



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**

**JULIANA CORDEIRO DE SOUSA**

**LEPTOGLICINA: UM NOVO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO RICO EM GLY-LEU  
ISOLADO DA SECREÇÃO DA PELE DA RÃ SUL AMERICANA *Leptodactylus  
pentadactylus* (LEPTODACTYLIDAE)**

**Fortaleza - CE**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**JULIANA CORDEIRO DE SOUSA**

**LEPTOGLICINA: UM NOVO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO RICO EM GLY-LEU  
ISOLADO DA SECREÇÃO DA PELE DA RÃ SUL AMERICANA *Leptodactylus  
pentadactylus* (LEPTODACTYLIDAE)**

**Dissertação apresentada ao  
curso de Mestrado Acadêmico em  
Ciências Fisiológicas do Centro de  
Ciências da Saúde da Universidade  
Estadual do Ceará como requisito para  
a obtenção do grau de Mestre.**

**Orientador. Prof. Dr. Krishnamurti de  
Moaris Carvalho**

**Fortaleza - CE**

**2008**

**JULIANA CORDEIRO DE SOUSA**

**LEPTOGLICINA: UM NOVO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO RICO EM GLY-LEU  
ISOLADO DA SECREÇÃO DA PELE DA RÃ SUL AMERICANA *Leptodactylus  
pentadactylus* (LEPTODACTYLIDAE)**

**Dissertação submetida à apreciação, como requisito necessário à obtenção  
do título de Mestre em Ciências Fisiológicas, concedido pelo Mestrado  
Acadêmico em Ciências Fisiológicas pela Universidade Estadual do Ceará**

**Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_**

**Banca Examinadora**

---

**Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho (Orientador)**

**Universidade Estadual do Ceará**

---

**Prof. Dr. Bruno de Andrade Cardí**

**Universidade Estadual do Ceará**

---

**Prof. Dr. Daniel Pimenta Carvalho**

**Instituto do Butantan- SP**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Veralucia de Paiva e Lucio Rubens que com muita dedicação deram o melhor de si para que suas filhas pudessem sempre ter o melhor e a oportunidade de ter acesso ao saber. Que são colunas na minha caminhada e exemplos verdadeiros de vida. A minha irmã, Ruani Azevedo, e ao meu cunhado, Edilailson Azevedo, por todo o seu incentivo e companheirismo nessa caminhada. E a todos os meus familiares (tios – Vanda e Lauro, Zezinho e Vladia, Lucia e Luiz Carlos; minha avó Terezinha e primos).

Ao meu noivo, Eduardo Gomes, que sempre esteve ao meu lado, que me estimulou, aplaudiu e comemorou comigo mais essa vitória.

Vocês são os meus verdadeiros amigos e dádivas de Deus na minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Mais uma etapa de minha vida chega ao fim, apesar de momentos custosos, muitas foram às alegrias, descobertas e aprendizados. Durante essa caminhada muitas pessoas estiveram ao meu redor me apoiando, animando e quando necessário fazendo críticas construtivas. Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu conseguisse chegar ao fim dessa jornada. Especialmente a Deus, PAI, por sua infinita graça e por seu amor incondicional. Agradecê-lo de modo especial pela benção de ter concluído esse curso e por poder desfrutar da realização das promessas dele em minha.

Em primeiro lugar um agradecimento especial a Prof. Dr. Krishnamurti por ter aceitado o desafio de me orientar desde o meu primeiro semestre da graduação, me ajudando nos meus primeiros passos no caminho da investigação científica e por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho. Além de ter me ensinado com dedicação durante esses nove anos e por ter deixado valiosos ensinamentos e exemplo de vida.

Ao Prof. Dr. Bruno Andrade Cardi pela sua orientação, conselhos e participação em todos os momentos de trabalhos diários no laboratório e na execução desse trabalho.

Ao Dr. Daniel Carvalho Pimenta que me recebeu em seu laboratório com muita dedicação e que me ensinou muito com suas valiosas sugestões, Por ter me escutado e me incentivado em muitos momentos difíceis na execução desse trabalho.

Todo meu carinho a minha amiga de trabalho, Raquel Fontenele, por toda a sua paciência e companheirismo na execução dos experimentos. Pelo

apoio e amizade em muitos momentos difíceis. Pelo exemplo de vida e que o sucesso em sua vida esteja sempre presente.

Ao Prof. Dr. Marcos Fabio Rocha e Profa. Rossana Cordeiro por terem colaborado na execução desse trabalho, além de contribuir com críticas e sugestões para as conduções dos experimentos.

Ao Laboratório de Bioquímica e Virologia pela disponibilidade de equipamentos ou reagentes.

A Rosa Germana, pela paciência em ensinar e nos acompanhar na resolução dos problemas diários no laboratório.

A minha amiga Jamile Fialho que me deu a oportunidade de conhecer o Laboratório do Prof.Dr. Krishnamurti Carvalho, além de tantas outras oportunidades. Obrigada pela confiança e carinho. Eu tenho que agradecer muito a Deus por você em minha vida, pois você é um grande exemplo para mim.

A todos amigos e colegas do laboratório que passaram e os que hoje ainda permanecem com os quais pude dividir minhas angustias e alegrias: Patrícia Campelo, Marcelo Monteiro, Eduardo Ribeiro, Carol, Rebouças, Jones Barone, Sergio, Felipe. Além de terem contribuído de alguma forma para realização desse trabalho.

A todos os meus amigos e colegas que me apoiaram e me incentivaram depositando esperança para a conclusão desse trabalho; Fabíola Fernandes, Dr. Ronald Pinheiro, Marcus (Marquinhos), João Paulo, Caio Cesar, Clemilson, Eunice, Herene, Aila.

A todos os funcionários do Mestrado que contribuíram para o bom andamento do trabalho.

E em especial ao seu Dadá e ao meu tio Zelira por toda sua colaboração e cuidado como guias no dias de expedições de coleta do laboratório.



## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Indução, regulação e expressão</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Atividade Biológica dos Peptídeos Antimicrobianos</b>	<b>19</b>
<b>1.3. Diversidade dos peptídeos antimicrobianos</b>	<b>21</b>
<b>1.4. Principais Parâmetros Modular Atividade e Seletividade dos Peptídeos Antimicrobianos</b>	<b>25</b>
<b>1.5. Mecanismo de Ação dos Peptídeos Antimicrobianos</b>	<b>27</b>
<b>1.6. Diversidade de Organismos que Produzem Peptídeos Antimicrobianos</b>	<b>29</b>
<i>1.6.1 Peptídeos de Defesa de Plantas</i>	<b>29</b>
<i>1.6.2 Peptídeos Antimicrobianos de Invertebrados</i>	<b>31</b>
<i>1.6.3. Peptídeos Antimicrobianos de Vertebrados</i>	<b>34</b>
<i>1.6.3.1 Peptídeos Antimicrobianos de Anfíbios</i>	<b>37</b>
<i>Peptídeos antimicrobianos isolados de espécies do gênero Leptodactylus</i>	<b>43</b>
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>46</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	<b>46</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>46</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Espécimes de <i>Leptodactylus pentadactylus</i> e caracterização ambiental do local de coleta</b>	<b>47</b>
<b>3.2. Imunização experimental das rãs <i>Leptodactylus</i></b>	<b>49</b>
<b>3.3. Extração secreção da pele de <i>L. pentadactylus</i></b>	<b>49</b>

<b>3.4. Purificação da secreção de <i>Leptodactylus pentadactylus</i> e isolamento das substancias bioativas</b>	<b>51</b>
<b>3.4.1 Obtenção do perfil cromatográfico da secreção da pele de <i>L. pentadactylus</i></b>	<b>51</b>
<b>3.4.2 Purificação dos peptídeos antimicrobianos</b>	<b>51</b>
<b>3.5. Caracterização Estrutural</b>	<b>52</b>
<b>3.5.1 Espectrometria de Massa</b>	<b>52</b>
<b>3.5.2. Redução e Alquilação</b>	<b>54</b>
<b>3.5.3. Clivagem enzimática – tratamento do peptídeo com <i>Tripsina</i></b>	<b>54</b>
<b>3.5.4. Sequenciamento</b>	<b>55</b>
<b>3.6. Análise da Seqüência</b>	<b>56</b>
<b>3.7. Bioensaios</b>	<b>56</b>
<b>3.7.1 Atividade Antimicrobiana</b>	<b>56</b>
<b>3.7.1.1. Ensaio Antibacterianos</b>	<b>56</b>
<b><i>Microorganismos</i></b>	<b>57</b>
<b><i>Preparação do inoculo para cultivo</i></b>	<b>58</b>
<b><i>Ensaio de Zona de Inibição de Crescimento Bacteriano</i></b>	<b>59</b>
<b><i>Ensaio de Inibição de Crescimento bacteriano em Meio Líquido</i></b>	<b>59</b>
<b>3.7.1.2. Ensaio Antifúngicos</b>	<b>60</b>
<b><i>Microorganismos</i></b>	<b>60</b>
<b><i>Preparo do Inoculo para Cultivo</i></b>	<b>61</b>
<b><i>Teste de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Fungos a Terapia Antifúngica</i></b>	<b>62</b>
<b>3.8. Ensaio Hemolítico</b>	<b>64</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>64</b>
<b>4.1. Perfis cromatográficos das secreções obtidas por manipulação mecânica após estímulos exógenos de espécimes de rã <i>L. pentadactylus</i></b>	<b>64</b>
<b>4.2. Isolamento das Cepas de Ocorrência Natural</b>	<b>66</b>
<b>4.3. Peptídeos antimicrobianos da secreção da pele</b>	<b>66</b>
<b>4.4. Purificação e caracterização de LPG</b>	<b>70</b>
<b>4.5. Sequenciamento de novo da LPG</b>	<b>73</b>

<b>4.6. Análise da seqüência da leptoglicina</b>	<b>77</b>
<b>4.7. Atividade antimicrobiana de Leptoglicina</b>	<b>80</b>
<b>4.8. Atividade de leptoglicina contra eritrócitos humanos</b>	<b>80</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>82</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>92</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>93</b>

**ANEXO – Artigo Publicado**

Sousa JC, Berto RF, Gois EA, Fontenele-Cardi NC, Honório-Júnior JE, Konno K, Richardson M, Rocha MF, Camargo AA, Pimenta DC, Cardi BA, Carvalho KM. Leptoglycin: A new Glycine/Leucine-rich antimicrobial peptide isolated from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus pentadactylus* (Leptodactylidae). *Toxicon*. 2009. 54(1):23-32.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Caracterização da região de coleta de espécimes de rã *L. pentadactylus*.

Figura 2 – Obtenção da secreção glandular da pele de *L. pentadactylus* através de estimulação elétrica.

