6.1) Teste hemolítico;
  - 6.2) Análise da integridade da membrana celular e da fragmentação de DNA de macrófagos murinos;
  - 6.3) Produção de NO por macrófagos;
  - 6.4) Análise da permeabilidade vascular e formação de edema;
  - 6.5) Anti-câncer oral humano.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 Anfíbios

Espécimes adultos de anfíbios foram coletados na região de Manaus, Amazonas (*P. tomopterna*) e Ubatuba, São Paulo (*P. rohdei* e *P. burmeisteri*) sob a licença do IBAMA (IBAMA licença 097/96-DIFAS, processo número 0637/91 A. C). Ao todo, 3 espécimes de *P. burmeisteri*, 2 de *P. rohdei* e ~10 de *P. tomopterna* foram coletados.



*Phyllomedusa tomopterna* (MA Donnelly)



*Phyllomedusa rohdei* (Unesp)



*Phyllomedusa burmeisteri* (José Roberto de S. A. Leite)

## 4.2 Extração da secreção da pele

A secreção cutânea de cada espécie foi obtida pela aplicação de corrente elétrica branda alternada (5V), recolhida por lavagem da região estimulada com água destilada filtrada (0,22  $\mu\text{m}$ ), liofilizada, aliquotada (2 mg desses extrato bruto) e armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização (Brand *et al.*, 2006).

## 4.3 Purificação dos peptídeos obtidos da secreção da pele

Alíquotas provenientes do extrato total de cada espécie, contendo aproximadamente 2 mg, foram solubilizadas em 500  $\mu\text{L}$  de água ultra pura (Milli-Q, Millipore, Billerica, EUA) contendo ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (solvente A) (v/v) e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, RP-HPLC, (SHIMADZU Co., Kyoto, Japão). Para a separação cromatográfica foi utilizada coluna semi-preparativa 218TP510 (Vydac,  $\text{C}_{18}$ , 10x250 mm, 300  $\text{\AA}$ , Hesperia, USA). A coluna foi previamente lavada com acetonitrila (ACN) contendo TFA 0,1% (v/v) (solvente B) e equilibrada com solvente A. As frações foram eluídas e coletadas manualmente em tubos eppendorf sob um gradiente linear (5 a 95% ACN) de solvente B de 5 a 70 min sob um fluxo de 2,5 mL/min e monitorado a 216 e 280 nm. Frações de interesse foram ainda submetidas à recromatografia em coluna analítica  $\text{C}_{18}$  Dionex Vydac (4 x 250 mm, 300  $\text{\AA}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 218TP54) utilizando gradientes otimizados. Após a coleta das frações, estas foram liofilizadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Brand *et al.*, 2006).

## 4.4 Identificação molecular e estrutura primária dos peptídeos

Para a análise dos componentes moleculares presentes nas frações obtidas, foram utilizados espectrômetros de massa MALDI-TOF/TOF Ultraflex II (Bruker Daltonics, Alemanha) equipado com laser SmartBeam<sup>TM</sup>, controlado pelo software FlexControl 2.4 e um eletrospray Q-TOF Ultima API (Micromass, Reino Unido). Para as análises de MALDI-TOF MS e MS/MS, as frações liofilizadas foram dissolvidas em água ultra pura, misturadas em uma solução

saturada de uma matriz constituída por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (1:3), depositadas em triplicata em uma placa do tipo Anchorchip 600  $\mu\text{m}$  (384 poços) e deixadas secar a temperatura ambiente. Os componentes moleculares presentes tiveram suas massas moleculares determinadas por MS com calibração externa com mistura de peptídeos (Peptide Calibration Standard I, Bruker Daltonics) sob modo de operação refletido e positivo. Para a identificação da estrutura primária dos componentes moleculares o mesmo instrumento foi operado no modo LIFT/CID (MS/MS) (Brand *et al.*, 2006).

Os espectros de massa foram adquiridos com 200 disparos de laser, a uma frequência de 100 Hz e detecção de massa nas faixas de 500-1800 Da. O modo MS/MS, visando à fragmentação dos íons precursores (TOF-TOF), foi realizado por meio de aceleração dos precursores em modo LIFT/CID. Os espectros foram processados utilizando o software FlexAnalysis 2.4.41.0.

Em alguns casos, a obtenção de espectros em modo MS/MS também foi realizada por fragmentação com o equipamento ESI Q-TOF operando em modo W. A amostra foi dissolvida em uma solução de água/metanol/ácido acético (50:50:0,1). O fluxo utilizado foi de 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  e a voltagem do capilar e do cone foram estabelecidas como 2.8 kV e 30 V, respectivamente.

Os espectros obtidos nas análises de MS/MS foram manualmente interpretados utilizando os softwares FlexAnalysis e PepSeq ( versão 3.3, MassLynx, Estados Unidos da América) e as seqüências obtidas avaliadas por softwares de busca, alinhamento e comparação (FASTA, <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>) específicos para a busca de similaridades e banco de dados do Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

#### **4.5 Síntese dos peptídeos**

Os peptídeos de interesse VPPGFTPFRVD denominado PSLEM 07/012 e VPPGFTPFRQS denominado PSLEM 07/013 foram sintetizados utilizando a estratégia Fmoc/t-butila (9-fluorenilmetoxicarbonila) de síntese manual em suporte sólido (CHAN, 2000). As resinas Fmoc-Asp(otBu) e Fmoc-Ser(otBu) NovaSyn TGA (novabiochem) foram utilizadas como suporte sólido para a

síntese. O primeiro passo foi a desproteção do grupo Fmoc que protege o sítio reativo da resina. Como o grupo Fmoc é base-lábil, a desproteção foi realizada com uma solução de piperidina a 20% em dimetilformamida (DMF). A resina foi lavada duas vezes por 15 minutos sob agitação com essa solução.

Posteriormente, foi realizado o acoplamento do primeiro resíduo de Fmoc aminoácido. Esta etapa foi realizada com a adição de 135  $\mu\text{L}$  de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), 144 mg de hexafluorofosfato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU), 1,2 mL de dimetilformamida (DMF), 55 mg de 1-*H*-hidroxibenzotriazol (HOBt) e o Fmoc aminoácido a ser adicionado de acordo com sua massa molecular (com um excesso molar de 4 vezes), incubando-os por 1 hora e 30 minutos sob agitação. Estas duas etapas (desproteção e acoplamento) foram, então, repetidas sucessivamente até a adição e posterior desproteção do último resíduo de aminoácido.

Após cada etapa, a resina era lavada com DMF e MeOH (metanol), repetindo-se este procedimento alternadamente por quatro vezes. Na última lavagem uma quantidade 500 $\mu\text{L}$  de diclorometano (DCM) foi utilizada para preservar a amostra.

O teste de Kaiser (ninidrina) foi utilizado para detectar a presença de aminas livres na cadeia peptídica. Caso o resultado fosse positivo (azul) após a etapa de desproteção, o grupo protetor Fmoc teria sido removido com sucesso; se o teste fornecesse uma coloração amarela (negativa) após a etapa de acoplamento, a ligação peptídica entre o resíduo adicionado e o *N*-terminal da cadeia em formação teria ocorrido. Porém, em caso do teste de Kaiser negativo na etapa de desproteção, e positivo na etapa de acoplamento, estas etapas deveriam ser repetidas.

Após a síntese, o peptídeo foi clivado da resina. A ligação do resíduo *C*-terminal do peptídeo com a resina é ácido lábil, por isso a desproteção final e a clivagem da resina foram conduzidas em uma solução de TFA:TIS:H<sub>2</sub>O (95:2,5:2,5; v:v:v).

Após o término da reação de clivagem entre o peptídeo e a resina, o TFA foi removido, borbulhando-se N<sub>2</sub> dentro do tubo de reação. Feito isso, o peptídeo foi lavado seis vezes com éter diisopropílico gelado, o que, além da precipitação do peptídeo, é responsável pela retirada de excesso de



grupamentos protetores e de seqüestradores de carbo-cátions. O peptídeo foi, então, extraído da resina por meio de lavagens com água e água/ACN (1:1), seguidas de filtração, em funil de placa porosa. Esse procedimento foi imediatamente seguido pelo congelamento com nitrogênio líquido e liofilização do material obtido.

O material bruto foi filtrado e purificado por fase reversa seguindo os procedimentos descritos no item 4.3.

A bradicinina clássica RPPGFSPFR, denominada PSLEM 08/019, também foi sintetizada utilizando o procedimento apresentado. A resina Fmoc utilizada foi Fmoc-Arg(Pmc)-O-TGT-R (novabiochem). Os reagentes para o acoplamento foram HBTU (58 mg), HOBt (22 mg), DIPEA (90 µL) e 1 mL DMF.

#### **4.6 Digestão enzimática da PSLEM 07/013**

Para a digestão enzimática do peptídeo escolhido, uma alíquota contendo 2,5 mg do peptídeo foi dissolvida em água e em seguida incubada com uma solução de tripsina (500 µL) imobilizada TPCK (Pierce) tamponada para uma concentração final de bicarbonato de amônio de 50 mM por 3 horas a 37°C sob agitação.

Ao final essa solução foi centrifugada e seu sobrenadante foi submetido a uma cromatografia utilizando as mesmas condições na qual o peptídeo inteiro foi purificado.

#### **4.7 Quantificação dos peptídeos**

Para a realização dos testes biológicos a quantificação dos peptídeos foi realizada pelo método de Murphy e Kies (1960). As absorbâncias de cada diluição foram medidas nos comprimentos de 205, 215 e 225 nm. A concentração final do peptídeo foi obtida pela fórmula

$$\begin{aligned}(A_{215} - A_{225}) \times 144 &= X \\ (A_{205}) \times 31 &= Y \\ (X + Y) / 2 \times \text{fator de diluição} &= [\text{mg/mL}]\end{aligned}$$

## **4.8 Ensaios biológicos**

Para os ensaios biológicos os peptídeos PSLEM07/012, PSLEM07/013 e PSLEM 08/019 receberam a seguinte denominação:

PSLEM 07/012: [Val]<sup>1</sup>, [Thr]<sup>6</sup>,-bradicinil-VD (BK1)

PSLEM 07/013: [Val]<sup>1</sup>, [Thr]<sup>6</sup>,-bradicinil-QS (BK2)

PSLEM 08/019: Bradicinina Clássica (BK)

### **4.8.1 Teste hemolítico**

Para verificar se os peptídeos sintetizados são nocivos para as células sangüíneas humanas foi realizado um teste hemolítico. Este teste utilizou sangue fresco humano com sorotipagem O<sup>+</sup>. Os eritrócitos foram centrifugados (1550 xg por 2 min) e lavados três vezes em tampão PBS 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. Após as lavagens as células foram diluídas 10 vezes no mesmo tampão e incubadas com uma série de concentrações de cada peptídeo (4 µg/mL a 256 µg/mL) por 1 hora a 37°C. As placas foram centrifugadas (1550 xg por 2 min) e o sobrenadante retirado. A leitura do mesmo foi feita em 414 e 567 nm. O controle positivo foi feito com Triton X-100 e o negativo foi obtido submetendo o sangue apenas ao mesmo tratamento em tampão fosfato-salina (PBS).

### **4.8.2 Análise da integridade da membrana celular e da fragmentação de DNA de macrófagos murinos**

#### **4.8.2.1 Preparo da amostra**

Para o teste tanto BK1 quanto BK2 foram ressuspensos em PBS nas concentrações 0,4; 0,8; 1,6; 6,5 e 26 µg/mL.

#### **4.8.2.2 Integridade da membrana**

A integridade da membrana e a fragmentação do DNA foram analisadas por citometria de fluxo. As células foram centrifugadas a 350xg por 15 minutos a 4°C e cada pelett obtido foi ressuspensão em 500 µL de PBS, contendo o peptídeo na concentração desejada. Após essa etapa, 50 µL de solução de propídio iodado (PI) (50 mg/mL de PBS) foi adicionado às células e analisado em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Juan, Califórnia, EUA). PI é um poderoso componente fluorescente solúvel em água que não consegue penetrar em membranas intactas e é geralmente excretado de células viáveis. Este se liga aos ácidos nucleicos pela intercalação entre as bases nitrogenadas. A fluorescência foi medida usando um canal FL2 (fluorescente Orange-red na absorvância de 585/42 nm). Dez mil células foram analisadas por amostra. Células com PI fluorescente foram avaliadas usando o Cell Quest software (Benton Dickinson) (Martins, 2006).

#### **4.8.2.3 Fragmentação do DNA nas células**

As células (macrófagos murinos) foram centrifugadas a 350xg por 15 minutos a 4°C e cada pelett foi obtido pela gentil ressuspensão em 300 µL de uma solução hipotônica contendo 50 µg por mL PI 0,1% de nitrato de sódio e 0,1% de Triton X-100. Os detergentes presentes na solução permeabilizaram as células que prontamente incorporaram PI nos ácidos nucleicos. As células foram incubadas por 24 horas a 4°C. A fragmentação do DNA foi analisada por citometria de fluxo após a coloração com PI. A fluorescência foi medida e analisada como no item 4.8.2.2.

#### **4.8.3 Produção de NO**

Nitrito é o produto da oxidação do óxido nítrico (NO). A quantidade de nitrito no sobrenadante da cultura é indicativa da quantidade de NO produzido pelas células em cultura. As células foram tratadas com LPS por 1h antes de

serem tratadas com os peptídeos. Nitrito foi medido usando a reação de Griess (1 mM sulfanilamida, 1 mM naphthylenediamina dihydrochlorida, 100 mM HCl) realizada em uma placa de ELISA de 96 poços (Immulon 2; Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA). O sobrenadante da cultura (100 µL de  $5 \times 10^5$  células microgliais humanas) foi misturado com 100 µL de reagente de Griess (0.5% sulfanilamida; Sigma Chemical Co., St Louis, MO) em ácido fosfórico (Mallinkrodt Chemicals, Inc., Paris, KY) e 0.05% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (Sigma). A mistura foi incubada a 21°C por 10 minutos. A absorbância do teste e do controle a 550 nm foi medida usando uma leitora automática de ELISA. As amostras foram diluídas em meio de cultura RPMI. As absorbâncias do controle, amostras e padrões foram convertidas em nanograma por mililitro de nitrito pela comparação com as absorbâncias de nitrito de sódio (Fisher Chemicals, Fair Lawn, NJ).

#### **4.8.4 Análise da permeabilidade vascular e formação de edema**

O teste de permeabilidade vascular foi realizado segundo protocolo Yamakawa e colaboradores (1976) modificado por Matsumoto e colaboradores (2007). Foram utilizados 21 camundongos Swiss albinos, machos, pesando entre 20-25 g, doados pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico com maravalha de pinho autoclavada e receberam ração e água *ad libitum*.

A manipulação dos animais antes, durante e após os experimentos obedeceu às normas de manipulação de animais de laboratório, preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os camundongos foram separados em três grupos e previamente tratados com Captopril (5 mg/Kg) via subcutânea, uma hora antes do teste, para evitar a eventual degradação da bradicinina (amostras) pelo plasma sanguíneo (Arya, 2005). O grupo I foi tratado com a bradicinina clássica (BK), o grupo II com a BK1 (PSLEM 07/012) e o grupo III com a BK2 (PSLEM 07/013), Cinco minutos antes da administração dos peptídeos (BK, BK1 ou BK2), cada animal recebeu 0,05 mL de azul de Evans (60 mg/Kg) em solução salina (NaCl 0,9%), através do plexo venoso oftálmico. Cinquenta microlitros de solução

salina foram injetadas na região sub-plantar na pata direita (controle) e 50 µL de amostra de bradicininas (3 nmol) na pata esquerda. Após 30 minutos, os animais foram sacrificados, tendo suas patas mensuradas com um paquímetro (Mitutoyo Ser n° BG092112). Em seguida foram cortadas na região patelar, pesadas em balança analítica digital Shimadzu, AX200, colocadas em um tubo de ensaio com 3 mL de formamida (HCONH<sub>2</sub>, Vetec) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período as soluções foram mensuradas em valores de absorbância em espectrofotômetro a 620 nm.

#### **4.8.5 Cultura de células**

##### **4.8.5.1 Linhagem Celular**

A linhagem celular utilizada no estudo, OSCC-3, é derivada de carcinoma epidermóide bucal, tipo mais freqüente de câncer de boca, abrangendo cerca de 90% dos casos (Lee *et al*, 2002). É uma linhagem imortalizada que cresce de forma aderente ao substrato e apresenta morfologia fusiforme.

##### **4.8.5.2 Manutenção da cultura de células**

Todos os procedimentos foram realizados com materiais rigorosamente esterilizados e em câmara de fluxo laminar, cuja luz ultravioleta permaneceu ligada por 30 a 40 min antes do uso.

Alíquotas de células de câncer de boca foram removidas de um estoque em nitrogênio líquido e descongeladas rapidamente a 37°C. Quinhentos µL das alíquotas foram lentamente adicionados 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 750xg por 5 min, 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 para utilização nos experimentos, a cada 48 horas o meio de cultura era substituído por um meio de cultura novo. A cultura de células era 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 recultivadas 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 750xg por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em meio de cultura. Aproximadamente, 10% das células foram recultivadas em frascos de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O restante foi utilizado em 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 de boca 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°C por 24 horas. Em seguida, os criotubos foram estocados imersos em nitrogênio líquido.

#### **4.8.5.3 Preparação das amostras de BK, BK1 e BK2 para o tratamento das células.**

Os peptídeos (BK, BK1 e BK2) purificados e quantificados foram diluídos em água nanopura (Milli-Q) e esterilizados por filtração em membrana 0,22 µm.

Após a determinação da concentração, as suspensões de peptídeos foram imediatamente testadas na cultura de células ou estocadas a -30°C até o momento do uso.

#### 4.8.5.4 Tratamento das células com peptídeos

Ao atingir o estágio de confluência, as células de câncer de boca foram removidas do frasco de cultura e centrifugadas como descrito no item 4.8.5.2. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. Para a determinação do número de células, 10 µL da suspensão de células foi adicionado a 40 µL de solução de azul tripan (0,4% diluídos em PBS, p/v). Oito µL dessa mistura foram depositados gentilmente em uma câmara de Neubauer, onde células presentes nos quatro quadrantes maiores laterais foram contados em microscópio de luz. O número de células foi determinado pela seguinte fórmula:

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

As células contadas foram transferidas para placas de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 12 a 16 horas para a completa adesão das células ao 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 com concentração inicial de 9 x 10<sup>3</sup> células/poço. Placas de 12 poços foram utilizadas no restante dos experimentos com concentração inicial de 5 x 10<sup>4</sup> 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 a BK e análogos BK1 e BK2.

O meio de cultura contendo BK, BK1 ou BK2 foi preparado a partir da diluição de soluções estoque dessas moléculas em meio de cultura. As doses utilizadas nos experimentos variaram de 0,5 a 64 µg/mL. O meio de cultura do grupo controle (ausência de peptídeos) continha apenas água nanopura na mesma proporção que foi adicionada aos outros grupos experimentais.

O meio de cultura das placas foi substituído pelo que continha os peptídeos sob teste. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas. Após o período de incubação, as células foram preparadas de maneira adequada para a realização dos testes.

As células tratadas em placas de 96 poços foram processadas como descrito no item 4.8.5.5.

#### **4.8.5.5 Viabilidade Celular**

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT estabelecido por MOSMANN (1983). Esse é um dos métodos colorimétricos mais utilizados em *screenings* para identificar e determinar as concentrações ativas de novas moléculas anticarcinogênicas. Em células viáveis, enzimas mitocondriais, como a succinil-desidrogenase, reduzem o substrato MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) formando 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 foram cultivadas e tratadas com os peptídeos em placas de 96 poços como descrito no item 4.8. Após o período de incubação, 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 a 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 foi adicionado em cada poço para dissolver o formazan formado. A quantificação do formazan foi feita pela medida da absorbância dos poços no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro conjugado a uma leitora de microplacas.



#### **4.8.5.6 Microscopia de contraste de fase**

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 (ver item 4.8), as placas de cultura foram observadas em microscópio de contraste de fase invertido. 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).

#### **4.9 Análises dos dados obtidos por espectrometria de massa**

Os dados obtidos após a análise por espectrometria de massa MALDI-TOF foram avaliados estatisticamente. A relação massa/carga e o tempo de retenção foram analisados em todas as espécies e mediante a comparação entre elas. Para a apresentação dos dados, tanto um gráfico de dispersão quanto um gráfico de caixa foram gerados utilizando o software Origin 8.0.

Para o gráfico de dispersão cada íon detectado teve seu tempo de retenção registrado de acordo com a fração na qual se encontrava e correlacionado com as relações massa/carga detectadas. Após essa etapa, cada espécie tem um gráfico, assim como um comparativo entre as três espécies.

Todos os demais dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média ou média  $\pm$  erro padrão da média, conforme o caso.

#### **4.10 Análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos dos ensaios biológicos**

Os resultados envolvendo mais do que dois grupos foram analisados por análise de variância com o teste estatístico PLSD de Fischer (para espaço amostral regular em todos os grupos) com um nível de significância fixado em  $P < 0,05$  (5%) utilizando o software StatView versão 5.0.

## **5. RESULTADOS**

## 5.1 Cromatografia

As secreções cutâneas das espécies estudadas foram fracionadas utilizando sistema de RP-HPLC (Figura 5) sob as condições já descritas previamente (vide materiais e métodos). As frações coletadas tiveram seu tempo de retenção/concentração de acetonitrila em que eluíram registrados e foram identificadas e liofilizadas.

A partir das cromatografias dos extratos totais das espécies foi coletado um total de 42 frações para *P. rohdei* (Figura 5A), 53 frações para *P. tomopterna* (Figura 5B) e 30 frações para *P. burmeisteri* (Figura 5C). Todas as frações foram submetidas à análise utilizando MALDI-TOF MS. Após a análise, as frações que apresentavam íons na faixa de massas moleculares de interesse (500-1800 Da) e apresentando os mesmos componentes foram reunidas a partir de cromatografias de várias alíquotas do extrato total e recromatografadas utilizando-se uma coluna analítica C<sub>18</sub> (Dionex Vydac) em gradientes otimizados para cada fração.

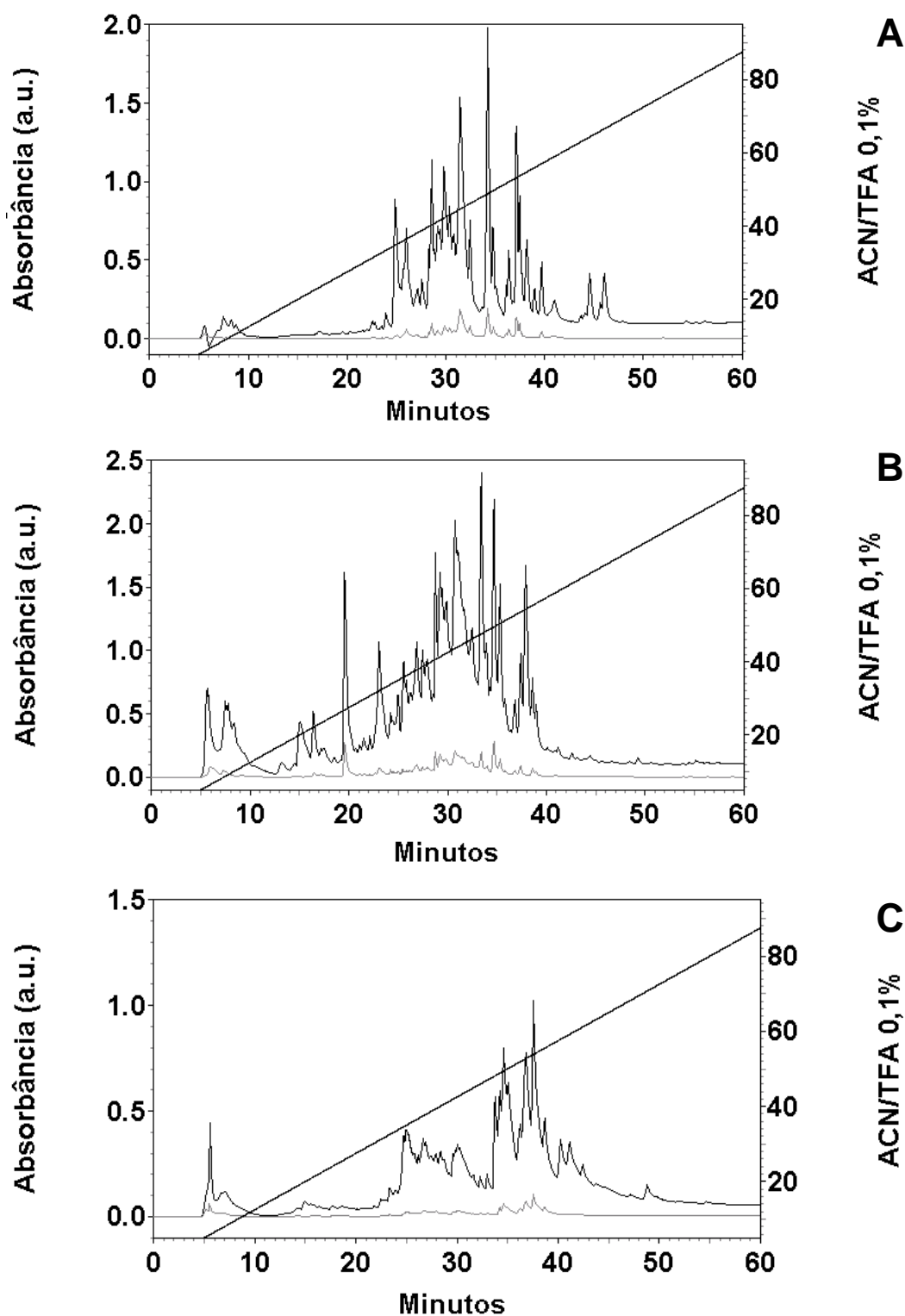


Figura 5. Cromatogramas dos extratos totais das secreções cutâneas de *P. rohdei* (A), *P. tomopterna* (B) e *P. burmeisteri* (C). As amostras foram fracionadas em uma coluna  $C_{18}$  Vydac 218TP510 e equilibradas com água 0,1% TFA. A eluição ocorreu utilizando-se um gradiente linear de ACN (5-95%) com um fluxo de 2,5 mL/min. A cromatografia foi monitorada nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (cinza).

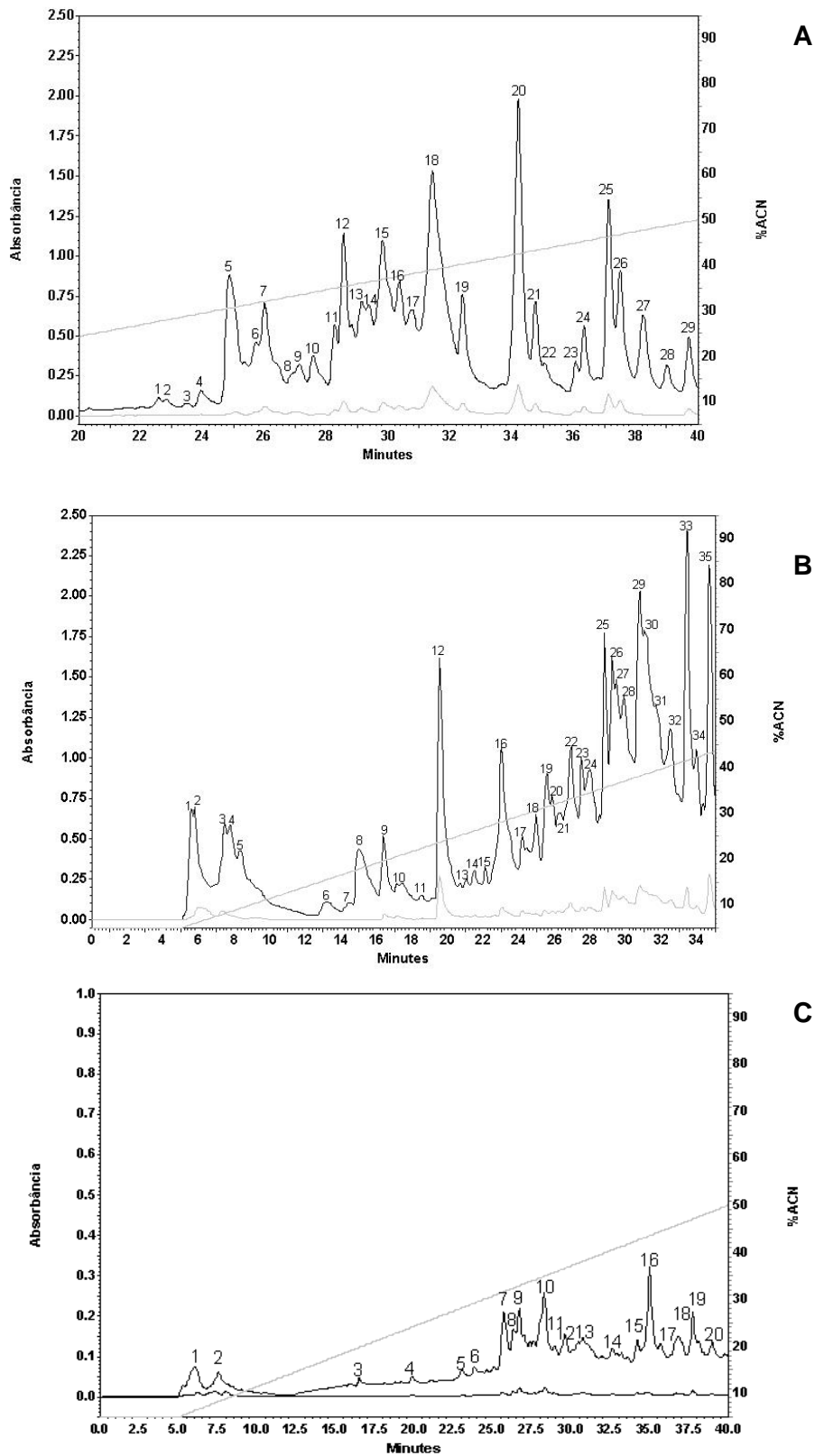


Figura 6. Região cromatográfica contendo a identificação das frações analisadas. (A) *P. rohdei*, (B) *P. tomopterna* e (C) *P. burmeisteri*.