Figura 3 – Perfil cromatográfico da secreção da pele de *L. pentadactylus* obtida por RT-HPLC depois de imunização experimental das rãs.

Figura 4 – Perfil cromatográfico da secreção da pele de *L. pentadactylus* obtido por RT-HPLC.

Figura 5 – Grau de Pureza do peptídeo antimicrobiano leptoglicina.

Figura 6 – Perfil do pico puro leptoglicina obtido por MALDI-TOF/MS.

Figura 7 – Análise por ESI-Q-TOF/MS do peptídeo antimicrobiano leptoglicina.

Figura 8 - Deconvolução representativa do seqüenciamento *de novo*, por MS/MS, do peptídeo antibacteriano purificado, leptoglicina.

Figura 9 – Alinhamento de múltiplas seqüências realizada pelo Clustal W. Comparação da leptoglicina com outras proteínas e peptídeos.

**Figura 10 – Relacionamento evolucionário entre leptoglicina e outros peptídeos antimicrobianos.**

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1 - Mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos. Peptídeos antimicrobianos matam ou lisam a células através de interações com membranas ou por meio de alvos intracelulares**

**Tabela 2 – Perfil da resistência a antibióticos, realizado por método de microdiluição em caldo, das bactérias isoladas de amostras da pele e de água da lagoa onde vive espécimes de *L. pentadactylus*.**

**Tabela 3 – Atividade antimicrobiana do peptídeo neutro leptoglicina.**

**Tabela 4 – Seqüência de aminoácidos, características fisicoquímicas e biológicas de peptídeos neutros isolados da secreção de anfíbios.**

## RESUMO

Peptídeos antimicrobianos são componentes do sistema imune de vertebrados e invertebrados e são a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos. Nesse estudo, descrevemos o isolamento, caracterização biológica e seqüência de aminoácidos de um novo peptídeo antimicrobiano neutro rico em Gly-Leu isolado da secreção da pele de *L. pentadactylus*. A seqüência de aminoácidos do peptídeo purificado por RT-HPLC (coluna C<sub>18</sub>) foi deduzida por espectrometria de massa e confirmada por degradação de Edman: GLLGLLGPLLGGGGGGGGLL. A leptoglicina foi capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii* com uma mínima concentração inibitória (MIC) de 8 µM, 50 µM e 75 µM, respectivamente, mas não apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Enterococcus faecalis*), leveduras (*Candida albicans* e *C. tropicalis*) e fungos dermatofitos (*Microsporum canis* *Trichophyton rubrum*). Não foi observada atividade hemolítica nas concentrações referentes ao MIC. A leptoglicina é um linear peptídeo com uma particular composição de aminoácidos caracterizado por um alto nível de glicinas (59%), leucinas (36%) e um prolina central. Futuros estudos são necessários para determinar a estrutura secundária e o mecanismo de ação desse novo e incomum peptídeo antimicrobiano. Contudo esses resultados sugerem que esse natural peptídeo antimicrobiano pode ser utilizado como ferramenta para o desenvolvimento de novos antibióticos.

*Palavras chaves:* peptídeos antimicrobianos, leptoglicina, *Leptodactylus pentadactylus*, peptídeos ricos em GLy – Leu.

## ABSTRACT

Antimicrobial peptides are components of the vertebrates and invertebrates innate immunity that is the first-line defense against invading pathogens for a wide range of organisms. Here, we describe the isolation, biological characterization and amino acid sequencing of a novel neutral Glycine/Leucine-rich antimicrobial peptide from skin secretion of *L. pentadactylus* named leptoglycin. The amino acid sequence of the peptide purified by RP-HPLC (C<sub>18</sub>-column) was deduced by mass spectrometric *de novo* sequencing and confirmed by Edman degradation: GLLGLLGPLLGGGGGGGGGLL. Leptoglycin was able to inhibit the growth of Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Citrobacter freundii* with minimal inhibitory concentrations (MICs) of 8 µM, 50 µM, and 75 µM respectively, but it did not show antimicrobial activity against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* and *Enterococcus faecalis*), yeasts (*Candida albicans* and *C. tropicalis*) and dermatophytes fungi (*Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum*). No hemolytic activity was observed at the 2-200 µM range concentration. The leptoglycin is a linear peptide with a particular amino acid composition, characterized by high level of glycine (59.1%), leucine (36.4%) and a central proline. Further studies will be necessary to determine the secondary structure and the mechanism of action of this new and uncommon antimicrobial peptide of *Leptodactylus* genus. Taken together, these results suggest that this natural antimicrobial peptide could be a tool to develop new antibiotics.

*Keywords: Antimicrobial peptides, Leptoglycin, Leptodactylus pentadactylus, Gly/Leu-rich peptides.*



## 1. INTRODUÇÃO

Todos os organismos necessitam de proteção contra microorganismos patogênicos e sua habilidade de se prevenir de infecções acredita-se ser dependente de sua resposta imune inata. A imunidade natural é a primeira linha de defesa contra as infecções, é o mecanismo de defesa filogeneticamente mais antigo contra microorganismos e está presente em todos os organismos multicelulares, incluindo plantas e invertebrados (ver revisão Kimbrell e Beutler, 2001).

A resposta imune inata é relativamente não específica, entretanto é capaz de reconhecer estruturas características de patógenos microbianos através de receptores de reconhecimento de padrões que detectam substâncias produzidas por microorganismos (padrões moleculares associados a patógenos – PAMPs), como por exemplo, lipopolissacarídeos e peptidoglicano produzido por bactérias,  $\beta$ -1,3-glucano produzido por fungos e fosfoglicano por. Através desse mecanismo o sistema imune inato proporciona um “aviso” de qual tipo de microorganismo está causando a infecção (por exemplo, bactérias ou vírus), desse modo, ela influencia no tipo de resposta imunológica adquirida (imunidade exclusiva de vertebrados) que se desenvolve, influenciando a natureza das respostas adquiridas para torná-las mais eficazes contra diferentes tipos de microorganismos (ver revisão Kimbrell e Beutler, 2001).

Os efetores da resposta imune tradicionalmente incluem barreiras epiteliais, células circulantes tais como células fagocitárias (como os neutrófilos e macrófagos) células leucocitárias (como os mastócitos) e proteínas de complementos. Muitas dessas estruturas, epitélios e leucócitos, produzem

peptídeos que possuem função antimicrobiana (ver revisão Brogden, 2005). Durante as últimas décadas, tem sido encontrado em todos os tipos de organismos vivos a produção de um grande número desses peptídeos antimicrobianos (AMPs- *antimicrobial peptides*), que possuem uma função importante na imunidade inata em resposta a invasão de microrganismos (ver revisão Brogden, 2005; Brown e Hancock, 2006).

Os AMPs são sintetizados e prontamente liberados depois de uma infecção para rapidamente neutralizar um amplo espectro de microrganismos. A maioria dos peptídeos antimicrobianos testados, independente se sua seqüência, tamanho, carga, composto por L- ou D- aminoácidos e estrutura, a bactéria morre a micromolar concentrações e seu mecanismo de ação não é mediado por receptores (Dathe e Wieprecht, 1999). Numerosos estudos indicam que muitos desses peptídeos agem diretamente sobre a bicamada da membrana de suas células alvos (Marcotte, et al., 2003). Entretanto, alguns peptídeos atravessam a membrana e induzem a morte celular por ativação de um ou mais alvos intracelulares (ver revisão Brogden, 2005; Brown e Hancock, 2006).

### **1.1 Indução, regulação e expressão**

Peptídeos antimicrobianos em organismos multicelulares podem ser encontrados em superfícies epiteliais tais como na pele e no fígado e são seqüestrados por neutrófilos para serem liberados para matar microrganismos (Zasloff, 2006). Muitos desses peptídeos são sintetizados constitutivamente, como por exemplo, as histidinas (Tsai e Bobek, 1998) e a  $\beta$ -defensinas humanas 1 (Yang et al., 2002). Outros são muitas vezes induzidos em resposta a uma infecção

(Hoffmann et al., 1999) e esses são considerados proteínas de fase aguda, tais como, LL-37 (Frohm et al., 1997) e a  $\beta$ -defensina humana 2 (Harder et al., 2000).

O grande número de peptídeos antimicrobianos sintetizados por organismos multicelulares é codificado pelo genoma. Insetos e mamíferos tipicamente expressam peptídeos antimicrobianos. Por exemplo, pelo menos 10 genes de ovelha codificam peptídeos antimicrobianos, incluindo oito catelicidinas e duas  $\beta$ -defensinas (Huttner et al., 1998). O genoma bovino contém genes para pelo menos 10 catelicidinas (Scocchi et al., 1997) e mais de 20 para  $\beta$ -defensinas (Ryan et al., 1998). Os peptídeos antimicrobianos são produzidos principalmente através de processos regulados pela transcrição de genes e pela translação ribossomal, seguido por um processo proteolítico (Moffitt e Neilan, 2000). As magaininas são sintetizadas como pré-pro-proteínas contendo seis cópias do peptídeo. O processo proteolítico conduz a liberação do peptídeo magainina individual. As cecropinas de insetos são sintetizadas como pré-proteínas de 62 aminoácidos e o processamento envolve a atividade de várias proteases (Gudmundsson et al., 1991). Interessantemente, em alguns casos de peptídeos catiônicos tais como as temporinas, a carga negativa da carboxila terminal é removida pelo processo de amidação (Simmaco et al., 1996). Vários peptídeos antimicrobianos são liberados pela clivagem de proteínas intactas que podem não ter ou se limitem a atividade antibacteriana e esses peptídeos são denominados de cripeptídeos (Bellamy et al., 1992; Pimenta e Lebrum, 2007; Someya, 2007). A clivagem proteolítica de proteínas bovinas intactas pela pepsina sob condições ácidas libera um peptídeo de 25 resíduos, lactoferrina B, que apresenta um aumento significativo de seu potencial bacteriostático quando comparado a proteína intacta (Bellamy et al., 1992).

## 1.2 Atividade Biológica dos Peptídeos Antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos exibem uma capacidade, *in vitro*, de matar rapidamente microrganismos (depois de alguns minutos) e possuem um amplo espectro de atividade contra vários alvos (Zaiou, 2006), incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Fernandez-Lopez et al., 2001; Zasloff, 2002), fungos (Lee et al., 1995; Fehlbaum et al., 1996; Kieffer et al., 2003; Gomes et al., 2005), parasitas (Huang et al., 1990; McGwire et al., 1993; Arrighi et al., 2002), vírus (Tamamura et al., 1998; Robinson et al., 1998; Cole et al., 2002; Zhang et al., 2002) e células tumorais (Cruciani et al., 1991; Baker et al., 1993; Rozeck et al., 2000; Chen et al., 2001; Lindholm et al., 2002). A ação dos peptídeos antimicrobianos não é limitada a exclusivamente matar microrganismos. Além disso, eles possuem uma impressionante variedade de adicionais efeitos biológicos importantes para respostas inflamatórias, imunidade inata e imunidade adaptativa (Hancock e Diamond, 2000; Brown e Hancock, 2006).