## 5.2 Análise dos componentes detectados

Para a análise dos componentes detectados, todos os espectros obtidos por MALDI-TOF MS das frações foram processados (correção de linha de base) e tiveram suas massas moleculares registradas e conferidas manualmente sendo associadas aos respectivos tempos de retenção em RP-HPLC. Para a comparação, a faixa de massa entre 500-1800 m/z foi selecionada, pois análogos de BKs presentes em venenos consistem de uma grande variedade de peptídeos de baixa massa molecular (Kwok *et al*, 2008). Após o registro de cada componente, os mesmos que se encontravam também em frações posteriores foram desconsiderados para a análise por meio de visualização gráfica, pois foi considerado o mesmo componente. Este procedimento foi realizado para cada espécie, onde o número total de íons detectados para *P. burmeisteri*, *P. tomopterna* e *P. rohdei* foram 108, 128 e 166 íons, respectivamente. Os dados obtidos foram visualizados em um gráfico de dispersão para que a relação existente entre massa molecular e percentual de acetonitrila em que eluíram (relacionado linearmente com o tempo de retenção) fosse estabelecida (Figuras 7 e 8).

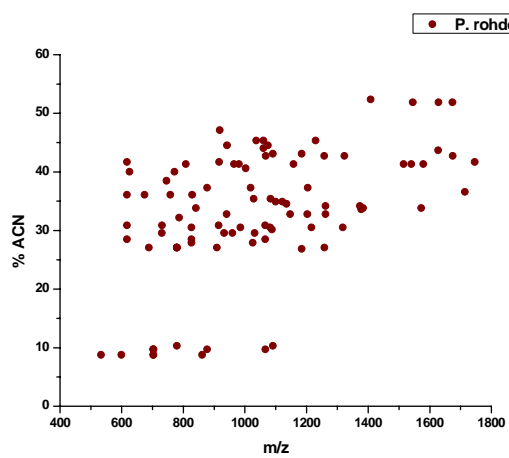
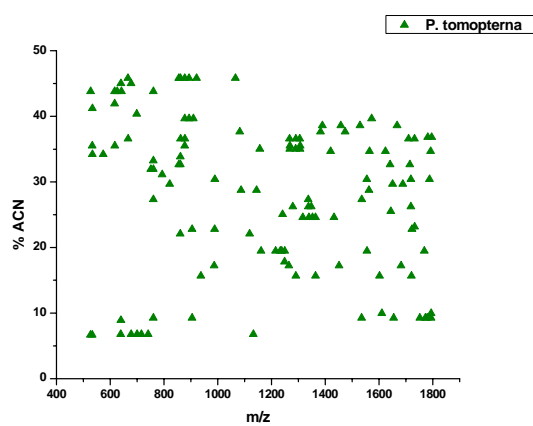
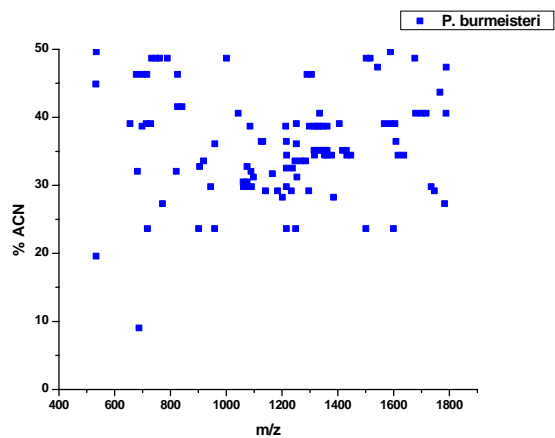


Figura 7. Análise individual da relação massa-carga ( $m/z$  500-1800) e o percentual de acetonitrila (ACN) em que eluíram os componentes moleculares de *P. burmeisteri* (108 íons detectados), *P. tomopterna* (128 íons detectados) e *P. rohdei* (166 íons detectados).



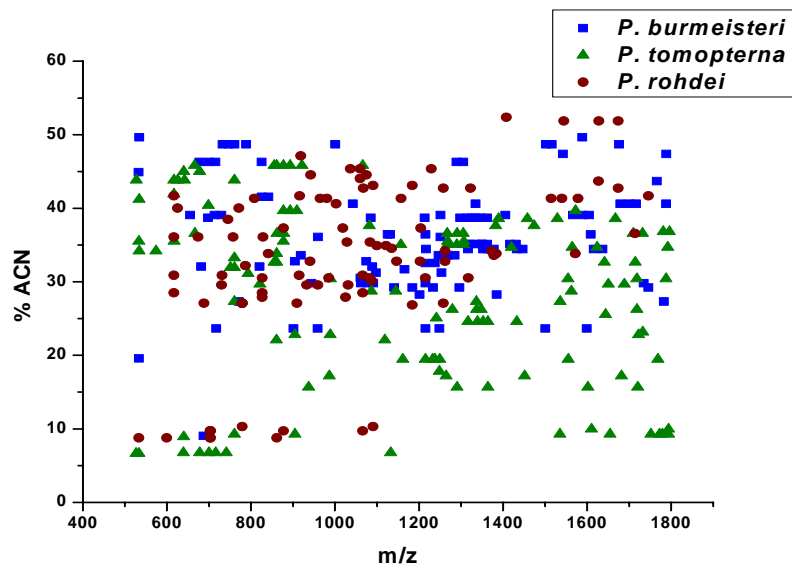


Figura 8. Análise comparativa entre a relação massa-carga ( $m/z$  500-1800) e o percentual de acetonitrila (ACN) em que eluíram os componentes moleculares das três espécies do gênero Phyllomedusa.

Os dados adquiridos também foram submetidos ao software Origin Pro 8 para que um histograma de distribuição de classes fosse obtido para a comparação da distribuição dos dados (Figura 9).

A análise dos dados por histograma de distribuição de classes (Figura 9) mostrou que a *P. tomopterna* (espécie amazônica) possui uma maior amplitude na distribuição dos íons detectados com a relação massa/carga no intervalo em estudo. Houve uma pequena diferença na distribuição das massas moleculares da *P. burmeisteri* e *P. rohdei* (espécies de Mata Atlântica), sendo que a primeira apresentou um maior número de íons presentes entre 1000-1300  $m/z$ , enquanto que os componentes moleculares da *P. rohdei* se concentraram principalmente entre 1100-1400  $m/z$ .

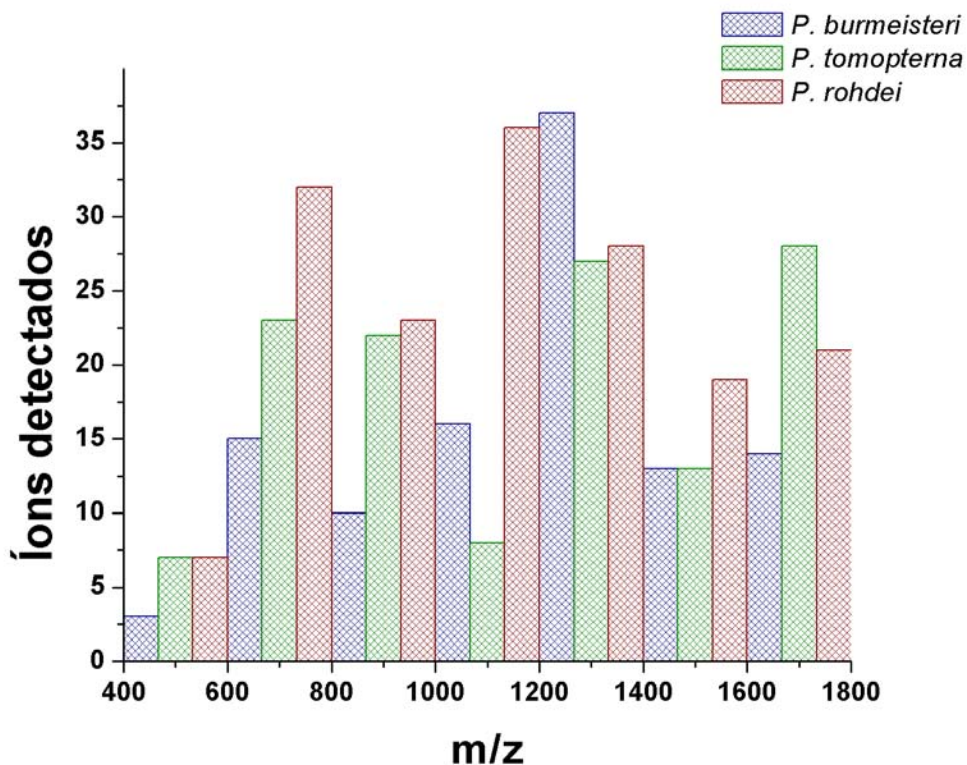


Figura 9. Histograma da análise comparativa entre as três espécies de *Phyllomedusa* quanto ao número de componentes detectados e a relação massa-carga (m/z).

Quando comparado o percentual de ACN (relacionado ao tempo de retenção) em relação aos componentes detectados, a *P. tomopterna* também apresentou um comportamento distinto das outras espécies (Figura 10). Cerca de 50% dos íons detectados em *P. tomopterna* se concentraram entre 20-40 %ACN, sugerindo um maior número de moléculas com perfil hidrofílico. As espécies *P. burmeisteri* e *P. rohdei* apresentaram um perfil mais hidrofóbico na faixa de massas moleculares investigada.

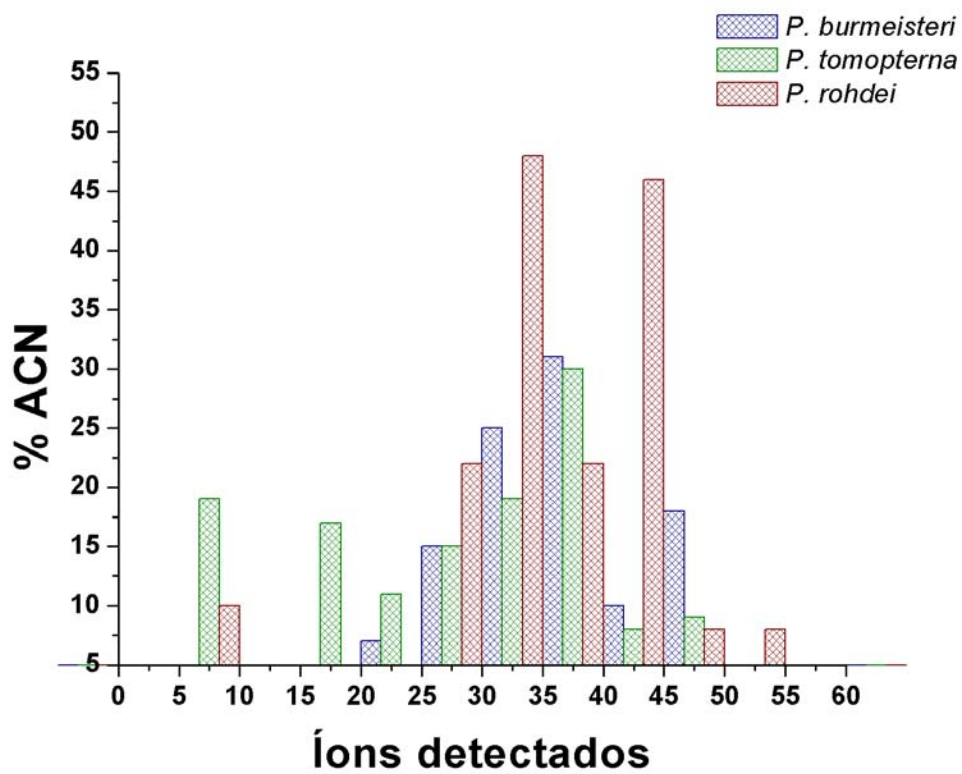


Figura 10 . Histograma da análise comparativa entre as três espécies de *Phyllomedusa* quanto ao número de componentes detectados e o tempo de retenção em coluna semi-preparativas de RP-HPLC.

### 5.3 Identificação molecular (estrutura primária)

Para cada fração cromatográfica das secreções em estudo, espectros (MS/MS) foram obtidos para seqüenciamento *De Novo* manual no intuito de identificar a estrutura primária dos componentes moleculares presentes. Nas Figuras 11 e 12 podem-se observar exemplos desses seqüenciamentos ilustrando as duas principais séries de íons assinalados (séries *y* e *b*). O perfil de fragmentação típico de BKs gera séries adicionais de íons os quais não pertencem às séries comumente observadas nesse tipo de aquisição e que por esse motivo permaneceram não assinalados, conforme pode ser observado nas Figuras 11 e 12, assim como observados pelos autores Chen e Shaw, 2003..

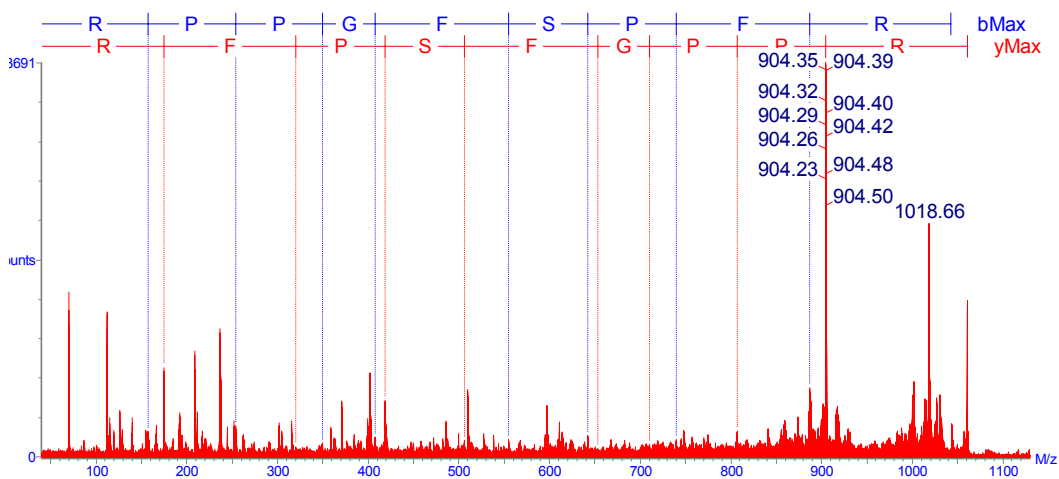


Figura 11. Seqüenciamento *De Novo* de BK clássica  $[M + H] = 1060.5$  Da. Os fragmentos apresentados permitiram a identificação completa das séries *y* e *b*. As seqüências peptídicas usando código de uma letra estão indicadas na parte superior do espectro. Os íons não selecionados representam íons das séries complementares ou da fragmentação interna.

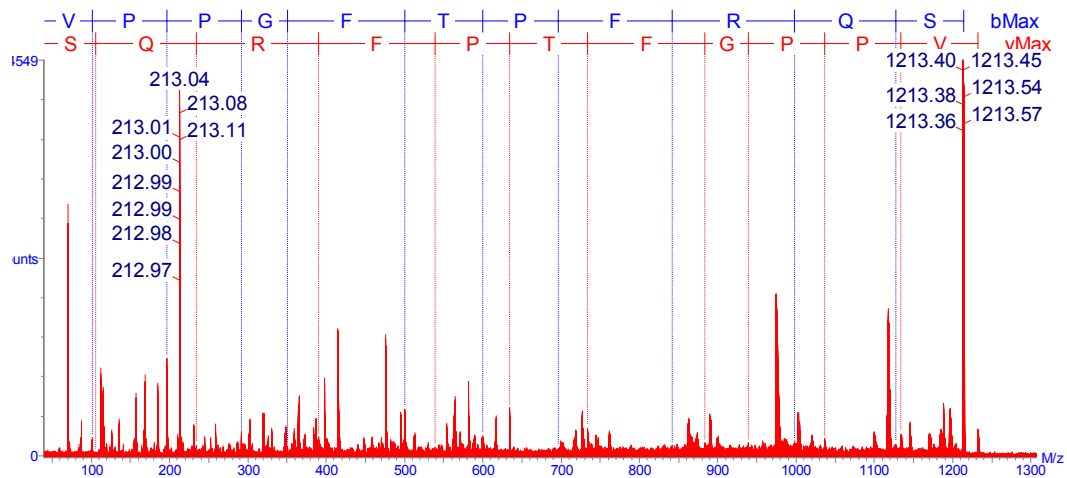


Figura 12. Seqüenciamento *De Novo* de BK2  $[M + H] = 1233.5$  Da. Os fragmentos apresentados permitiram a identificação completa das séries y e b. As seqüências peptídicas usando código de uma letra estão indicadas na parte superior do espectro. Os íons não selecionados representam íons das séries complementares ou de fragmentação interna.

Após o seqüenciamento *De Novo*, as estruturas primárias obtidas foram comparadas com seqüências depositadas e disponíveis em bancos de dados (Uniprot), utilizando-se o software FASTA e os dados são apresentados na Tabela 2. Seqüências idênticas e similares a moléculas previamente descritas foram observadas, assim como novas seqüências.

É importante ressaltar que várias outras moléculas com identidade com dermorfinas, hiposinas, triptofilinas entre outras também foram identificadas, contudo, somente aquelas com homologia a BKs e PKs foram apresentadas nesse estudo.

Tabela 2. Bradicininas e análogos já descritos e encontrados na pele de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*. Em negrito os peptídeos selecionados para síntese química.

[M+H] <sup>+</sup>		<i>P. burmeisteri</i>	<i>P. rohdei</i>	<i>P. tomopterna</i>	<i>P. hypochondrialis</i> (Brand et al, 2006)	<i>P. sauvagei</i> (Chen et al, 2005)
757.4	RPPGFSP		X			
861.4	VPPGFTPF		X		X	
904.4	RPPGFSPF	X	X	X		
918.4	RPPGFTPF				X	
1017.5	VPPGFTPFR		X		X	X
1033.5	VHypPGFTPPFR				X	
<b>1060.5</b>	<b>RPPGFSPFR</b>	<b>X</b>			<b>X</b>	<b>X</b>
1074.5	RPPGFTPFR	X		X	X	X
1076.6	RPHypGFSPFR	X			X	
1090.6	RPHypGFTPPFR	X			X	X
1161.6	VHypPGFTPPFRQ		X		X	
<b>1231.6</b>	<b>VPPGFTPFRVD</b>			<b>X</b>	<b>X</b>	
<b>1232.6</b>	<b>VPPGFTPFRQS</b>	<b>X</b>	<b>X</b>		<b>X</b>	
1247.7	VHypPGFTPPFRVD			X	X	
1248.6	VHypPGFTPPFRQS	X	X		X	
1336.7	RPPGFSPFRYI		X		X	X
1350.7	RPPGFTPFRYI		X	X	X	X
1352.7	RPHypGFSPFRYI	X	X		X	
1366.7	RPHypGFTPPFRYI	X		X		X
1416.7	RPPGFSPFRYI(HSO) <sub>3</sub>		X		X	X
1430.6	RPPGFTPFRYI(HSO) <sub>3</sub>			X	X	X
1432.7	RPHypGFSPFRYI(HSO) <sub>3</sub>	X			X	X
1446.7	RPHypGFTPPFRYI(HSO) <sub>3</sub>					X

Hyp = Hidroxiprolina; HSO<sub>3</sub> = Sulfatação

#### 5.4 Cromatografia dos peptídeos sintéticos

Um peptídeo encontrado nas espécies de Mata Atlântica (BK2) e outro encontrado na espécie amazônica (BK1), além da bradiginina clássica (BK, de mamíferos) foram selecionados para síntese química. Os peptídeos sintéticos foram cromatografados por RP-HPLC (Figura 13) sob as condições já descritas previamente (vide materiais e métodos). As frações coletadas tiveram seu tempo de retenção e concentração de ACN registrados e foram identificadas e liofilizadas. Na cromatografia da PSLEM07/012 foram coletadas 3 frações, sendo que a fração 3 corresponde ao peptídeo de interesse, enquanto na cromatografia PSLEM07/013 foram coletadas 6 frações, onde a fração 4 corresponde ao peptídeo.

Após a cromatografia os peptídeos foram analisados por MALDI-TOF sob condições já descritas previamente (vide materiais e métodos) e

apresentaram grau satisfatório de pureza, descartando a necessidade de passos de purificação analítica.

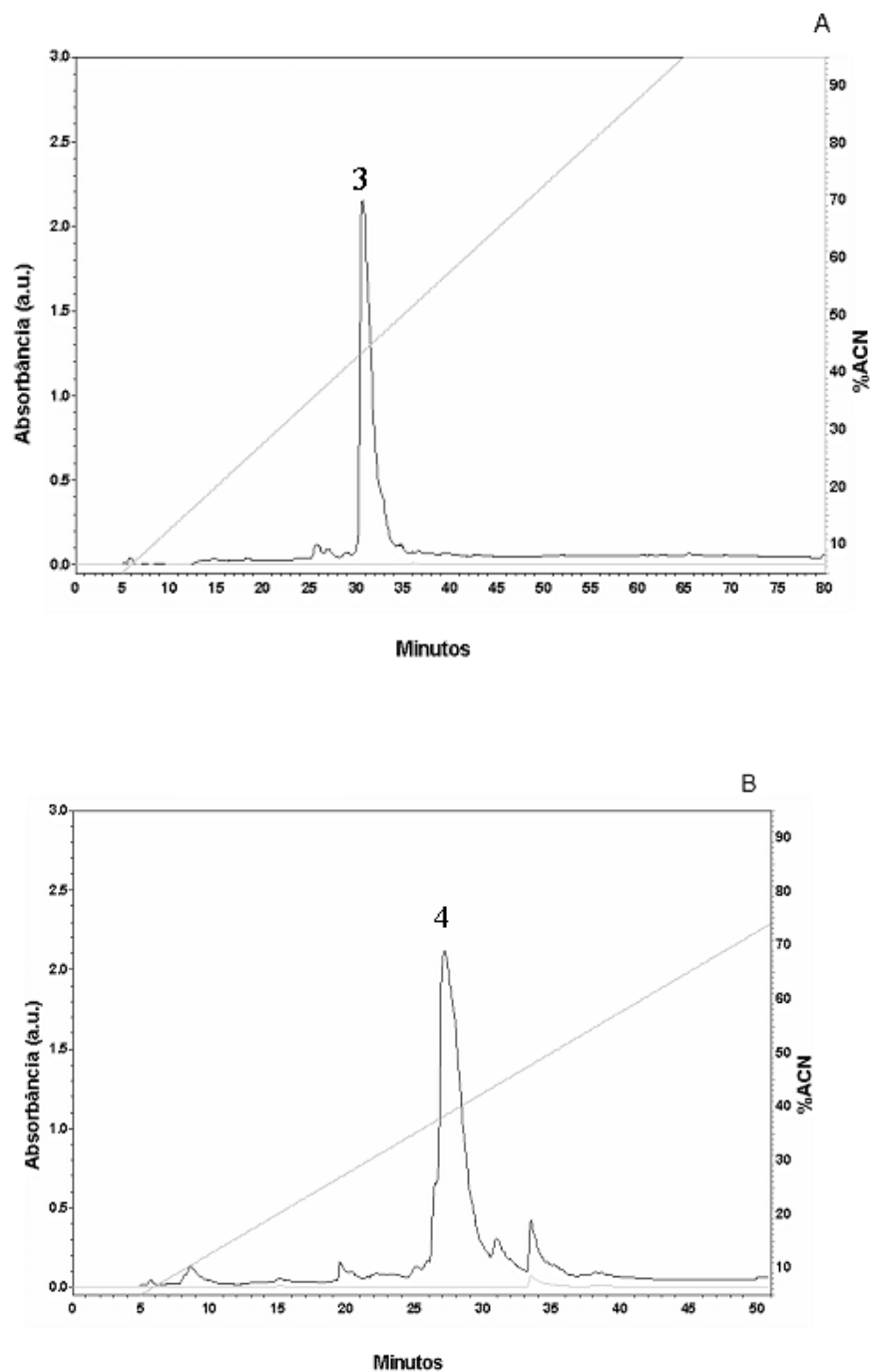


Figura 13. Cromatogramas dos peptídeos PSLEM 07/012 (A) e PSLEM 07/013 (B). As amostras foram fracionadas em uma coluna  $C_{18}$  Vydac 218TP510 e equilibradas com água 0,1% TFA. A eluição ocorreu utilizando-se um gradiente linear de ACN (5-95%) com um fluxo de 2,5 mL/min. A cromatografia foi monitorada nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (cinza).

## 5.5 Cromatografia da digestão da BK2

O peptídeo sintético BK2 foi recromatografado RP-HPLC (Figura 14) após as 3 horas de incubação com tripsina sob as condições já descritas previamente (vide materiais e métodos). As frações coletadas tiveram seu tempo de retenção e concentração de ACN registrados e foram identificadas e liofilizadas. Ao todo 5 frações foram coletadas sendo que uma delas (4) corresponde ao peptídeo VPPGFTPFR (bradicinina tipicamente encontrada no sangue de serpentes).

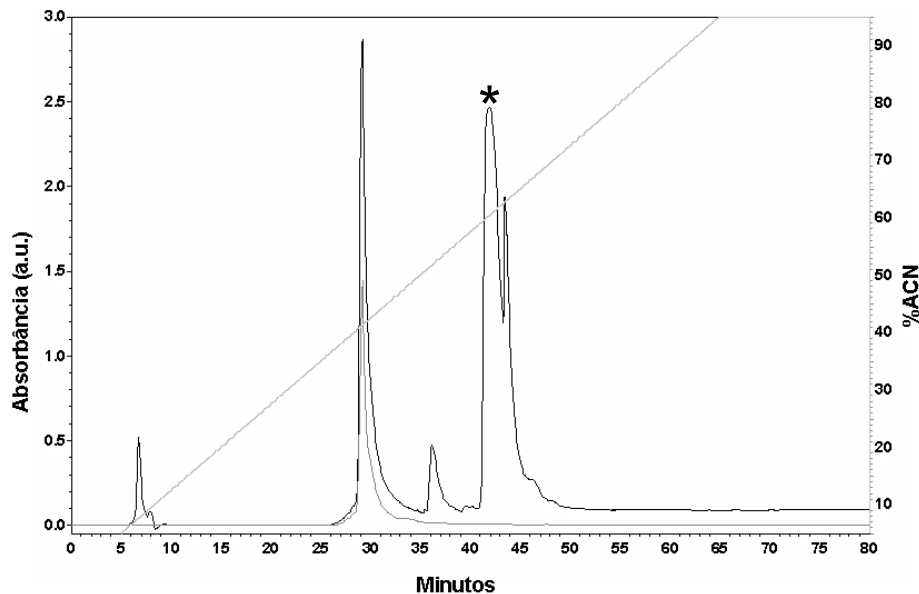


Figura 14. Cromatograma do peptídeo PSLEM 07/013 digerido com tripsina. A amostra foi fracionada em uma coluna  $C_{18}$  Vydac 218TP510 e equilibrada com água 0,1% TFA. A eluição ocorreu utilizando-se um gradiente linear de ACN (5-95%) com um fluxo de 2,5 mL/min. A cromatografia foi monitorada nos comprimentos de onda de 216nm (preto) e 280nm (cinza). A fração contendo o peptídeo digerido VPPGFTPFR (BK de répteis) está assinalada com um (\*).



## 5.6 Ensaios biológicos

### 5.6.1 Análise da viabilidade e fragmentação do DNA de macrófagos murinos

Na análise da viabilidade dos macrófagos murino incubados com as BKs, não foram observadas alterações na morfologia nem perda da integridade de membrana destes nos tempos analisados (12 horas) em nenhuma das concentrações (0,4; 0,8; 1,6; 6,5 e 26  $\mu\text{M}$ ) bem como não houve aumento da fragmentação do DNA (Figura 15 e 16). Nesse experimento a BK clássica não foi testada.