Peptídeos antimicrobianos podem exibir uma seletividade contra diferentes microrganismos. Por um lado, muitos peptídeos apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (Miyasaki e Lehrer, 1998). Por outro lado, alguns peptídeos, tais como as defensinas de insetos (Meister et al., 1997) preferencialmente matam bactérias Gram-positivas, enquanto outros preferencialmente matam bactérias Gram-negativas, tais como apidaecina (Casteels e Tempst, 1994), drocosina (Bulet et al., 1996) e cecropina P1 (Boman et al., 1991). Peptídeos que matam preferencialmente fungos têm sido descritos, tais como drosomicina (Meister et al., 1997) e peptídeos antimicrobianos de plantas (Tailor et al., 1997).

Normalmente células humanas são resistentes, mas tem sido mencionado que certos peptídeos antimicrobianos catiônicos, tais como a melitina de abelhas (Perez-Paya et al., 1994), mastoparina de vespa (Delatorre et al., 2001), caribdotoxina de escorpiões (Tenenholz et al., 2000), e temporina L de rãs (Zhao ET AL., 2002) são potentes toxinas contra células humanas.

Os peptídeos antimicrobianos, magaininas e seus análogos, são capazes para lisar tumores hematopoéticos e células de tumores sólidos, com pequeno efeito tóxico em linfócitos normais do sangue (Cruciani et al., 1991; Baker et al., 1993). A taquipesina é um peptídeo antimicrobiano presente em leucócitos de “caranguejo cavalo” (*Tachypleus tridentatus*, Hirakura et al., 2002). A taquipesina sintética inibe a proliferação de culturas tumorais e de células endoteliais pela destruição de suas membranas e indução de apoptose (Chen et al., 2001). A temporina L, um peptídeo de 13 aminoácidos isolado da pele da rã vermelha européia, *Rana temporaria*, induz necrose em células tumorais (Rinaldi et al., 2001). Ciclotídeos, membro do grupo de peptídeos cistinas-macroscíclicas exibem atividade antibacteriana, anticâncer e antiviral (Lindholm et al., 2002). O perfil de atividade dos ciclótídeos difere significativamente das drogas antitumorais em uso clínico o que pode indicar um novo modelo de ação anticâncer (Lindholm et al., 2002). Outros peptídeos antimicrobianos, tais como as defensinas (Kagan et al., 1990), cecropina (Moore et al., 1994), lactoferricina e lactoferrina (Yoo et al., 1998) também possuem similar atividade antitumoral.

Vários peptídeos catiônicos também apresentam atividade antiviral *in vitro*. Defensinas são capazes de neutralizar e vírus simples da herpes, vírus estomatitis vesicular e vírus influenza (Daher et al., 1986; Ganz e Lehrer, 1995). Taqueplesinas e polifemusinas são ativos contra vírus vesicular stomatitis, vírus

influenza A e HIV (Tamamura et al., 1996). Melitinas e cecropinas (Wachinger et al., 1998), e indolicidina (Robinson et al., 1998) também apresentam atividade anti-HIV.

Em geral, o mecanismo de ação antiviral acontece através da interação direta desses peptídeos com o envelope do vírus, principalmente pela permeabilização do envelope e, eventualmente, lise da partícula viral, semelhante ao modelo de formação de poro que é sugerido para atividade antibacteriana. Outro mecanismo de ação antiviral tem sido proposto, o peptídeo T22, derivado da polifemusina II, inativa o vírus do HIV-1 *in vitro* pela ligação a proteínas do vírus e ao receptor CD4 das células T- auxiliares bloqueando a fusão vírus-célula no primeiro estágio da infecção (Tamamura *et al.*, 1996). Melitina e cecropinas têm sido capazes de inibir a replicação do HIV-1 pela supressão de genes virais (Wachinger *et al.*, 1998).

### **1.3. Diversidade dos peptídeos antimicrobianos**

Milhares de peptídeos antimicrobianos têm sido isolados de diversos organismos e possuem diferentes espectros de atividades, entretanto a estrutura desses peptídeos possui propriedades comuns. Eles são geralmente compostos de 10 - 50 aminoácidos (mais comuns os L-aminoácido), na sua maioria são carregados positivamente e possuem cerca de  $\geq 30\%$  de resíduos hidrofóbicos. Essas propriedades permitem que o peptídeo assuma uma estrutura anfifílica proporcionando a interação do peptídeo com membranas (Bomam, 2003; Hancock, 2001; Hancock e Sahl, 2006).

A diversidade de peptídeos antimicrobianos descobertos gera uma dificuldade de classificá-los, sendo assim determinadas classificações sugerem agrupá-los de acordo com sua composição de aminoácidos e estrutura secundária. Portanto, é comum classificar os peptídeos antimicrobianos em três grupos de acordo com sua estrutura (Hancock e Leher, 1998; Sitaram e Nagaraj, 2002; Bullet et al., 2004; Reddy et al., 2004; Brogden, 2005;

**Grupo I: Peptídeos lineares com uma estrutura de  $\alpha$ -hélice.** É uma classe amplamente estudada e é formada de peptídeos antimicrobianos catiônicos que assumem estrutura de  $\alpha$ -hélice, tais como a magainina, cecropina, temporinas (Zasloff, 1987; Boman, 1993; Mangoni et al., 2000). A hélice anfipática é uma região de muitas proteínas e peptídeos que se liga a membranas, essa região é formada por uma cadeia linear de aminoácidos com a presença de cerca de três a quatro resíduos polares e apolares. Essa estrutura, formada por um lado polar e pelo lado oposto da hélice constituído por resíduos hidrofóbicos, proporciona a interação do peptídeo com a estrutura anfifílica das membranas biológicas (Dathe e Wieprecht, 1999). Esses peptídeos não adotam uma estrutura preferencial em solução aquosa, enquanto dobram-se em conformação  $\alpha$ -hélice sob interações com solventes hidrofóbicos ou superfícies lipídicas. Estudos demonstram que o aumento da helicidade do peptídeo está diretamente relacionado com o aumento da sua atividade antimicrobiana. Isso é geralmente demonstrado pela substituição de aminoácidos na estrutura do peptídeo, tais como foi realizado com a metilina, magainina, buforina II, dentre outros. A maioria dos peptídeos anfipáticos que forma  $\alpha$ -hélice são catiônicos e exibem seletiva toxicidade por microrganismos. Peptídeos que não são catiônicos exibem baixa seletividade contra microrganismos. Entretanto, estudos comprovam que o

aumento do grau da helicidade e/ou anfipacidade está correlacionado com o aumento da toxicidade contra células compostas por fosfolípídeos neutros (Dathe e Wieprecht, 1999; Yeaman e Yount 2003). Outro aspecto interessante, é que os AMPs com estruturas lineares simples estão mais propensos a serem inativados por bactérias pela produção de peptidases e proteases que degradam esses peptídeos, como por exemplo, a LL-37 que é relativamente susceptível a proteólises e a proteases de bactérias. Proteases de *S. aureus* (V8 e aurelisina) inativam a LL-37 e contribuem para a sobrevivência da bactéria durante a exposição a esse peptídeo antimicrobiano (ver revisão Peschel e Sahl, 2006).

**Grupo II. Peptídeos lineares caracterizados por uma super representação de um ou mais aminoácidos.** Certos peptídeos antimicrobianos têm uma não usual composição de aminoácidos, tendo uma seqüência que é rica em um ou mais aminoácidos específicos. A estrutura conformacional de tais peptídeos é diferente das regulares  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha dos outros AMPs (Reddy et al., 2004). Esse grupo inclui, dentre outros, (1) peptídeos ricos em prolina (49%) e arginina (33%) ou prolina (57%) e fenilalanina (19%) produzidos por neutrófilos de porcos, chamados de PR-39 e a profenina, respectivamente; (2) peptídeos ricos em resíduos de histidina, como por exemplo, o peptídeo histidina, que é produzido na saliva de humanos e vários primatas, transloca-se através da membrana de levedura e age sob mitocôndria, sugerindo um não usual mecanismo antifúngico (ver revisão Sitaram e Nagaraj, 2002; Brogden, 2005); (3) peptídeos ricos em triptofano, como por exemplo, indolicidina (ILPWKWPWWPWR-amida) (Selsted, et al., 1992). A indolicidina foi relatada por adotar uma volta na sua conformação que aumenta fortemente sua atividade com membrana, além disso, ela permeabiliza a membrana externa de *E. coli* através da formação de canais. A



incomum composição de aminoácidos da indolicidina conduziu os estudos em direção a se entender a função dos múltiplos resíduos de triptofano em sua atividade biológica como também com as interações com modelos de membrana. Vários análogos da indolicidina têm sido sintetizados com o objetivo de se entender a necessidade de cargas como também a importância dos resíduos de Try e Pro para atividade desses peptídeos (Subbalakshmi et al., 2000); (4) peptídeos ricos em glicina, tais como a acanthoscurrina (Lorenzini et al., 2003), armadilina (Herbinier et al., 2005), peptídeos de defesa de plantas (Pelegri et al. 2008) e a leptoglicina (descrita no presente trabalho).

**Grupo III: Classificação restrita a conformação dos peptídeos que predominantemente forma de  $\beta$ -folhas conectadas por pontes dissulfeto intramoleculares.** Em contraste aos peptídeos lineares que formam  $\alpha$ -hélice, os peptídeos  $\beta$ -folhas são peptídeos cíclicos formados por pontes de dissulfeto, tais como as  $\beta$ -defensinas 2 humana (três pontes dissulfeto), taqueplesinas e protegrinas (duas pontes dissulfeto) e ranalexina, brevinina-1, gaegurinas e esculentinas (uma única ponte dissulfeto na extremidade C-terminal). Eles assumem a conformação  $\beta$ -folha em soluções aquosas que podem ser estabilizadas com interações com superfícies lipídicas. Estudos com análogos da taqueplesina na qual as cisteínas foram substituídas por resíduos de Ala, demonstrou que a estrutura cíclica foi essencial para atividade antimicrobiana. Entretanto está pode não ser tão importante para a permeabilização do peptídeo na membrana. Pouco é conhecido sobre o mecanismo dessa classe de peptídeos antimicrobianos. O peptídeo taquipesina, que tem uma estrutura  $\beta$ -folha antiparalela cíclica se mantém juntas por duas pontes de dissulfeto e permeabilizam membranas de bactérias e lipídicas artificiais. Ela também

transloca-se através da camada lipídica associado com formação de poros transientes, sugerindo um modo de ação similar como as magaininas que formam  $\alpha$ -hélice. Um importante parâmetro associado com a ação antimicrobiana desse peptídeo parece ser a manutenção de certo balanço hidrofóbico e hidrofílico da molécula (ver revisão Sitaram e Nagaraj, 2002; Brogden, 2005). As defensinas são entre os peptídeos que formam  $\beta$ -folha os mais caracterizados. A estrutura rígida das defensinas proporcionada pela presença das três pontes disulfeto intramoleculares que estabiliza sua estrutura  $\beta$ -folha e reduz a flexibilidade do peptídeo. Embora as pontes disulfetos não sejam essenciais para atividade antimicrobiana das defensinas, elas conferem ao peptídeo mais resistência à proteólise (Peschel e Sahl, 2006).