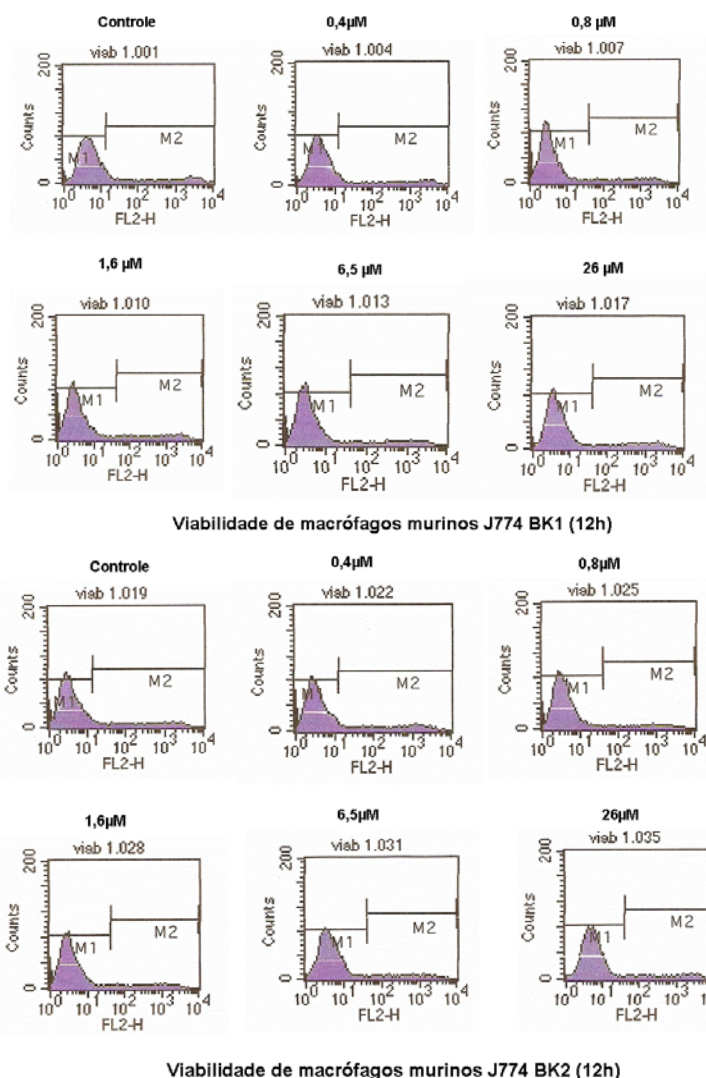
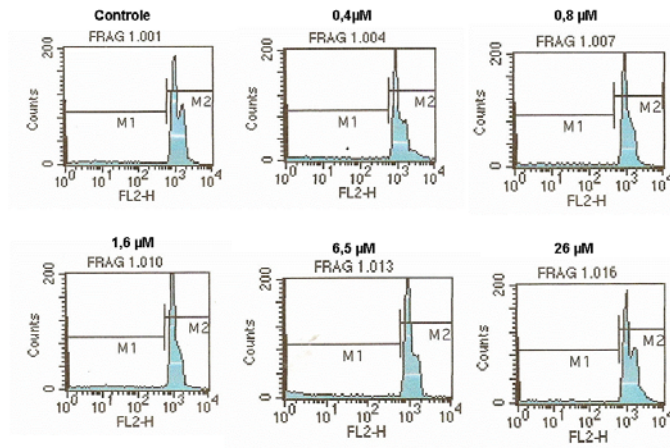
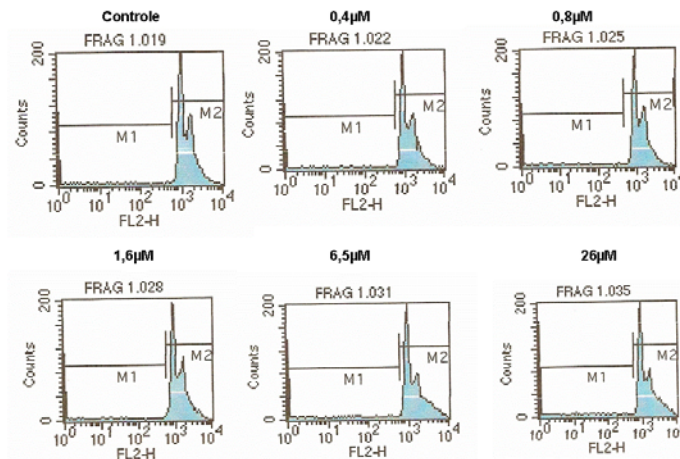


Figura 15. Análise gráfica da viabilidade em macrófagos murinos J774 sob diferentes concentrações de BK1 e BK2. M1 representa as células viáveis observadas e M2 as células com alterações significativas.



Fragmentação de macrófago murino J774 BK1 (12h)



Fragmentação de macrófagos murinos J774 BK2 (12h)

Figura 16. Análise da fragmentação do DNA de macrófagos tratados com BK1 e BK2 em diferentes concentrações. M1 representa as células com DNA fragmentado observadas e M2 as células com DNA intacto.

### 5.6.2 Teste hemolítico

Os ensaios de hemólise têm sido utilizados com frequência para a avaliação preliminar da toxicidade em células de vertebrados de peptídeos com aplicações farmacológicas potenciais. Os peptídeos BKs (BK, BK1 e BK2) foram submetidos a esse teste e mostraram ser atóxicos aos eritrócitos humanos. Foi possível a detecção apenas de lise celular mínima de eritrócitos mesmo em concentração de 64  $\mu\text{g/mL}$  ( $\sim 48 \mu\text{M}$ ). (Figura 17).

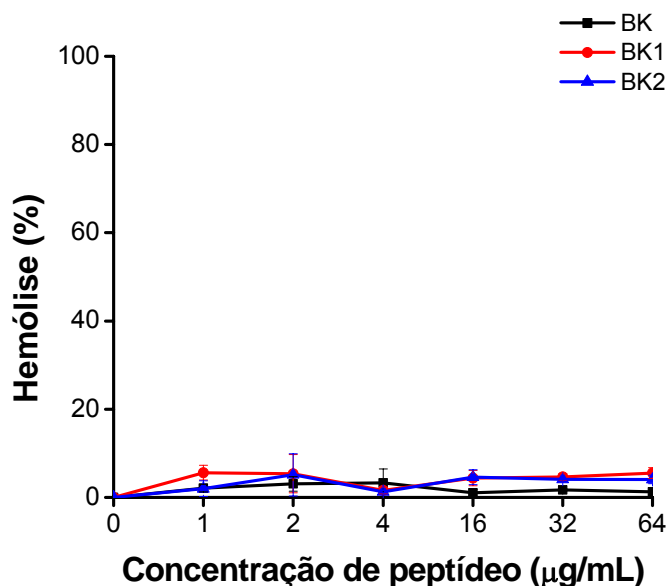


Figura 17. Atividade hemolítica das BKs (BK, BK1 e BK2). O experimento controle para a obtenção da hemólise total foi realizado com a adição Triton X-100 0,1% a 150  $\mu\text{L}$  de suspensão de eritrócitos. A concentração máxima (64  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentou  $< 5\%$  de hemólise.

### 5.6.3 Produção de NO

Não houve alteração na produção de NO nas células tratadas com as bradicininas BK, BK1 e BK2 quando comparadas com as células tratadas com LPS ( $P < 0,05$ ) tanto em 24 quanto 48 horas. Quando comparados ao controle que não recebeu LPS (negativo), tanto os grupos que receberam somente LPS (positivo) quanto os grupos que receberam LPS e as bradicininas exibiram diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ). A comparação dos resultados pode ser observada nas Figuras 18 e 19.

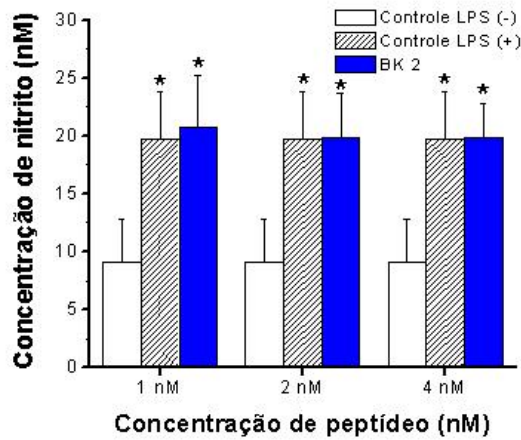
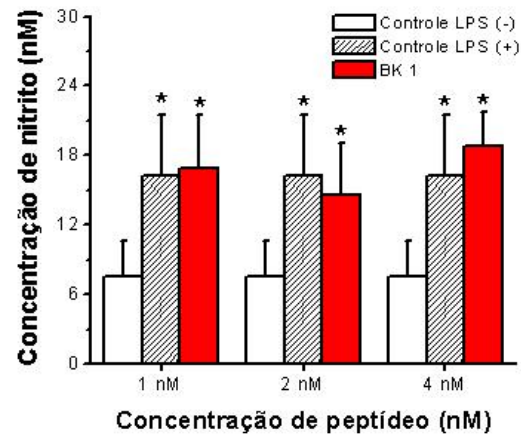
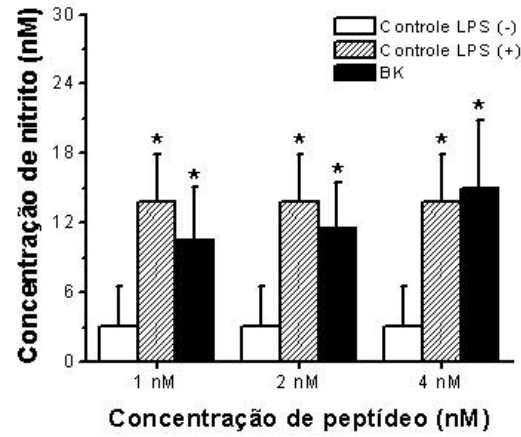


Figura 18. Representação gráfica da relação da concentração do peptídeo e a concentração de nitrito liberado pelas células. (A) BK, (B) BK1 e (C) BK2 após 24 horas de incubação. \* Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0.05$ ) em relação ao controle sem LPS.

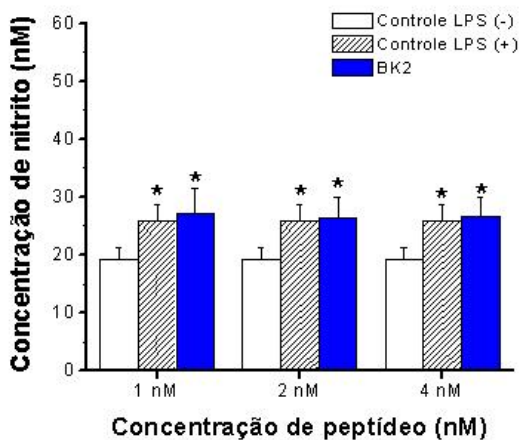
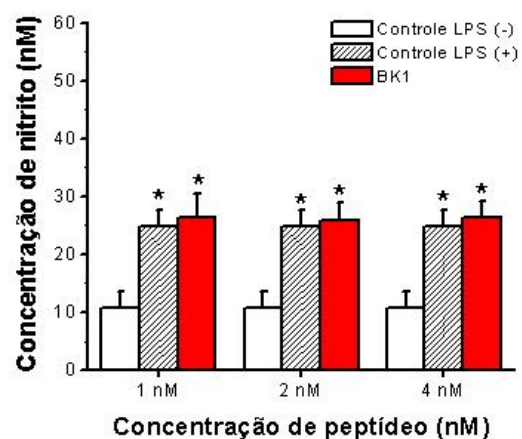
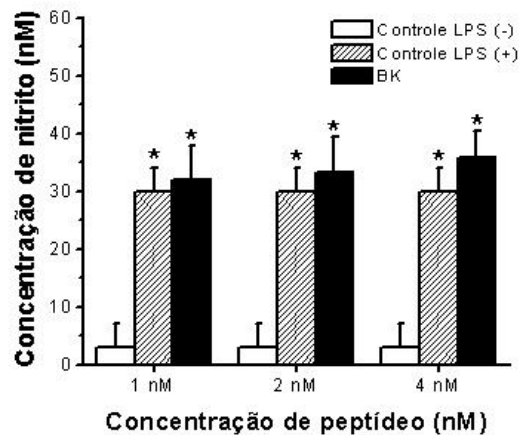


Figura 19. Representação gráfica da relação da concentração do peptídeo e a concentração de nitrito liberado pelas células. (A) BK, (B) BK1 e (C) BK2 após 48 horas de incubação. \* Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0.05$ ) em relação ao controle sem LPS.

#### 5.6.4 Extravasamento vascular e formação de edema

Os animais foram mortos 30 minutos depois da injeção das doses de bradicinina e em seguida suas patas foram seccionadas e mensuradas com paquímetro e pesadas. Segundo as medições realizadas com o paquímetro e a pesagem das patas não foi observada a formação de edema significativo nas patas dos camundongos tratados com BKs ( $P < 0,05$ ) em relação às patas dos camundongos controle (Figura 20).

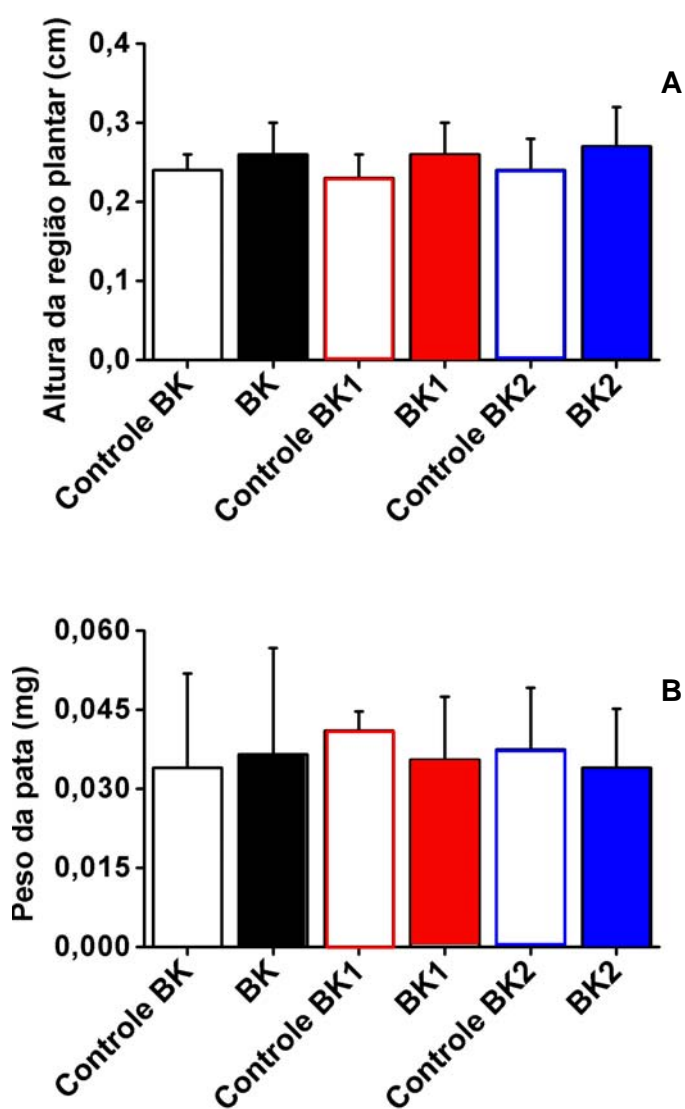


Figura 20. (A) Relação entre o controle e os tratamentos com BKs para a altura da região sub-plantar dos camundongos. (B) Relação entre o peso da pata controle e a com a administração das BKs

Após a incubação das patas em formamida por 18 e 24 horas, a análise espectrofotométrica da quantidade de Azul de Evans em solução não detectou alterações significativas ( $P < 0,05$ ) na absorbância das soluções nas quais foram incubadas as patas dos animais tratados com BKs quando comparadas com as patas controle como demonstrado na Figura 21. Pela comparação com os controles pode-se inferir que não houve extravasamento vascular significativo ( $P < 0,05$ ).