#### **1.4. Principais Parâmetros Modular Atividade e Seletividade dos Peptídeos Antimicrobianos**

A mais interessante propriedade de peptídeos antimicrobianos é sua especificidade celular pela qual eles matam células microbianas, mas não são tóxicos a células de mamíferos. A relativa insensibilidade de peptídeos antimicrobianos a células eucariotas é geralmente atribuída às diferenças na composição de lipídios entre as células eucariotas e procariotas (Dathe e Wieprecht, 1999; Matsuzaki, 1999). Na sua maioria, os peptídeos antimicrobianos são caracterizados por apresentar uma carga líquida variando entre +2 e +9. A cationicidade é indiscutivelmente importante a interação eletrostática inicial do peptídeo com fosfolipídeos carregados negativamente das membranas de bactérias e de outros microrganismo, que são diferentes da superfície

zwitteriônica das células normais de mamífero (Yeaman e Yount, 2003). Dentre outros fatores a hidrofobicidade do peptídeo também é um importante fator para interação do peptídeo com membranas. Hidrofobicidade é definida pela percentagem de resíduos hidrofóbicos do peptídeo, que é aproximadamente cerca de 50% na maioria dos peptídeos antimicrobianos. A hidrofobicidade é necessária para a permeabilização do peptídeo na membrana. Entretanto o aumento dos níveis da hidrofobicidade está fortemente correlacionado com toxicidade de células de mamífero e diminui a atividade antimicrobiana específica (Dathe and Wieprecht, 1999; Yeaman e Yount, 2003). Outro ponto importante é que o potencial de membrana em células carregadas negativamente é menor em células eucariotas do que em procariotas e tem uma importante função na sua seletividade (Matsuzaki, 1999). Células tumorais possuem uma parte de seus lipídios assimétricos e, portanto exibem um caráter mais aniônico no folheto externo de sua membrana plasmática, que preferencialmente se liga a peptídeos antimicrobianos catiônicos (Utsugi et al., 1991). Além disso, a seletividade de alguns peptídeos antimicrobianos com afinidade a células tumorais tem sido sugerida ser devido à alta negatividade do potencial de membrana através a membrana citoplasmática de muitos tipos de células cancerosas (Utsugi et al., 1991).

### **1.5. Mecanismo de Ação dos Peptídeos Antimicrobianos**

Numerosos estudos demonstram que os peptídeos antimicrobianos agem diretamente sobre a bicamada da membrana de suas células alvos (Marcotte, et al., 2003). Vários mecanismos de permeabilização de membrana são descritos na literatura. A membrana pode ser destruída via formação de poros. Peptídeos podem formar poros através de mecanismos “barrel-stave”, formação de canais de íons específicos, ou de acordo com o modelo toroidal (Brogden, 2005). Entretanto, alguns peptídeos atravessam a membrana e induzem a morte celular por ativação de um ou mais alvos intracelulares (ver revisão Brogden, 2005; Brown e Hancock, 2006). A Tabela 1 relaciona alguns peptídeos e seus respectivos mecanismos de ação.

A interação dos peptídeos antimicrobianos com membrana altera a organização da bicamada e permite sua permeabilidade, causando a despolarização da membrana (Matsuzaki et al., 1997; Kourie e Shorthouse, 2000). Os peptídeos antimicrobianos, em geral, interagem com membranas através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas (El Amri et al., 2006).

**Tabela 1. Mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos.** Peptídeos antimicrobianos matam ou lisam a células através de interações com membranas ou por meio de alvos intracelulares

<b>Modelo de mecanismo de ação</b>	<b>Exemplos de Peptídeos</b>
<b>Mecanismo de formação de poro transmembranar</b>	
Poros toroidais	Magainina 2, protegrina -1, metilina e LL-37.
Carpete	Dermaseptina S, cecropina, metilina e caerina 1.1
“Barrel stave”	Alameticina
<b>Mecanismo de morte celular através de alvos intracelulares</b>	
Floculação de componentes intracelulares	Peptídeos aniônicos
Alteração na formação de septo na membrana citoplasmática	PR-39, PR-26 e indolicidina
Inibição de caminhos de síntese da célula	Mersacidina
Ligação com ácidos nucleicos	Buforina II e taqueplesina
Inibição da síntese de ácidos nucleicos	Dermaseptina, PR-39, HNP-1, -2 e indolicidina
Inibição da síntese de proteínas	Dermaseptina, PR-39, HNP-1, -2 e indolicidina
Inibição da atividade enzimática	Histidinas, pirrocoricina, drosocina e apidaecina

Tabela adaptada - Brogden, 2005

## 1.6. Diversidade de Organismos que Produzem Peptídeos Antimicrobianos

### 1.6.1 Peptídeos de Defesa de Plantas

Proteínas de plantas têm demonstrado atividade contra bactérias e fungos e estas usualmente possuem um papel chave na defesa das plantas, protegendo-as de fitopatógenos (Selitrennikoff et al., 2001). As plantas expressam peptídeos antimicrobianos tipo o de animais, tais como, defensinas e tioninas que agem em resposta a invasão de microrganismos (Schroder, 1999; Dangl e Jones, 2001), além dessas podemos incluir lectinas, ciclotídeos, proteínas relacionadas à patógenos, etc. (Pelegriani e Franco, 2005).

Um novo grupo de moléculas de defesa das plantas com atividade contra bactérias e fungos são as proteínas e peptídeos ricos em glicina (GRPs – *glycine rich proteins* ou *peptides*). Elas foram primeiramente descritas como proteínas de estoque, pois estas são úteis para as plantas como fonte de resíduo de aminoácidos essenciais (Mousavi et al., 2005). As GRPs podem ser caracterizadas pela sua alta percentagem de resíduos de glicina em sua estrutura primária (Mousavi et al., 2005). As GRPs podem ser classificadas em três diferentes grupos de acordo com a quantidade de glicina em sua estrutura. O primeiro grupo é formado por proteínas que possuem mais de 70% de resíduos de glicina em sua estrutura primária, tais como as GRPs de *A. thaliana* e *Brassica napus* (Ringli et al., 2001). Esse grupo inclui proteínas que se ligam ao RNA caracterizadas por possuírem conservados domínios conhecidos como RRM (RNA recognition motifs) e possuem uma alta afinidade com RNA (Nomata, et al., 2004). Entretanto os domínios ricos em glicina do C-terminal dessas proteínas

são importantes para a atividade de ligar ao RNA (Hanano et al., 1996). O segundo grupo possui pequena quantidade de resíduos de glicina como exemplo as proteínas do tomate (Ringli, 2001). O terceiro grupo de GPRs inclui proteínas que contem alta quantidade de glicinas, mas não possuem a presença de domínios ricos em glicina (Ringli, 2001). As GRPS são geralmente mais hidrofóbicas do que hidrofílicas, com resíduos de tirosina e fenilalanina (Ringli, 2001). Estudos anteriores revelaram que os genes da GPRS são principalmente encontrados em tecidos vasculares especialmente no xilema, em troncos e pecíolos (Keller et al., 1988). A expressão dos genes GRPS pode ser induzida por vários fatores incluindo físico (frio, luz, ferimentos), químicos (hormônios), biológicos (patógenos, desenvolvimento e ritmo circadiano) (Condit e Meagher, 1987) e germinação e crescimento da semente sob condições de estresse, tais como desidratação (Kwak et al., 2005), indicando que as GRPs possuem também uma importante função nos processos celulares (Ringli, 2001).

A atividade fungicida contra um número de fungos fitopatogênicos tem sido observada em GRPs, como nas proteínas isoladas de *Triticum kiharae* que apresentam atividade fungicida contra *Helminthosporium sativum* e *Fusarium culmorum* (Egorov et al., 2005). Estudos recentes demonstram que as proteínas de GRP possuem uma importante função nos mecanismo de defesa das plantas (Pelegri, 2005). É provável que essas funcionem como moléculas de estoque quando não são requeridas para a defesa da planta como componentes antimicrobianos.

### **1.6.2 Peptídeos Antimicrobianos de Invertebrados**

O sistema de defesa dos invertebrados em geral se distingue dos vertebrados devido à ausência de uma memória imunológica e de imunoglobulinas, moléculas que apresentam alta especificidade contra invasores (Hoffmann, et al., 1999). Portanto, os invertebrados desenvolveram um eficiente mecanismo de defesa contra infecções causadas por microrganismos através da produção de potentes peptídeos e polipeptídeos antimicrobianos (ver revisão Bulet et al., 1999). Vários AMPs tem sido isolados e caracterizados de invertebrados incluindo insetos, aracnídeos (tais como aranhas e escorpiões), crustáceos e moluscos (Bulet et al., 2004). A biogênese dos AMPs em invertebrados ocorre diferentemente dependendo do organismo. Por exemplo, em insetos holometabólicos, os AMPs são produzidos predominantemente na gordura do corpo, funcionalmente equivalente ao fígado em mamíferos, sua síntese é induzida poucas horas depois da infecção e depois liberado na hemolinfa. Em contraste, nos insetos hemimetabólicos, os AMPs são estocados constitutivamente nos grânulos dos hemócitos e liberados na hemolinfa por exocitose (Lamberty et al., 2000). Em aracnídeos, como escorpiões e aranhas, os AMPs são estocados em glândulas de veneno (Conde et al., 2000) juntamente com um complexo de mistura de enzimas, neurotoxinas e componentes de baixo peso molecular. Esse veneno muitas vezes é utilizado na defesa do organismo contra predadores ou para adquirir alimento (Boevé, et al., 1995).

Boman e colaboradores em 1981 isolaram a cecropina, a primeira molécula de hemolinfa de insetos produzida em resposta ao um desafio bacteriano, secretada pela pupa do bicho de seda gigante *Hyalophora cecropia*.