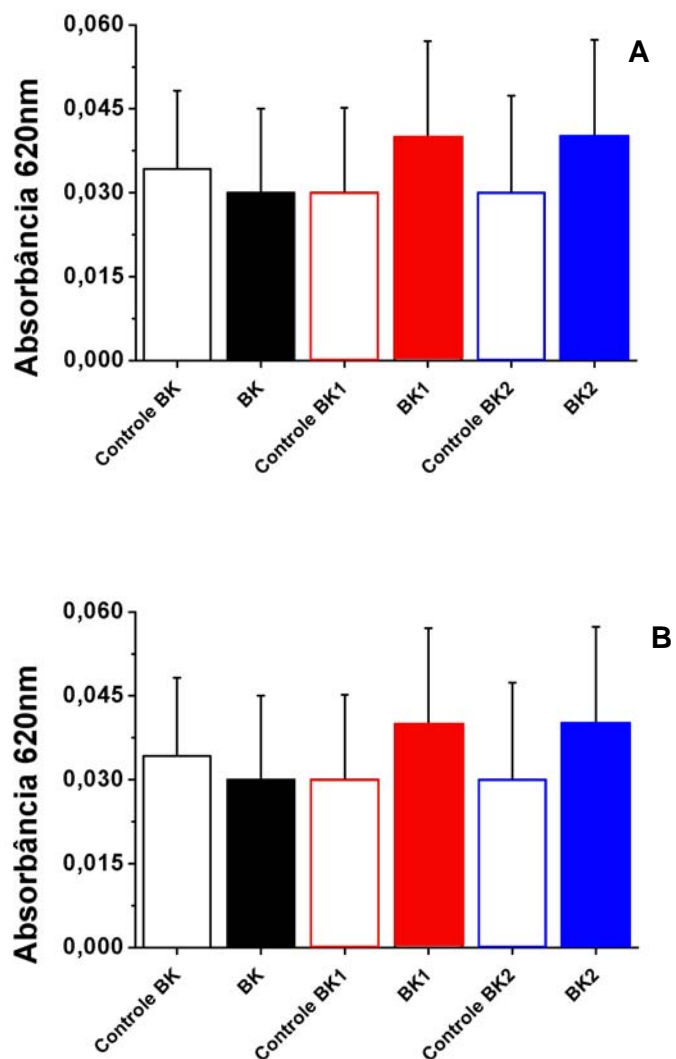


Figura 21. Análise da absorção do azul de Evans em 620nm das patas controle e tratadas com as BKs (BK, BK1 e BK2). (A) Leitura após 18 horas de incubação a 37°C. (B) Leitura após 24 horas de incubação a 37°C.



### 5.6.5 Teste anti-câncer oral humano

Nos testes com células de câncer de boca (linhagem OSCC-3) não houve alteração da morfologia geral conforme avaliado por meio de microscopia de luz (Figuras 22, 23 e 24), assim como não houve uma inibição ou estímulo significativo do crescimento de células nas concentrações testadas dos peptídeos (BKs) acima de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 25). Entretanto, em concentrações abaixo de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (0,5 e 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) houve diminuição (~20%) significativa ( $P < 0,05$ ) no número de células no grupo tratado com BK2 quando comparado ao controle negativo (100% de células viáveis), BK e BK1.

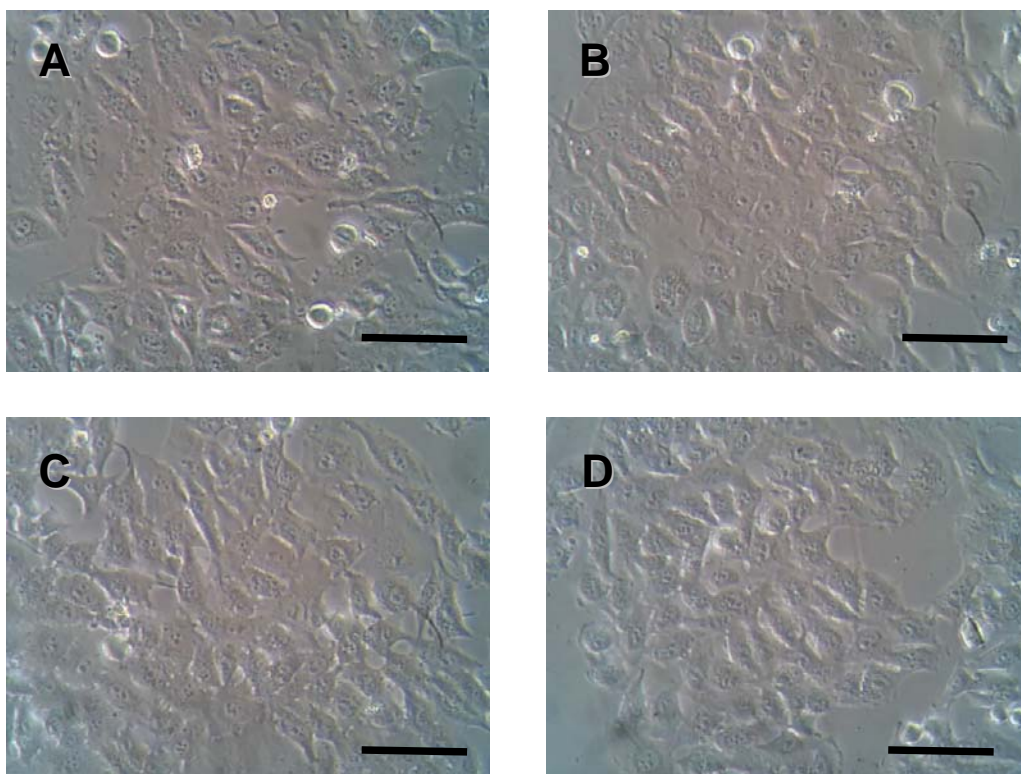


Figura 22. Análise em microscópio de contraste de fase das células do câncer tratadas com a BK. (A) Controle, (B) [16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ], (C) [32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] e (D) [64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]. Barras = 100  $\mu\text{m}$ .



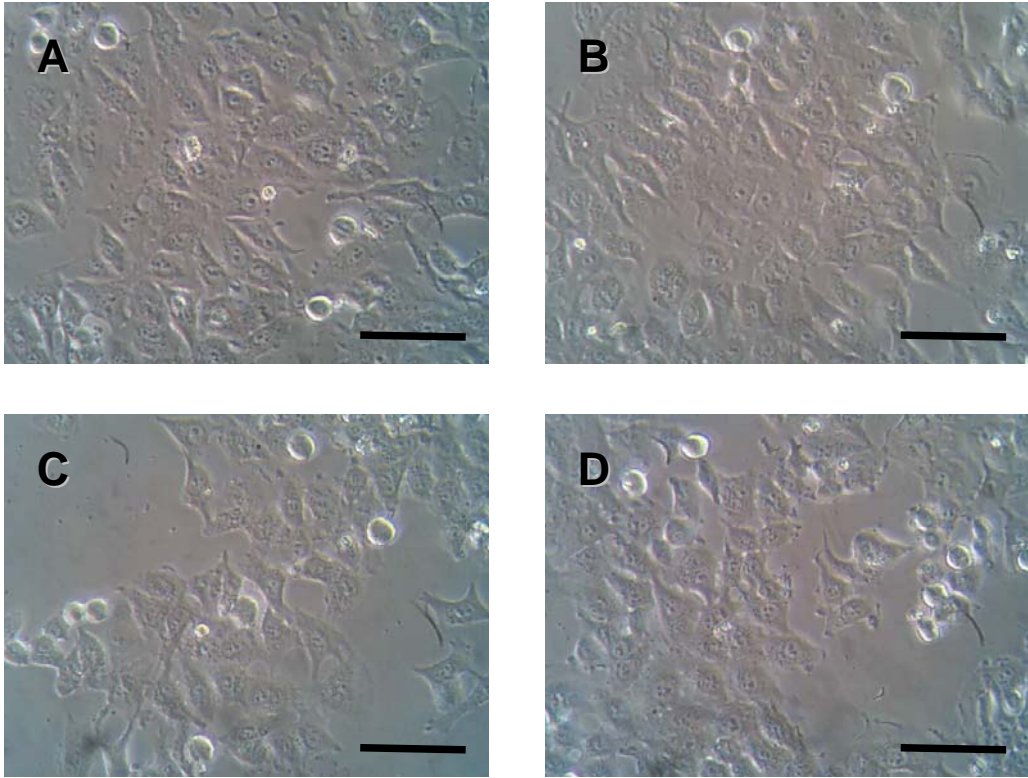


Figura 23. Análise em microscópio de contraste de fase das células do câncer tratadas com a BK1. (A) Controle, (B) [16 µg/mL], (C) [32 µg/mL] e (D) [64 µg/mL]. Barras = 100 µm.

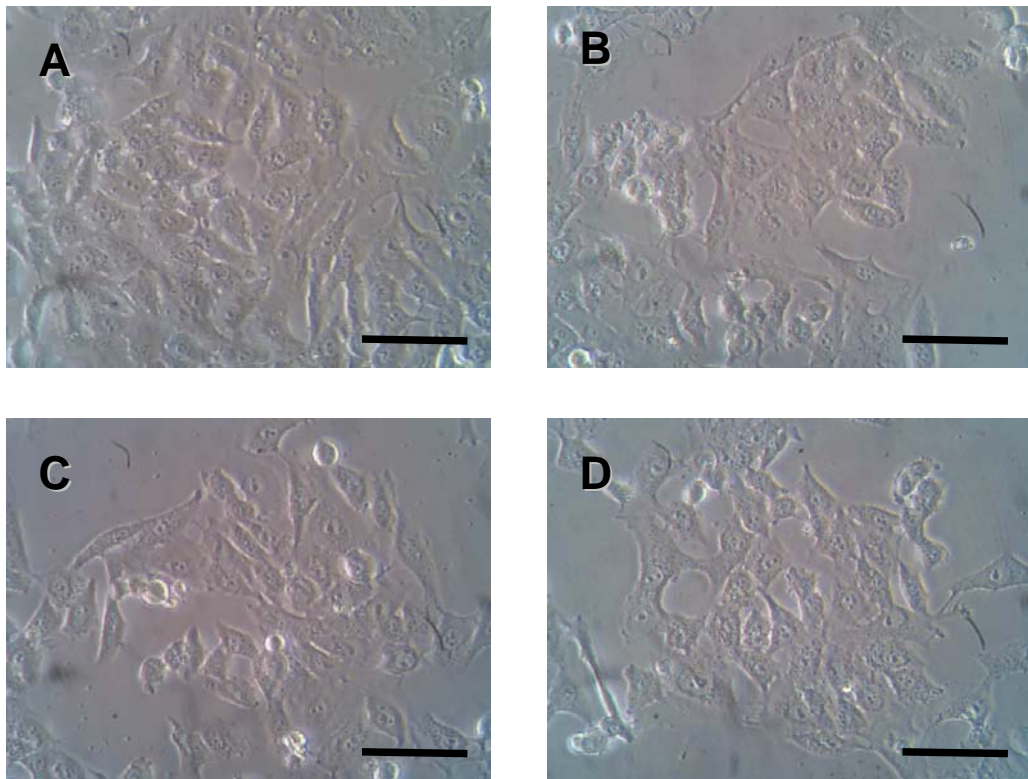


Figura 24. Análise em microscópio de contraste de fase das células do câncer tratadas com a BK2. (A) Controle, (B) [16 µg/mL], (C) [32 µg/mL] e (D) [64 µg/mL]. Barras = 100 µm.

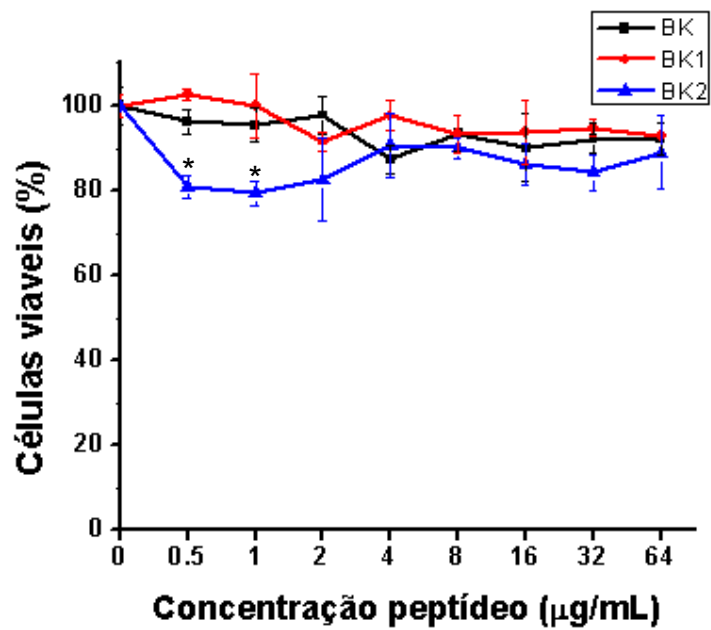


Figura 25. Análise comparativa das células viáveis (%) observadas em cada concentração dos peptídeos BK, BK1 e BK2. \* Diferença estatisticamente significativa ( $P < 0.05$ ) em relação ao BK e BK1.

## **6. DISCUSSÃO**

A secreção cutânea dos anfíbios é rica em substâncias envolvidas nas funções biológicas e adaptativas destes animais. Diversos peptídeos foram isolados da secreção de anuros do gênero *Phyllomedusa*. Dentre esses, diversos análogos de BKs foram encontrados nas três espécies estudadas, os quais provavelmente atuam como mecanismo de defesa contra eventuais predadores. Na secreção de *Phyllomedusa burmeisteri* foram identificados 10 análogos de bradiginina enquanto na secreção de *P. rohdei* foram 11 e na de *P. tomopterna* 7 análogos. A grande quantidade de análogos na secreção de espécies do gênero *Phyllomedusa* é comumente encontrada como demonstrado em Brand e colaboradores em 2006 e em Thompson e colaboradores em 2006.