Desde o primeiro relato mais de 60 cecropinas e moléculas tipo cecropinas foram isoladas da hemolinfa de espécies de Lepidoptera (gêneros *Hyalophora*, *Manduca*, *Bombyx*, *Hyphantria*, *Heliots*, etc.) e Diptera (gêneros *Drosophila*, *Aedes*, *Anopheles*, *Heloitis*, etc.) (ver revisão Bulet et al., 2004). As cecropinas são constituídas de 29-42 resíduos de aminoácidos, predominantemente caracterizados por um N-terminal básico e um C-terminal amidado que contribui para o aumento da estabilidade e cationicidade da molécula, resultando uma melhor eficiência do peptídeo (ver revisão Sitaram e Nagaraj, 2002; Bulet et al, 2003). Além disso, são peptídeos lineares, anfipáticos, formam  $\alpha$ -hélice e possuem presença de um resíduo de triptofano na posição 1 ou 2 (ver revisão Bulet et al., 2004). As cecropinas possuem uma forte atividade antibacteriana predominantemente sobre bactérias Gram-negativas (ver revisão Sitaram e Nagaraj, 2002), embora em alguns casos tenha atividade sobre bactérias Gram-positivas, como por exemplo, as pequenas cecropinas, isoladas de espécies do gênero *Bombyx*, denominadas cecropinas D que não possuem o resíduo de triptofano resultando a favor da atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos (ver revisão Bulet et al., 2004). Elas são relativamente não tóxicas para células de mamíferos e insetos (ver revisão Sitaram e Nagaraj, 2002).

Outro peptídeo de inseto, a melitina, é o mais bem investigado peptídeo citolítico e utilizado como modelo de peptídeo para estudo de interações membrana-peptídeo (ver revisão Sitaram e Nagaraj, 2002; Bulet et al., 2004). A melitina é o principal componente do veneno da abelha *Apis mellifera* (Kreil, 1973). A melitina é caracterizada por um N-terminal hidrofóbico e uma hélice induzida pelo *motif* GXP seguido por um C-terminal amidado. A melitina causa lise de eritrócitos de diferentes espécies, possui atividade antimicrobiana contra

bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e contra fungos a micromolar concentrações e induz a liberação de histamina por mastócitos, dentre outras atividades (ver revisão Kuhn-Nentwig, 2003).

Dentre outros os peptídeos de invertebrados podemos incluir representantes de peptídeos isolados de espécies da classe dos quelicerados, tais como as taquiplesinas e as polifemusinas, peptídeos isolados de pequenos grânulos secretórios de hemócitos de *Tachypleus tridentatus* e *Limulus polyphemus*, respectivamente (ver revisão Bulet, 2004). Estes são peptídeos cíclicos com terminação aberta, são compostos de 17-18 resíduos de aminoácidos, possuem um C-terminal amidado e são carregados positivamente. Além disso, possuem atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e uma forte atividade contra leveduras. As taquiplesinas são ativas contra HIV-1 e são altamente hemolíticas (ver revisão Bulet et al., 2004).

Em aracnídeos, podemos citar um AMP nomeado como gomesina isolado da aranha *Acanthoscuria gomesiana*, que apresenta forte similaridade (50%) com a taquiplesinas e a polifemusinas. A gomesina é um peptídeo de 18 resíduos de aminoácidos, apresentando quatro resíduos de cisteínas envolvidos em duas pontes dissulfetos, um ácido piroglutâmico na extremidade N-terminal, e uma arginina  $\alpha$ -amidada no C-terminal. A gomesina possui notável espectro de atividade biológica, apresentando forte atividade bacteriana (Gram-positiva: 0,2 - 12,5 $\mu$ M e Gram-negativa: 0,4 - 6,25 $\mu$ M), como também inibe o desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras incluindo patógenos humanos de interesse clínico, em baixas concentrações (0.4-25  $\mu$ M). Ela também afeta a viabilidade de parasitas, como *Leshmania amazonensis* e apresenta uma moderada atividade hemolítica sobre eritrócitos (Silvia et al., 2000). Outro peptídeo importante isolado

a partir de hemócitos da aranha *A. gomesiana* é a acanthoscurrina, um peptídeo rico em glicina (70% de glicina) e possui forte efeito bactericida sobre bactérias Gram-negativas (5,6  $\mu\text{M}$ ) e fungicida (2,36  $\mu\text{M}$ ) (Lorenzini et al., 2003).

### **1.6.3. Peptídeos Antimicrobianos de Vertebrados**

Em vertebrados, os AMPS foram isolados e caracterizados de diversas fontes, tais como, pele de anfíbios (Espamer e Melchiorri, 1980; Rinaldi, 2002; Apponyi et al., 2004; Pukala et al., 2006); muco da pele e mucosa intestinal de peixes (Bulet et al., 2004) ; plasma seminal, trato urinário e colo de mamíferos (Levy, 2001; Hancock, 2001; Sitaram e Nagaraj, 2002; Chromek et al., 2006; Zasloff, 2006

Diversos peptídeos antimicrobianos têm sido isolados de diferentes espécies de peixes, tais como as (1) pardaxinas isoladas da superfície mucosa da pele dos peixes *Pardachirus marmoratus* e do peixe do Pacífico Ocidental *P. pavonimus*, são peptídeos lineares, possuem duas hélices ligadas por uma prolina, são efetivos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas a concentrações em micromolar e tem uma fraca atividade hemolítica; (2) HFIAPs – *hagfish intestinal AMPs*, é um grupo de peptídeos catiônicos que tem atividade de permeabilizar membrana. Sua biosíntese acontece em células hematopoéticas dentro da submucosa intestinal. Elas exibem potente e amplo espectro de atividade bactericida, mas não possui atividade hemolítica *in vitro*; (3) A parasina, isolada da mucosa da pele do peixe bagre *Parasiburus asotus*, é um peptídeo de 19 resíduos de aminoácidos que possui uma atividade antimicrobiana mais potente que a magainina 2, peptídeo antimicrobiano isolado de anfíbio, contra um amplo

número de microrganismos e não possui atividade hemolítica aparente (ver revisão Bulet et al., 2004).

Em mamíferos, diversos peptídeos antimicrobianos têm sido isolados e caracterizados, tais como as seminalplasminas, LL-37(catelecidinas), indolicidina, BPI, defensinas, dentre outras (Braff et al., 2005).

Peptídeos antimicrobianos têm sido caracterizados a partir do trato reprodutivo de vários animais, tais como a seminalplasmina, isolada do plasma seminal de bovinos e a LL-37, isolada de vários tecidos humanos incluindo o trato reprodutivo. A seminalplasmina (SPLN) é um peptídeo de 47 resíduos de aminoácidos, que exibe um amplo espectro de atividade antimicrobiana a micromolar concentrações e não possui atividade hemolítica contra eritrócitos. Embora possuam atividade antimicrobiana importante na proteção contra infecções, ela possui adicionais funções na fisiologia reprodutiva. As SPLN demonstram atividade regulatória do transporte de  $Ca^{2+}$  no espermatozóide, como também modula a zona pelúcida induzida pela reação acrosômica de espermatozóides de bovinos.

A LL-37 pertence ao grupo das catelecidinas, família de peptídeos antimicrobianos encontrados em mamíferos. A proteína catiônica antimicrobiana hCAP-18, proteína precursora da LL-37, é o único membro da catelecidinas encontrados em mamíferos (Larrick et al., 1994; Cowland et al., 1995). A LL-37 é expressa constitutivamente em epidídimos humanos (Andersson et al., 2002) e na medula óssea, mas é produzido em resposta a injúrias ou infecções na pele (ver revisão Sitaram e Nagaraj, 2002). A LL-37 é um peptídeo anfipático, forma  $\alpha$ -hélice, possui uma forte afinidade por lipopolissacarídeos, preferencialmente se liga aos grupos carregados negativamente da camada externa da membrana de

bactérias, tem um potente e amplo espectro de atividade antimicrobiana (Bals et al., 1998, ver revisão Sitaram e Nagaraj, 2002; Dann e Eckmann, 2007), incluindo bactérias do trato urinário de humanos (Chromek, et al., 2006).

A indolicidina é um pequeno peptídeo antimicrobiano catiônico rico em triptofano composto de 13 resíduos de aminoácidos (cinco triptofanos e três prolinas), isolado de neutrófilos bovinos, com uma não específica atividade biológica (Selsted, et al., 1992). Possui um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas com MICs de 4-64 µg/mL. A atividade antifúngica contra cepa de *Candida albicans*, *C. neoformans*, *C. utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* é relatada com MICs similares. O peptídeo possui atividade *in vitro contra* parasitas e contra o vírus HIV, causa lise em eritrócitos e é citotóxico para linfócitos T de ratos e humanos (ver revisão Sitaram e Nagaraj, 2002). Estudos com análogos da indolicidina demonstram que resíduos de triptofano são essenciais para atividade hemolítica, mas não para a atividade antibacteriana, enquanto análogos com apenas um resíduo de triptofano demonstram uma atividade antibacteriana específica (Subbalakshmi et al., 2000). Tais estudos sugerem que pequenos peptídeos antimicrobianos com *motifs* compostos por aminoácidos hidrofóbicos, com exceção do triptofano, intercalado com resíduos de prolina e aminoácidos catiônicos no N- e C-terminal podem favorecer a seletividade da atividade antibacteriana (Subbalakshmi et al., 2000).

A proteína catiônica BPI (*bactericidal/permeability-increasing*) é estocada principalmente em grânulos de neutrófilos. Possui um efeito seletivo bactericida, a concentrações de nanomolar, contra cepas de bactérias Gram-negativas. A seletividade da ação da BPI contra bactérias Gram-negativas é

atribuída a sua alta afinidade lipopolissacarídeos (LPS) principal componente da membrana das bactérias Gram-negativas (Levy, 2000; Dann e Eckmann, 2007).

As defensinas são importantes constituintes do sistema imune inato dos mamíferos na defesa contra microrganismos. As defensinas são principais componentes dos neutrófilos polimorfonucleados, mas elas podem também ser expressas em vários outros tecidos. São peptídeos catiônicos com três pares intramoleculares de pontes dissulfetos e formam estrutura de  $\beta$ -folha. As defensinas são classificadas em  $\alpha$ - e  $\beta$ -defensinas de acordo com a disposição das pontes dissulfetos em sua estrutura (White et al., 1995). *In vitro*, as  $\alpha$ - e  $\beta$ -defensinas são efetivas contra numerosas bactérias, leveduras e vírus. As defensinas também têm efeito tóxico sobre várias células normais e tumorais. (Levy, 2000; Bulet et al., 2004; Dann e Eckmann, 2007).

### **1.6.3.1 Peptídeos Antimicrobianos de Anfíbios**

Os anfíbios sintetizam em sua pele vários peptídeos antimicrobianos que os protegem contra microrganismos patogênicos. As glândulas serosas cutâneas dos anfíbios produzem peptídeos biologicamente ativos que são estocados em seus grânulos secretórios. Esses peptídeos antimicrobianos são liberados sobre a superfície da pele para promover uma efetiva e rápida ação de defesa (Delfino et al. 1998, Lacombe et al. 2000, Delfino et al. 2006).

Entre os anfíbios, diferentes peptídeos antimicrobianos têm sido isolados da secreção granular da pele de espécies vários gêneros de anuros (Espamer e Melchiorri, 1980; Spencer, 1992; Rinaldi, 2002; Apponyi et al., 2004; Pukala et al., 2006) entre os quais podemos destacar *Xenopus* (Ali, et al. 2001),

*Rana* (Rollins-Smith, et al., 2002; Basir e Conlon, 2003; Conlon et al., 2004; Won, et al. 2004; Iwamuro et al., 2006), *Litoria* (Rozek et al., 2000), *Ascaphus*, *Bombina* (Wang et al., 2005), *Bufo* (Park et al., 1996), *Hyla*, *Phyllomedusa* (Batista et al., 1999; Conceição et al., 2006) e *Leptodactylus* (Nascimento et al., 2004).

Embora a bombina tenha sido o primeiro peptídeo antimicrobiano isolado de anuro (*Bombina variegata*), a magainina, isolada da secreção da pele e da mucosa estomacal da rã africana *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987) tem sido o peptídeo antimicrobiano mais estudado. As magaininas (magaininas 1 e 2) são peptídeos lineares constituídos de 23 resíduos de aminoácidos, catiônicos, anfipáticos, hidrofóbicos e adotam conformação de  $\alpha$ -hélice (Soravia et al., 1988). As magaininas e seus análogos exibem atividade antibacteriana (sobre bactérias Gram-positivas e negativas), antifúngica, antiviral, anticâncer, induz lise osmótica de protozoários, e não exibe significativa atividade hemolítica contra eritrócitos (Soravia et al., 1988; Zasloff et al., 1988; Bessalle, et al., 1992; Lucca e Walsh, 2000; Avrahami e Shai, 2002; Sitaram e Nagaraj, 2002; Pukala et al., 2006). As magaininas causam lise nas bactérias penetrando na bicamada da membrana bacteriana por mecanismo de formação de poro (Matsuzaki, 1998; Matsuzaki, 1999).

O gênero *Rana* possui mais de 250 espécies distribuídas por todo mundo, com exceção das regiões polares e América do Sul (Conlon, et al., 2004). As espécies do gênero *Rana* possuem um extraordinário número de peptídeos antimicrobianos nas secreções de sua pele (ver Tabela 2). Mais de 400 peptídeos foram isolados até a presente data (Pukala, et al., 2006). Na sua maioria, esses peptídeos são catiônicos e contém uma ponte dissulfeto em sua estrutura. Dentre

estes, foram identificados mais de 200 peptídeos com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Pukala et al., 2006), tais como as brevininas-1 e -2, esculetinas-1 e -2, ranalexinas, ranateurinas-1 e -2, nigrocinas, gaegurina, etc. (Isaacson et al., 2002; Conlon et al., 2004; Kim et al., 2004). As brevininas-1 e -2 foram primeiramente isoladas do extrato da pele da rã japonesa *Rana brevipoda porsa* e os outros membros da família das brevininas-1 e -2 foram isolados de várias espécies de ranídeos distribuídos na América do Norte, Europa e Ásia. As brevininas-1 exibem forte potência contra cepas de bactérias Gram-positivas e negativas e fungos patogênicos, mas também possuem forte atividade hemolítica (Conlon, et al., 2004). Estudos demonstram que a ponte dissulfeto não é necessária para a forte atividade antimicrobiana das brevininas-1. Além disso, análogos da brevininas-1, com redução da amidação do C-terminal demonstram uma diminuição da atividade hemolítica sem afetar a sua propriedade antibacteriana. As brevininas-2 exibem atividade hemolítica mais leve dos que as brevininas-1 (Conlon, et al., 2004). Por outro lado, peptídeos antimicrobianos sem ponte dissulfeto foram isolados de espécies do gênero *Rana*, entre eles podemos incluir os bP peptídeos isolados da *Rana catesbeiana* e as temporinas isoladas de várias espécies de *Rana* (Pukala, et al., 2006). As temporinas, isolada das secreções da *R. temporaria* (Simmaco, et al. 1996), são pequenos AMPs constituídos apenas de 10 a 13 resíduos de aminoácidos, formam  $\alpha$ -hélice, são anfipáticos, hidrofóbicos, catiônicos (rede de carga +2), contém C-terminal amidado e sua atividade antibacteriana é restrita a bactérias Gram-positivas (Simmaco, et al. 1996; Mangoni, et al., 2000; Conlon, et al., 2004; Pukala, et al., 2006). A exceção é a temporina L, que apresenta um momento hidrofóbico elevado e rede de cargas +3, é ativa contra bactérias Gram-negativas, além de



possuir uma forte atividade hemolítica e citolítica contra várias linhagens de células tumorais humanas (Zhao, et al., 2002; Conlon, et al., 2004).

Diversos peptídeos têm sido isolados da secreção da pele de diferentes espécies de anfíbios australianos dentre eles podemos destacar os do gênero *Litoria* (Apponyi, et al., 2004). Os principais exemplos são as aureinas, citropinas, caerinas e as maculatinas. Esses peptídeos possuem um amplo espectro de atividade antimicrobiana e também são ativos contra células de linhagens de cânceres humanos (leucemias, melanomas, cânceres de ovário, colo, próstata e cabeça) (Rozek et al., 2000). Os mais ativos desses peptídeos anticâncer são a citropin 1.1 isolada da rã *Litoria citropa* e a caerina 1.1 isolada da *L. caerulea*, eles demonstram ser ativos contra todas as linhagens de tumor humano testadas a concentração de  $10^{-6}$ M e não causam lise em eritrócitos a tal concentração. Esses peptídeos são lineares, catiônicos, anfipáticos, formam  $\alpha$ -hélice e possuem um C-terminal amidado. Ambos demonstram significativa atividade contra bactérias Gram-positivas, mas possuem leve atividade sobre bactérias Gram-negativas. A caerina 1.1 também possui atividade fungicida e antiviral contra vírus envelopados (VanCompernelle et al., 2005). As caerinas 2, 3 e 4 isoladas de várias espécies do gênero *Litoria* demonstram uma atividade antibiótica limitada. Essas três moléculas demonstram ser ativas somente contra bactérias Gram-negativas e não possuem atividade anticâncer, entretanto podem possuir outras funções na pele do anfíbio, por exemplo, a caerina 2 inibe a produção de óxido nítrico. A caerina 2 é um peptídeo incomum do gênero *Litoria*, pois possui um C-terminal não amidado (Apponyi et al., 2004; Pukala et al., 2006).

Buforina é um peptídeo antimicrobiano linear de 39 resíduos de aminoácidos isolado do tecido estomacal do sapo asiático *Bufo bufo*

*gargarizans* (Park et al., 1996). Ela exibe um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra microrganismo que incluem bactérias Gram-positivas como também Gram-negativas e fungos em concentrações entre 4-8 $\mu$ g/mL. O tratamento da buforin I com endoproteases produz um peptídeo mais ativo de 21 resíduos, a buforina II. A buforina II é um peptídeo linear, anfipático, forma  $\alpha$ -hélice e é mais potente que a magainina. A buforina II mata uma ampla variedade de organismo a concentrações entre 1-4 $\mu$ g/mL, enquanto a magainina, sob similares condições, mata microrganismos com MICs entre 25-100 $\mu$ g/mL (ver revisão Sitaram e Nagaraj, 2002). Enquanto a magainina penetra na bicamada lipídica pela formação de poros transientes formados por complexos supramoleculares entre peptídeo e lipídeos e causando, em seguida, a destruição da membrana celular, a buforina II não mata células bacterianas causando lise, indicando que a membrana não é o alvo de ação das buforinas. Esse peptídeo transloca-se eficientemente através da membrana até o citoplasma sem causar perturbações na membrana e inibe o funcionamento celular pela sua ligação com DNA e RNA, causando uma rápida morte celular (Kobayashi, et al., 2000; Park, et al., 1998; Kobayashi, et al., 2004). Estudos com análogos da buforina II demonstram que a prolina central, da sua estrutura, possui uma função chave na translocação do peptídeo através da membrana da célula (Kobayashi, et al., 2000; Park et al., 2000; Kobayashi, et al., 2004).

Outro grupo de anuros, os hilídeos sintetizam em sua pele vários peptídeos pertencentes à superfamília das dermaseptinas. Esses peptídeos são derivados de precursores que demonstram uma pré-pró-sequência com o N-terminal altamente conservado e variações no domínio carboxi-terminal que corresponde a diferentes peptídeos com vários tamanhos, cargas e espectros

antimicrobianos (Vanhoye et al. 2003). Esses peptídeos têm sido nomeados individualmente e agrupados para formar distintas famílias baseados em suas características estruturais. Essas famílias incluem: (a) as dermaseptinas isoladas das rãs *Phyllomedusa sauvagei* e *P. bicolor*, são peptídeos anfipáticos, formam  $\alpha$ -hélice, possuem um resíduo de triptofano conservado na posição 3 e uma rede de cargas positivas atribuída presença de resíduos de Lys que pontua a alternância entre uma seqüência hidrofóbica e hidrofílica (Vanhoye et al., 2004); (b) a dermaseptina S9, da *P. sauvagei*, é um peptídeo não anfipático que forma  $\alpha$ -hélice com um núcleo hidrofóbico cercado por ambos os lados terminais com vários resíduos carregados positivamente (Lequim et al., 2006), e (c) as plasticinas, também chamadas de DRPs (*dermaseptin-related peptides*), isoladas da pele de *Phyllomedusa bicolor*, *Pachymedusa dactinicolor*, *Agalychnis annae* e *A. callidryas*, esse peptídeos são ricos resíduos de aminoácidos Gly e Leu arranjados com regulares e repetidos *motifs* de cinco aminoácidos GXXXG (onde X é qualquer aminoácido) (El Amri e Nicolas, 2008).

Entre as plasticinas, DRP-PBN2 e DRP-PD 3-6 são peptídeos ortólogos isoladas da *P. bicolor* e *P. dactinicolor*, respectivamente, que diferem por 10 aminoácidos (56% de aminoácidos idênticos). Eles também diferem quanto a rede de cargas, o DRP-PBN2 contem duas cargas positivas dos resíduos de lisina. Essas lisinas são trocadas por asparagina e glicina no DRP-PD 3-6 gerando um peptídeo com carga líquida zero. As plasticinas compartilham características com outros peptídeos antimicrobianos da pele de anfíbios tais como as temporinas, bombinas e aureinas: eles são relativamente hidrofóbicos e carregados pobremente com o máximo de uma rede de carga +3, como por

exemplo, a DRP-PBN2 (Vanhoye et al., 2004; El Amri et al., 2006; El Amari ET AL., 2007; El Amri e Nicolas, 2008).