A diferente distribuição geográfica das espécies de *Phyllomedusa* estudadas (Mata Atlântica e Floresta Amazônica) mostrou diversidade nos peptídeos encontrados. Em geral, anfíbios de um mesmo gênero que habitam a mesma região possuem uma secreção composta por peptídeos semelhantes estruturalmente ou funcionalmente. Steinborner e colaboradores (1996) demonstraram em seu estudo que havia diferenças na composição e na concentração de peptídeos na secreção de anfíbios do gênero *Litoria* que habitam a região de Queensland na Austrália. Em seu estudo, quanto mais ao norte da região maior era a concentração de alguns peptídeos na secreção, porém ainda não se sabe o motivo.

A variabilidade na estrutura primária dos análogos de BK na secreção é reflexo da heterogeneidade molecular dos peptídeos que podem ser gerados no plasma de outras classes de vertebrados pela ação da calicreína. Somente dois resíduos de aminoácidos em BK (Gly4 e Arg9) foram conservados durante a evolução desse peptídeo (Conlon, 2005). As modificações pós-traducionais encontradas freqüentemente nas BKs são a hidroxilação da prolina e a sulfonação, e embora a função biológica dessas modificações ainda não seja completamente esclarecida, elas podem promover o aumento da estabilidade estrutural. Adicionalmente, a presença de moléculas estendidas pode representar algum mecanismo de prevenção da ativação ou mesmo de proteção da molécula até o momento de sua liberação. Nesse sentido, no presente estudo o análogo BK2 (VPPGFTPFQRQS), foi submetido à ação da enzima tripsina, comumente encontrada no trato digestório levando à formação

da forma de bradiginina tipicamente encontrada em répteis (VPPGFTPFR), em particular serpentes (predadores de Phyllomedusas).

Entretanto, a razão para a grande heterogeneidade e diversidade de BRPs na secreção cutânea de anfíbios permanece não esclarecida, mas uma recente hipótese sugeriu que estes estão relacionados ao predador específico de cada espécie, sendo esses mamíferos (predam principalmente ovos), répteis (predam principalmente indivíduos adultos) ou aves (Sin *et al.*, 2008). Como exemplo dessa hipótese, serpentes (*Thamnophis spp.*) tem sido observadas com frequência rejeitando espécimes adultos após uma captura inicial e isso pode ser resultado de seu sabor desagradável ou de componentes tóxicos na secreção cutânea. Uma ação semelhante de proteção pela secreção cutânea no anuro *Dendrobates auratus* foi documentada. Isso seria explicado, pois, a BK é um potente estimulador do músculo liso gastrointestinal e de mecanismos relacionados com a dor em mamíferos e esse peptídeo também atua diretamente no sistema vascular de serpentes. Esses eventos fortalecem a hipótese na qual a liberação de múltiplos análogos de BK na secreção possui um importante papel na tentativa de deter a ingestão por predadores (Conlon *et al.*, 2005).

Os peptídeos estudados nas condições apresentadas (concentração) anteriormente não exibiram toxicidade para macrófagos e eritrócitos humanos; e também não promoveram extravasamento vascular (Figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21). Esses resultados apontam para uma baixa toxicidade (se alguma) desses análogos de BKs, o que possibilita que outros testes possam ser realizados para verificar a ação desses peptídeos e a possível atuação dos mesmos como agonistas e/ou antagonistas com potencial terapêutico, em particular nas atividades da BK relacionadas com a inflamação. No teste de extravasamento vascular, o captopril (vasodilatador comercial) foi utilizado para diminuir a ação das cinases. A dose de 3 nmol foi utilizada, pois o interesse do teste era observar a atuação das bradigininas em estudo, no processo inflamatório agudo local. O presente estudo não observou a formação de edema significativo, corroborando os dados apresentados por Castardo *et al* 2008 onde a mesma dose foi administrada na região sub-plantar e após 30 minutos foi observado apenas um pequeno aumento do edema. Campos e Calixto 1995 observaram que a BK sozinha em ratos provoca edema, mas em

conjunto com mediadores inflamatórios pode causar pouco edema mediado pelo receptor B<sub>2</sub>. Nesse mesmo estudo quando injetada 10 nmol por vários dias consecutivos a BK saturou o receptor do edema.

Os ensaios não apresentaram nenhum traço significativo no aumento da permeabilidade vascular, assim como mostrado por Wahl *et al.* 1996, onde a injeção de 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-5</sup> M de BK por Kg de peso corporal foi administrada. Calixto *et al.* 2006 não encontraram ou detectaram apenas pouco extravasamento quando a BK foi administrada em conjunto com outros mediadores da inflamação. A BK por meio de seus receptores pode aumentar a permeabilidade vascular ocasionando um edema ou causar um influxo do plasma sanguíneo pela abertura dos canais de Ca<sup>2+</sup>, (Bathon *et al.*, 1991; Leung *et al.*, 2006).

A BK é um dos primeiros mediadores da inflamação, podendo aumentar a permeabilidade vascular e é também um fator de crescimento. Assim, não é surpresa que tumores a usem para facilitar seu crescimento e migração (Stewart *et al.*, 1999). A descoberta que os análogos e antagonistas das BKs podem estimular a apoptose em células cancerígenas e que podem atuar sinergicamente com drogas anti-câncer abrem um novo caminho para o desenvolvimento de novas drogas no tratamento do câncer, pois não apresentam efeitos colaterais (Greco *et al.*, 2005; Kwok *et al.*, 2008). Uma eficiente entrega de drogas nas células tumorais é crucial para uma quimioterapia eficiente. Em Wang *et al.* 2007, foi encontrado que em contraste com uma grande dose de BK que ultrapassa a barreira hematoencefálica, uma pequena dose de BK pode seletivamente abrir a barreira sangue-tumor aumentando a entrada de grandes partículas que são normalmente impedidas pela mesma. A modulação seletiva dessa barreira promove uma promissora ferramenta para uma eficiente quimioterapia. Estudos *in vivo* mostraram que o seletivo aumento da permeabilidade da barreira sangue-tumor induzida pela infusão intracarótida de baixas doses de BK é mediada pelo receptor B<sub>2</sub>. Esse efeito pode ser explicado, pois baixa dose de BK aumenta seletivamente o nível de cálcio intracelular nas células tumorais (baixa dose 10<sup>-6</sup> M e alta dose 10<sup>-5</sup> M) (Wang *et al.*, 2007). Mesmo sabendo-se que a BK aumenta a permeabilidade vascular, possivelmente a dose utilizada no presente estudo pode não ter sido a ideal para estimular o extravasamento vascular. Tanto a

BK1 como a BK2 poderiam atuar como antagonistas da BK nesse efeito ou simplesmente não ter sido atingida a dose necessária para o desencadeamento dos efeitos. Adicionalmente, a ausência de efeito significativo diretamente sobre as células de câncer de boca mesmo em concentrações micromolares sugere que esses peptídeos bioativos não atuem diretamente sobre as células tumorais (em particular células de câncer de boca), mas talvez sobre a formação de vasos sanguíneos que nutrem os tumores. Estudos adicionais serão necessários para esclarecer esse aspecto. Interessantemente, baixas concentrações de BK2 diminuíram, moderadamente a viabilidade das células de câncer de boca sugerindo uma possível modulação dose-dependente que requer estudos adicionais no sentido de averiguar a forma de morte celular (necrose ou apoptose), assim como o mecanismo de ação.

A BK e NO são demonstrados como potentes agentes hipotensores. A BK induz a síntese *in vitro* de NO por células endoteliais e tem sido mostrado que o NO é um importante mediador durante a hipotensão induzida pela BK. Nos macrófagos a concentração e a dependência do tempo são importantes para a ativação celular e a liberação de NO. O efeito biológico das BKs depende significativamente de sua concentração para a migração e acúmulo de leucócitos nos sítios de injeção de BK (1-100 µg). Fagócitos podem ser ativados em altas concentrações tais como 0,5-1 µg/mL de BK (Stoika *et al.*, 2002).

Em 2000, Böckmann e colaboradores observaram que macrófagos murinos possuíam receptor do tipo B<sub>1</sub>, mas que os receptores variavam de acordo com a espécie, tecido e estágio de diferenciação celular. Macrófagos existem em diferentes estágios de maturação e diferenciação. Comparando com outros fatores químicos a BK induz somente uma moderada migração de neutrófilos periféricos humanos, pois estes possuem poucos receptores B<sub>2</sub>. Estudos recentes em células mononucleares humanas mostraram que os mastócitos humanos expressam um baixo número de sítios de ligação para receptores de cininas. Tanto BK1 como BK2 não estimularam a liberação de NO pelos macrófagos, isso pode ter ocorrido tanto pela dose testada quanto pela ausência ou pequena quantidade de receptores específicos para as BKs testadas nesse tipo celular.



As BKs são importantes fatores de crescimento para vários cânceres, particularmente câncer de células pequenas do pulmão e próstata. Também estão presentes nos cânceres de útero, mama, estômago, glândula pituitária e pode estimular a formação de novos vasos sanguíneos, pela liberação de fator de crescimento endotelial vascular. Os antagonistas dos receptores são estudados para bloquear esses mecanismos (Greco *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 2005).

O antagonista HOE 140 é o mais estudado atualmente. Outros antagonistas são estudados para a viabilização de novos tratamentos para as patologias relacionadas à BK. Antagonistas de cininas têm sido estudados por possuir uma potente propriedade antiinflamatória (Sharma, 2005). As BKs (BK1 e BK2) em estudo sugerem indícios de antagonismo ao efeito da BK de mamíferos ao não apresentarem efeitos do processo inflamatório testados e em outros estudos realizados pelo grupo de pesquisa mostraram ter pouco efeito tanto na contração da musculatura lisa do íleo de cobaias como no efeito hipotensor na corrente sanguínea de camundongos (Brand *et al.*, 2006)

O grande desafio enfrentado pela ciência no estudo desses análogos é a viabilização desses como fármacos, pois a absorção oral da BK é rápida. Uma alternativa seria o encapsulamento desse análogo ou a disponibilização de um sistema de liberação controlada por acoplamento do peptídeo a uma nanopartícula ou nanocápsula permitindo o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

## **7. CONCLUSÃO**

Desde a década de 70, alguns estudos de biologia molecular e bioquímica estão voltados para a identificação dos compostos presentes nos venenos de serpentes, escorpiões, aranhas e secreção de anfíbios devido ao destaque recebido frente às suas aplicações na indústria farmacêutica. O alto grau de complexidade da secreção dos anfíbios é evidenciado pelo fato que estes contêm proteínas, peptídeos, aminas biogênicas, alcalóides entre outras moléculas ainda não caracterizadas. Peptídeos com massas moleculares menores que 5 kDa são as moléculas predominantes na secreção de várias pererecas da sub-família *Phyllomedusinae* de regiões da América Central e do Sul as quais são consideradas as espécies com o mais alto grau de complexidade de peptídeos, representando uma fonte para novas descobertas. As espécies deste gênero estudadas nesse presente estudo corroboram para essa afirmação.

Por possuírem moléculas com estrutura primária semelhante à humana e de outros mamíferos e não serem nocivos às células destes, esses peptídeos possuem um elevado potencial farmacológico para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças crônicas, dor, inflamação, hipertensão, câncer, entre outros. As técnicas utilizadas nesse estudo, além de serem inovadoras se mostraram eficientes e ideais para o tipo de análise realizada.

Os peptídeos avaliados (BK, BK1 e BK2) nas condições descritas nos ensaios biológicos apresentaram resultados sugestivos quanto ao espectro de atividades biológicas, sendo necessária a utilização de novos protocolos para a confirmação de seus efeitos como agonistas ou antagonistas, assim como para a definição da ação efetiva.

Cada vez mais novos estudos são necessários para a total caracterização da secreção cutânea desses anfíbios, ou seja, a prospecção das novas moléculas é apenas o início da busca por novos potenciais biotecnológicos.

## **8. BIBLIOGRAFIA**

- ABELOUS, J.E.; BARDIER, E. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *CR Social Biology*. v. 66, p. 511-520, 1909.
- ARYA, S.; KUMAR, V.L. Antiinflammatory Efficacy of Extracts of Latex of *Calotropis procera* Against Different Mediators of Inflammation. **Mediators of Inflammation**. v. 4, p. 228-232, 2005.
- BATISTA, C.V.F.; DA SILVA, R.; SEBEN, A.; SCALONI, A.; FERRARA, L.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; POSSANI, L.D.; BLOCH JR., C. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. **Peptides**. v. 20, p. 679-686, 1999.
- BELEBONI, R.O.; PIZZO, A.B.; FONTANA, A.C.K.; CAROLINO, R.O.G.; COUTINHO-NETTO, J.; DOS SANTOS, W.F. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. **European Journal of Pharmacology**. v. 493, p. 1-17, 2004.
- BEVINS, C.L.; ZASLOFF, M. Peptides from frog skin. **Animal Review Biochemistry**. v. 59, p. 395-414, 1990.
- BOCK, M.G.; LONGMORE, J. Bradykinin antagonists: New opportunities. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 4, p. 401-406, 2000.
- BRAND, G.D.; KRAUSE, F.C.; SILVA, L.P.; LEITE, J.R.S.A.; MELO, J.A.T.; PRATES, M.V.; PESQUERO, J.B.; SANTOS, E.L.; NAKAIE, C.R.; COSTA-NETO, C.M.; BLOCH JR., C. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa Hypochondrialis*. **Peptides**. v. 27, p. 2137-46, 2006.
- BRANDÃO, R.; FAJARDO, G. Conservação, ecologia e taxonomia das espécies de *Phyllomedusa* do grupo *hypochondrialis*. <http://www.pequi.org.br/phyllomedusa.html> (acessado em 12/05/2007).
- CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**. v. 87, p. 1-5, 2000.
- CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, R.; FERNANDES, E.S.; FERREIRA, J.; CABRINI, D.A.; CAMPOS, M.M. Kinin B<sub>1</sub> receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **British Journal of Pharmacology**. v. 143, p. 803-818, 2004.
- CAMPOS, M.M.; LEAL, P.C.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Non-peptides antagonists for kinin B<sub>1</sub> receptors: new insights into their therapeutical potential for the management of inflammation and pain. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 27, p. 646-651, 2006.