Outra importante família de peptídeos antimicrobianos de anfíbios são os AMPs isolados da secreção granular da pele espécies do gênero *Leptodactylus* que tem sido alvo de diversos estudos nos últimos anos.

### ***Peptídeos antimicrobianos isolados de espécies do gênero Leptodactylus***

O gênero *Leptodactylus* contém 64 espécies que são distribuídas na América do Sul, principalmente no Brasil e Antilhas (Frost, 2008). Análises bioquímicas utilizando secreções da pele de seis espécies de *Leptodactylus*, revelaram uma família de onze peptídeos antimicrobianos que tendem a adotar conformações de  $\alpha$ -hélice em um sistema que mimetiza a camada bipolar da membrana (King et al., 2005; Nielsen et al., 2007; Nascimento et al., 2007).

As ocelatinas 1, 2 e 3 foram os primeiros peptídeos antimicrobianos isolados de espécies do gênero *Leptodactylus*, esses AMPs foram caracterizados a partir da secreções cutâneas, obtidas através de estimulação elétrica, da pele de *L. ocellatus* (Nascimento et al., 2004). As ocelatinas constituem grupo de moléculas catiônicas de 21 a 25 resíduos de aminoácidos e possuem de 44 a 82% de similaridade entre si. Possuem C-terminal amidado que muitas vezes aumenta a atividade lítica do peptídeo, diminui a susceptibilidade do peptídeo a degradação por carboxipeptidases e estabiliza as conformações de  $\alpha$ -hélice. As ocelatinas inibem o crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* a milimolar concentrações e apresentam atividade hemolítica contra eritrócitos humanos (Nascimento et al., 2004). Um estudo recente caracterizou uma nova

ocelatina de *L. ocellatus*. A ocelatina 4 é diferente dos outros AMPs isolados da secreção de pele de rãs, ela é um peptídeo neutro em pH 7.0 e interage preferencialmente com membranas de células do sangue. Entretanto esse peptídeo apresentou atividade contra bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa *E. coli* a 64µM (Nascimento , 2007).

O peptídeo antibacteriano falaxina, isolado da rã *L. fallax* é um peptídeo formado por 25 resíduos de aminoácidos, fracamente carregado (+ 2,18 a pH 7.0) e possui um C-terminal amidado. O peptídeo demonstrou atividade contra várias cepas de bactérias Gram-negativas *E. coli* (40 µM), *Pseudomonas aeruginosa* (80 µM), *Klebsiella pneumoniae* (80µM) e *Enterobacter cloacae* (>160µM). O peptídeo não foi ativo contra bactéria Gram-positiva *S. aureus* e contra levedura *Candida albicans* e apresentou atividade hemolítica muito baixa (somente 10% de hemólise a uma concentração de 200µM) (Rollins-Smith et al., 2005).

Outro peptídeo, nomeado pentadactilina, purificado da secreção de pele *L. pentadactylus*. Apresentou atividade antibacteriana contra várias cepas de bactéria Gram-positiva (*S. epidermidis* - 100µM) e Gram-negativa (*E. coli* – 25 µM, *Enterobacter cloacae* - 50 µM, *P. aeruginosa* - 100 µM) e fraca atividade hemolítica (King et al., 2005). O peptídeo laticeptina (*L. laticeps*) (Conlon et al., 2006) apresentou atividade contra bactérias Gram-negativas e a sifaxina (*L. syphax*) (Dourado et al., 2007) apresentou forte atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e não possui efeito citolítico. Recentemente, os AMPs denominados ocelatina-V1, -V2 e -V3, foram isoladas da secreção da pele de *L. validus*. Esses peptídeos possuem baixa atividade antimicrobiana, provavelmente em consequência de sua baixa anfipacidade e

redução da cationicidade quando comparada com outros membros ativos de AMPs de espécies do gênero *Leptodactylus* (King et al., 2008).

Uma nova nomenclatura estabelecida por Conlon em 2008 tem sido proposta com o objetivo de padronizar terminologia dos AMPs lineares que forma  $\alpha$ -helice isolados de espécies do gênero *Leptodactylus*, levando em consideração de que esses peptídeos estão evolutivamente relacionados. Foi sugerida a utilização do nome das ocelatinas, por terem sido os primeiros AMPs de *Leptodactylus* a serem isolados e caracterizados, além de possuírem importantes semelhanças estruturais com os demais componentes da família. Dessa forma, os nomes foram mudados de falaxina por ocelatina-F1, pentadactilina para ocelatina-P1, laticeptina para Ocelatina-L1, sifacina por ocelatina-S1 e os peptídeos parálogos de *L. validus* foram nomeados como ocelatina-V1, -V2 e -V3.

A descoberta e o estudo de novas substâncias com propriedades antimicrobianas são importantes para o desenvolvimento de novas classes antibióticos, especialmente no contexto de crescimento a resistência microbiana a convencionais antibióticos. Portanto, a pesquisa, purificação, caracterização biológica e química de novas substâncias antimicrobianas proveniente da flora e fauna brasileira, são importantes, uma vez que a própria evolução tratou de selecionar um vastíssimo espectro de substâncias eficientes na defesa dos organismos contra infecções

## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

Isolar, purificar e caracterizar biologicamente e quimicamente novos peptídeos antimicrobianos da secreção da pele da rã sul americana *Leptodactylus pentadactylus* (Leptodactylidae).

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Realizar *screening* da secreção da pele de peptídeos *L. pentadactylus* para identificação de substâncias biologicamente ativas.
2. Identificar os picos com atividade antibacteriana e as frações com atividade antifúngica
3. Purificar em larga escala os peptídeos antimicrobianos identificados.
4. Determinar a seqüência de aminoácidos dos peptídeos antimicrobianos identificados.
5. Identificar a homologia dos peptídeos com moléculas já isoladas e previamente caracterizadas.
6. Determinar o suscetibilidade antimicrobiana dos peptídeos antimicrobianos contra várias cepas bactérias Gram-positivas e negativas e fungos.
7. Identificar a atividade hemolítica dos peptídeos antimicrobianos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

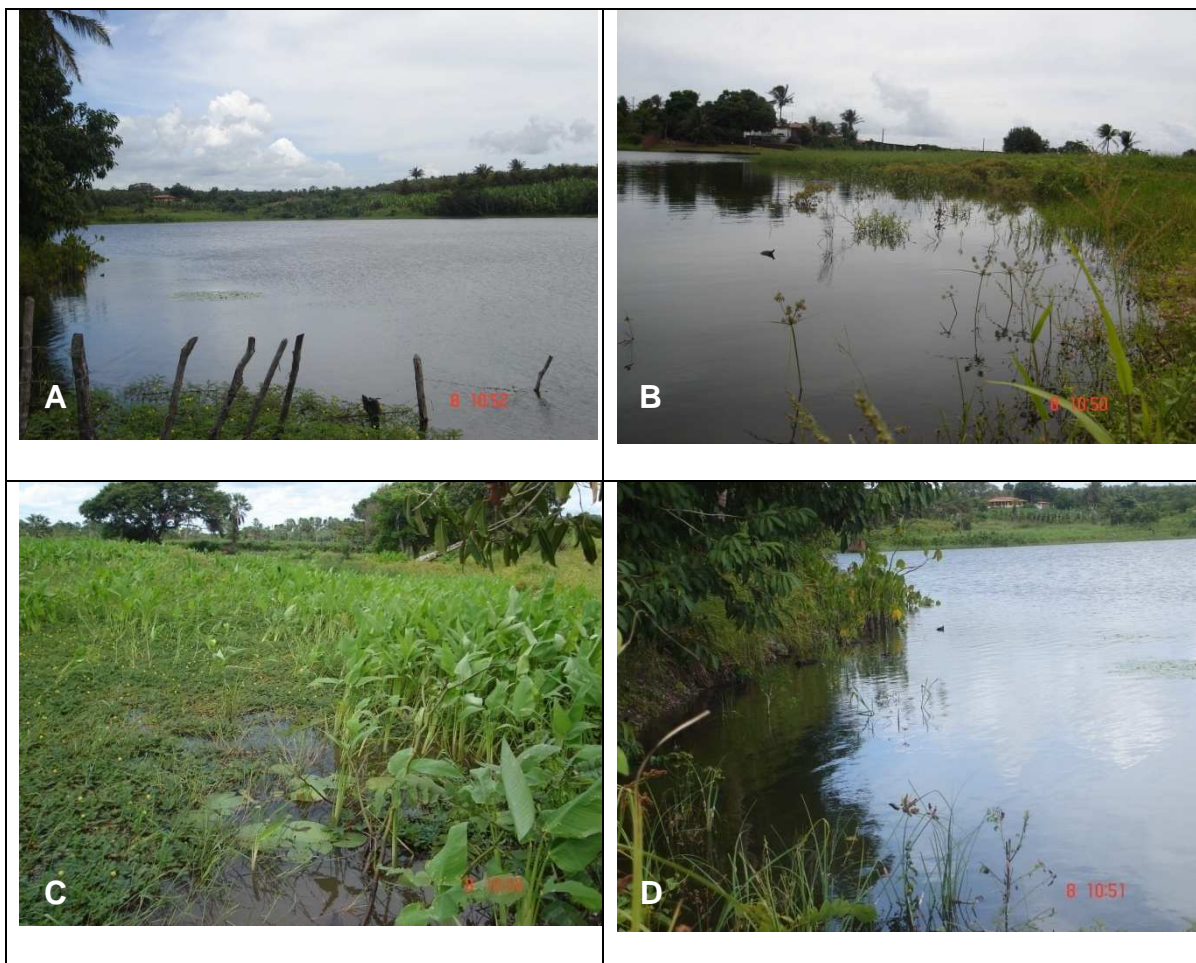
#### 3.1. Espécimes de *Leptodactylus pentadactylus* e caracterização ambiental do local de coleta

Espécimes adultos (n=8) de ambos os sexos da rã *Leptodactylus pentadactylus* foram coletados no município de Paraipaba localizado a nordeste do Estado do Ceará, na microrregião do Baixo Curu. O município dista cerca de 87 km da capital de Fortaleza.

A região é caracterizada por áreas de várzeas e as lagoas existentes nesta unidade geo-ambiental (Figura 1), geralmente têm caráter intermitente e são alimentadas por contribuições pluviais. As margens das lagoas geralmente são utilizadas para a atividade agropastoril, desprovida de cuidados conservacionistas e, portanto seguido de um processo de crescente degradação ambiental.

Os animais foram coletados nas regiões alagadas (Figura 1) durante o período chuvoso e estes foram levados ao Laboratório de Animais Peçonhentos (LAPE) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) onde foram mantidos em caixas individuais sob condições adequadas.