- CHAN, W.C.; WHITE, P.D. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis a practical approach. Ed. Oxford. Nova lorque, 2000.
- CHEN, J.J.; JOHNSON, E.J. Targeting the bradykinin B1 receptor to reducepain. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. v. 11, n. 1, p. 21-35, 2007.
- CHEN, T.; SHAW, C. Cloning of the (Thr<sup>6</sup>)-phyllokinin precursor from *Phyllomedusa sauvagei* skin confirms a non-consensus tyrosine O-sulfation motif. **Peptides**. v. 24, p. 1123-1130, 2003.
- CHEN, T.; ZHOU, M.; GAGLIARDO, R.; WLAKER, B.; SHAW, C. Elements of the granular gland peptidome and transcriptome persist in air-dried skin of the South American orange-legged leaf frog, *Phyllomedusa hypocondrialis*. **Peptides**. v. 27, p. 2129-2136, 2006.
- CLARKE, B.T. The Natural History of Amphibian Skin Secretions, their Normal Functioning and Potential Medical Applications. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**. v. 72, p. 365-379, 1997.
- COMEAU, S.; LANCE, V.A.; HICKS, J.W.; CONLON, J.M. Purification and biological activity of alligator bradykinin. **American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 263, p. 400-404, 1992.
- CONLON, J.M. Bradykinin and its receptors in non-mammalian vertebrates. **Regulatory Peptides**. v. 79, p. 71-81, 1999.
- CONLON, J.M.; ARONSSON, U. Multiple Bradykinin-Related Peptides From the Skin of the Frog, *Rana temporaria*. **Peptides**. v. 18, p. 361-365, 1997.
- CONLON, J.M.; JOUENNE, T.; COSETTE, P.; COSQUER, D.; VAUDRY, H.; TAYLOR, C.K.; ABEL, P.W. Bradykinin-related peptides and tryptophyllins in the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. **General and Comparative Endocrinology**. v. 143, p. 193-199, 2005.
- CONLON, J.M. Bradykinin-relates peptides from frog skin. **Handbook of Biologically Active Peptides**. Chapter 44, p. 291-294, 2006.
- COSTA-NETO, C.M.; DILLENBURG-PILLA, P.; HEINRICH, T.A.; PARREIRAS-E-SILVA, L.T.; PEREIRA, M.G.A.G.; REIS, R.I.; SOUZA, P.P.C. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. **International Immunopharmacology**. v. 8, p. 135-142, 2008.
- CRUWYS, S.C.; GARRETT, N.E.; PERKINS, M.N.; BLAKE, D.R.; KIDD, B.L. The role of bradykinin B1 receptors in the maintenance of intra-articular

- plasma extravasation in chronic antigen-induced arthritis. **British Journal of Pharmacology**. v. 113, p. 940-944, 1994.
- DE LIMA, T.M.; DE SA LIMA, L.; SCAVONE, C.; CURI, R. Fatty acid control of nitric oxide production by macrophages. **FEBS letter**. v. 580, p. 3287-3295, 2006.
- ELLIS, K.M.; FOZARD, J.R. Species differences in bradykinin receptor mediated responses of the airways. **Autonomic & Autacoid Pharmacology**, v. 22, p. 3-16, 2002.
- ESCOUBAS, P. Molecular diversification in spider venoms: a web of combinatorial peptide libraries. **Molecular Diversity**. v. 10, p. 545-554, 2006.
- ESCOUBAS, P.; Mass spectrometry in toxinology: A 21st-century technology for the study of biopolymers from venoms. **Toxicon**. v. 47, p. 609-613, 2006b.
- FAVREAU, P.; MENIN, L.; MICHALET, S.; PERRET, F.; CHENEVAL, O.; STÖCKLIN, M.; BULET, P.; STÖCKLIN, 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.
- FERNANDEZ, J.H.; NESHICH, G.; CAMARGO, A.C.M. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. **Genetics and Molecular Research**. v. 3, p. 554-563, 2004.
- FROST, D.R. Amphibian Species of the World: an online reference. Version 5.0 (1 February 2007). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. **American Museum of Natural History**. New York, USA, 2007.
- GRECO, S.; ELIA, M.G.; MUSCELLA, A.; ROMANO, S.; STORELLI, C.; MARSIGLIANTE, S. Bradykinin stimulates cell proliferation through an extracellular-regulated kinase 1 and 2-dependent mechanism in breast cancer cells in primary culture. **Journal of Endocrinology**. v. 186, p. 291-301, 2005.
- HALL, J.N. Bradykinin receptors. **Genetical Pharmacology**. v. 28, p. 1-6, 1997.
- KAPLAN, A.P.; KUSUMAN, J.; SILVERBERG, M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. **Journal of Allergy Clinical Immunology**. p. 195-209, 2002.
- KOH, D.C.I.; ARMUGAM, A.; JEYASSELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular Molecular Life Science**. v. 63, p. 3030-3041, 2006.

- KRAUT, H.; FREY, E.K.; WERLE, E. Der Nachweis eines Kreislaufhormon in der Pankreasdruse. *Hoppe-Seylers Z Physiology Chem.* v. 189, p. 97-106, 1930.
- KWOK, H.F.; CHEN, T.; O'ROURKE, M.; IVANYI, C.; HIRST, D.; SHAW, C. Helokinesstatin: A new bradykinin B2 receptor antagonist decapeptide from lizard venom. **Peptides.** v. 29, p. 65-72, 2008.
- LACOMBE, C.; CIFUENTES-DIAZ, C.; DUNIA, I.; AUBER-THOMAY, M.; NICHOLAS, P.; AMICHE, M. Peptide secretion in cutaneous glands of South America tree frog *Phyllomedusa bicolor*: an Ultrastructural study. **European Journal of Cell Biology.** v. 79, p. 631- 641, 2000.
- LAI, R.; LIU, H.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. A novel Bradykinin-related peptide from the skin of toad *Bombina maxima* and its precursor containing six identical copies of the final product. **Biochemical and Biophysical Research Communication.** v. 286, p. 259-263, 2001.
- LAZARUS, L.H.; ATILLA, M. The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. **Progress in Neurobiology.** v. 41. p.473–507, 1993.
- LEE, G.; KIM, Y.B.; KIM, J.H.; KIM, M.S.; SHIN, K.H.; WON, Y.S.; LEE, J.I.; CHOUNG, P.H.; HYUN, B.H.; MIN, B.M. Characterization of novel cell lines established from three human oral squamous cell carcinomas. **International Journal of Oncology.** v. 20, p.1151-1159, 2002.
- LEEB-LUNDBERG, L.M., MARCEAU, F.; MÜLLER-ESTERL, W.; PETTIBONE, D.J.; ZURAW, B.L. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences. **Pharmacological Reviews.** v. 57, p. 27-77, 2005.
- LEUNG, P.C.; CHENG, K.T.; LIU, C.; CHEUNG, W.T.; KWAN, H.Y.; LAU, K.L.; HUANG, Y.; YAO, X. Mechanism of Non-Capacitative Ca<sup>2+</sup> Influx in Response to Bradykinin in Vascular Endothelial Cells. **Journal do Vascular Research.** v. 43, p. 367-376, 2006.
- LEITE, J.R.S.A.; BRAND, G.D.; SILVA, L.P.; KÜCKELHAUS, S.A.S.; BENTO, W.R.C.; ARAUJO, A.L.T.; MARTINS, G.R.; LAZZARI, A.M.; BLOCH, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. **Comparative Biochemistry and Physiology.** Part A, 2007.
- LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic Potential of Venom Peptides. **Nature Reviews of Drug Discovery.** v. 2, p. 790-802, 2003.



- LIANG, J.; HAN, Y.; LI, J.; XU, X.; REES, H.H.; LAI, R. A novel bradykinin-like peptide from skin secretions of rufous-spotted torrent frog, *Amolops loloensis*. **Peptides**. v. 27, p. 2683-2687, 2006.
- MARTINS DE LIMA, T.; CURY-BOAVENTURA, M.F.; GIANNOCCO, G.; NUNES, M.T.; CURI, R. Comparative toxicity of fatty acids on a macrophage cell line (J774). **Clinical Science**. v. 111, p. 307-317, 2006.
- MATSUMOTO, K.; NISHI, K.; KIKUCHI, M.; KADOWAKI, D.; TOKUTOMI, Y.; TOKUTOMI, N.; NISHI, K.; SUENAGA, A.; OTAGIRI, M.  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein Suppresses Rat Acute Inflammatory Paw Edema through the Inhibition of Neutrophils Activation and Prostaglandin E<sub>2</sub> Generation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 30, p. 1226-1230, 2007.
- MENDES, M.A.; PALMA, M.S. Two new Bradykinin-related peptides from the venom of the social wasp *Protopolybia exigua* (Sawssure). **Peptides**. v. 27, p. 2632-9, 2006.
- 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.
- MOREAU, M.E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N.J.; MARCEAU, F.; ADAM, A. The Kallikrein-kinin system: Current and future pharmacological targets. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 99, p. 6-38, 2005.
- NASCIMENTO, A.C.C.; FONTES, W.; SEBEN, A.; CASTRO, M.S. Antimicrobial Peptides from Anurans Skin Secretions. **Protein and Peptide Letters**. v. 10, p. 227-238, 2003.
- NEVEROVA, I.; VAN EYK, J.E. Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. **Journal of Chromatography**. v. 815, p. 51-63, 2005.
- PHITON-CURI, T.C.; TREZENA, A.G.; TAVARES-LIMA, W.; CURI, R. Evidence that glutamine is involved in neutrophil function. **Cell Biochemistry and function**. v. 20, p. 81-86, 2002.
- REGOLI, D.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacological reviews**. v. 32, p. 1-46, 1980.
- REGOLI, D.; RIZZI, A.; CALO, G.; ALLOGHO, S.N.; GOBEIL, F. B1 e B2 receptors in various species. **Immunopharmacology**. v. 36, p.143-147, 1997.

- REGOLI, D.; ALLOGHO, S.N.; RIZZI, A.; GOBEIL, F. Bradykinin receptors and their antagonists. **European Journal of Pharmacology** . v. 348. p. 1-10, 1998.
- SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **European Journal of Pharmacology**. v. 331, p. 43-52, 1997.
- SCHWARTZ, E.F.; CAMARGOS, T.S.; ZAMUDIO, F.Z.; SILVA, L.P.; BLOCH, C.; CAIXETA, F.; SCHWARTZ, C.A.; E POSSANI, L.D. Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. **Toxicon**. v. 51, p. 1499-1508, 2008.
- SHARMA, J.N. The kallikrein–kinin system: from mediator of inflammation to modulator of cardioprotection. **Inflammopharmacology** v. 12, p. 591–596, 2005.
- SILVA, L.P.; LEITE, J.R.S.A.; BRAND, G.D; REGIS, W.B.; TEDESCO, A.C.; AZEVEDO, R.B.; FREITAS, S.M.; BLOCH, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Liposomes fusion and/or lysis investigated by fluorescence and atomic force microscopy. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A, *in press*, 2007.
- SIN, Y.T.; ZHOU, M.; CHEN, W.; WANG, L.; CHEN, T.; WALKER, B.; SHAW, C. Skin bradykinin -related peptides (BRPs) and their biosynthetic precursors (kininogens): Comparisons between various taxa of Chinese and North American ranid frogs. **Peptides**. v. 29, p. 393-403, 2008.
- STEINBORNER, S.T.; WABNITZ, P.A.; BOWIE, J.H.; TYLER, M.J. The application of mass spectrometry to the study of evolutionary trends in amphibians. **Rapid Communication on Mass Spectrometry**. v. 10, p. 92-95, 1996.
- STEWART, J.M.; GERA, L.; YORK, E.Y.; CHAN, D.C.; BUNN, P. Bradykinin antagonists: present progress and future prospects. **Immunopharmacology**. v. 43, p. 155-161, 1999.
- STEWART, J.M.; Bradykinin antagonists: discovery and development. **Peptides**. v. 25, p. 527-532, 2004.
- STEWART, J.M.; GERA, L.; CHAN, D.C.; YORK, E.Y.; SIMKEVICIENE, V.; BUNN, P.; TARASEVICIENE-STEWART, L. Combination cancer chemotherapy with one compound: Pluripotent bradykinin antagonists. **Peptides**. v. 26, p. 1288-1291, 2005.
- THOMPSON, A.H.; BJORSON, A.J.; SHAW, C.; STEPHEN, M.C. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*: mass spectrometric structural characterization and cloning of precursor cDNAs.

**Rapid Communications in Mass Spectrometry.** v. 20, p. 3780-3788, 2006.

THOMPSON, A.H.; BJOURSON, A.J.; ORR, D.F.; SHAW, C.; STEPHEN, M.C. Amphibian Skin Secretomics: Application of Parallel Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry and Peptide Precursor cDNA Cloning to Rapidly Characterize the Skin Secretory Peptidome of *Phyllomedusa hypochondrialis* azurea: Discovery of a Novel Peptide Family, the Hyposins. **Journal of Proteome Research** v. 6, p. 3604-3613, 2007.

TOPPOHOFF, U.S.; PRAT, A.; BADER, W.; ZIPP, F.; AKTAS, O. Roles of the kallikrein/kinin system in the adaptive immune system. **International Immunopharmacology.** v. 8, p. 155-160, 2008.

VAZIRI, N.D.; DING, Y.; NI, Z.; BARTON, C.H. Bradykinin Down-Regulates, Whereas Arginine Analogs Up-Regulates, Endothelial Nitric-Oxide Synthase Expression in Coronary Endothelial Cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** v.313, p. 121-126, 2005.

VOLSI, E.C.F.R.; MENDES, M.A.; MARQUES, M.R.; SANTOS, L.D.; SANTOS, K.S.; SOUZA, B.M.; BABIERI, E.F.; PALMA, M.S. Multiple bradykinin-related peptides from the capture web of the spider *Nephila clavipes* (Araneae, Tetragnatidae) . **Peptides.** v. 27, p. 690-697, 2006.

WALKER, K.; PERKINS, M.; DRAY, A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochemistry International.** v. 26, p.1-16, 1995.

WANG, Y.; PENG, C.; LIU, Y. Low dose of bradykinin selectively increases intracellular calcium in glioma cells. **Journal of the Neurological Sciences.** v. 258, p.44-51, 2007.

WITHEROW, F.N.; DAWSON, P.; LUDLAM, C.A.; WEBB, D.J.; FOX, K.A.A.; NEWBY, D.E. Bradykinin Receptor Antagonism and Endothelial Tissue Plasminogen Activator Release in Humans. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.** v. 23, p. 1667-1670, 2003.

YAMAKAWA, M.; NOZAKI, M.; HOKAMA, Z. Fractionation of Sakishima habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. In: Ohsaka, A., Hayashi, K. and Sawai, Y. **Animal, Plant and Microbial Toxins vol. 1** Plenum Press, New York, p. 97-109, 1976.

ZHOU, Z.; YANG, H.; XU, X.; WANG, X.; LAI, R. The first report of kininogen from invertebrates. **Biochemical and Biophysical Research Communication.** v. 347, p. 1099-1102, 2006.

ZHOU, J.; BJOURSON, A.J.; COULTER, D.J.M.; CHEN, T.; SHAW, C.; O'ROURKE, M.; HIRST, D.; ZHANG, Y.; RAO, P.; McCLEAN, S. Bradykinin-related peptides, including a novel structural variant, (Val1)

bradykinin, from the skin secretion of Guenther's frog, *Hylarana guentheri* and their molecular precursors. **Peptides**. v. 28, p. 781-789, 2007.