**Figura 1 – Caracterização da região de coleta de espécimes de rã *L. pentadactylus*. A e B.** A região é caracterizada por áreas de várzeas e as lagoas existentes geralmente com caráter intermitente. **C e D.** As margens das lagoas geralmente são os locais de coleta dos animais, que geralmente se camuflam entre troncos e a vegetação da região. As margens das lagoas geralmente são utilizadas para a atividade agropastoril, desprovida de cuidados conservacionistas e, portanto seguido de um processo de crescente degradação ambiental. É comum, depois de análise da água da lagoa, a presença de patógenos como coliformes fecais e outras bactérias oportunistas como *Pseudomonas sp.* Os animais foram coletados nas regiões alagadas durante o período chuvoso.

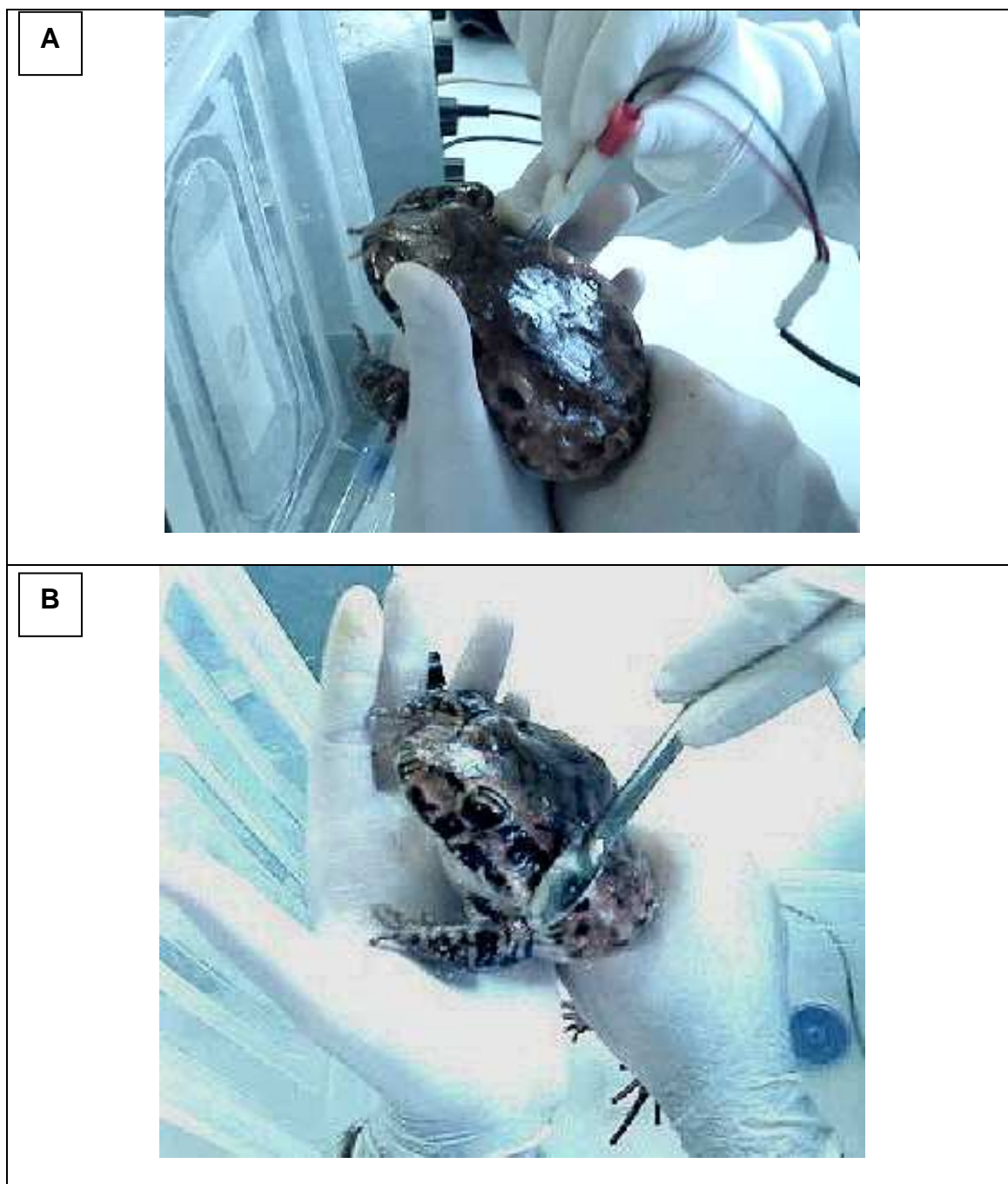
### 3.2. Imunização experimental das rãs *Leptodactylus*

Para a imunização experimental os animais foram submetidos a cinco diferentes tratamentos: T<sub>1</sub> = Animais controle; T<sub>2</sub>= Escarificações leves na pele (ES); T<sub>3</sub>= ES + 200 µl Adjuvante incompleto de Freud; T<sub>4</sub>= ES + 200 µl *Candida* sp.(10<sup>8</sup> UFC/ml) e T<sub>5</sub>= ES + 200 µl *Pseudomonas aeruginosa* (10<sup>8</sup> UFC/ml). O inoculo de cada tratamento foi injetado na região dorsal do animal. Os animais foram mantidos individualmente em caixas com alimentação regular.

### 3.3. Extração secreção da pele de *L. pentadactylus*

Os animais foram submetidos inicialmente à manipulação mecânica (ou estimulação mecânica - EM) no dia da imunização (D<sub>0</sub>) e nos dias seguintes ao mesmo (D<sub>3</sub>, D<sub>12</sub>, D<sub>26</sub>) para extração das secreções cutâneas. A secreção foi coletada em banho de gelo imediatamente congelada e em seguida liofilizada.

As estimulações elétricas, objetivando otimizar a liberação de secreção cutânea, foram realizadas a partir do vigésimo sexto dia. A partir daí, a secreção glandular da pele desses animais foi obtida, periodicamente, através de estimulação elétrica moderada (2-7V) (Figura 2). O exsudato foi coletado pela raspagem e lavagem da pele do dorso do animal com água bidestilada (Figura 2). Em seguida o material foi imediatamente congelado, liofilizado, pesado, aliqotado e estocadas a -25°C.



**Figura 2 - Obtenção da secreção glandular da pele de *L. pentadactylus* através de estimulação elétrica. A.** Estimulação elétrica moderada (2-7) no dorso do animal através de eletrodos. **B.** Obtenção do exsudato secreção glandular coletado pela raspagem e lavagem da pele do dorso do animal com água bidestilada.

### **3.9. Purificação da secreção de *Leptodactylus pentadactylus* e isolamento das substâncias bioativas**

#### **3.4.1 Obtenção do perfil cromatográfico da secreção da pele de *L. pentadactylus***

Inicialmente foi verificado o perfil cromatográfico das secreções. Alíquotas das secreções (5,0mg) foram dissolvidas em 200µl de etanol a 80% em água bidestilada acidificada (ácido trifluoracético (TFA) 0,05%). O sobrenadante, obtido por centrifugação a 5.000 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente, foi submetido a análise por RP-HPLC. Este foi aplicado em uma coluna cromatográfica analítica C<sub>18</sub> de fase reversa (2.5cm x 4.6mm, 5.0µm Sulpelco™) equilibrada com 100% de água bidestilada acidificada (0,1% TFA). A eluição ocorreu sob fluxo de 0,8ml/min, em gradiente de acetonitrila de 0-80% em 80 minutos. A absorbância do efluente foi monitorada 214 nm.

#### **3.4.2 Purificação dos peptídeos antimicrobianos**

A secreção da pele de *L. pentadactylus*, depois de liofilizada, foi ressuspendida (alíquotas de 40mg) em etanol 2,0mL de etanol a 80% em água bidestilada acidificada (ácido trifluoracético (TFA) 0,05%) (concentração final de 20mg/mL). O sobrenadante, obtido por centrifugação a 5.000 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente, foi submetido à purificação por RP-HPLC. A purificação por RP-HPLC foi realizada à temperatura ambiente utilizando-se o sistema HPLC Shimadzy utilizando coluna semi- preparativa C-18 (Shim pack

prep. 2,5 cm X 30 cm, 5.0 $\mu$ m), equilibrada em 0,1% (v/v) de TFA/água. A amostra foi eluída sob fluxo de 4.5 mL/min, em gradiente linear bifásico: inicialmente de 0 a 50% de acetnitrila (ACN) contendo 0,1% de TFA (solvente B) durante 150 minutos, seguido por 50 a 80% do mesmo solvente durante 10 minutos de acetnitrila. A absorvância do efluente foi monitorada pela a 214nm. As frações correspondentes aos picos foram coletadas manualmente, em seguida, foram congeladas e liofilizadas. A presença de atividade antimicrobiana nestas frações foi determinada por ensaio de zona inibição de crescimento bacteriano em cada etapa de purificação dos peptídeos.

Para análise da pureza dos peptídeos as frações com atividade antibacteriana foram analisadas por RP-HPLC utilizando-se uma analítica C<sub>18</sub> (2.5cm x 4.6mm, 5 $\mu$ m, Sulpelco<sup>TM</sup>), as eluições foram realizadas por gradientes de acetnitrila de 40 a 55% (35 min), sob fluxo constante de 1,0 mL/min e/ou por espectrometria de massa MALDI-TOF.

### **3.10. Caracterização Estrutural**

#### **3.5.1 Espectrometria de Massa**

As amostras purificadas por HPLC foram analisadas por espectrometria de massa, no Laboratório de Espectrometria de Massa do Instituto Butantan em São Paulo, Brasil.

A espectrometria de massa foi utilizada para: analisar a pureza das moléculas durante as etapas de purificação, avaliar a massa das moléculas que

apresentarem atividade antimicrobiana e identificar os fragmentos peptídicos após a hidrólise enzimática da molécula.

As análises feitas por espectrometria de massa tipo electrospray foram realizadas em um instrumento Q-TOF Ultima API (Micromass, Manchester, UK). As amostras foram analisadas em modo positivo, após injeção manual em um injetor Rheodyne e carreadas por uma bomba LC-10AD Shimadzu sob fluxo constante de 20 $\mu$ L/min em uma solução 50% acetonitrila, contendo 0,5% ácido fórmico. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi realizado pelo software MassLynx v 4.0. As deconvoluções dos espectros foram realizadas pelo módulo MaxEnt I deste software.

Para a espectrometria de massa tipo MALDI-TOF- MS (Matrix assisted laser desorption/ionisation – Time of flight- Mass spectrometry), as análises foram realizadas em um instrumento Ettan MALDI-ToF/Pro (Amersham Biosciences, Sweden). As amostras peptídicas, em solução, foram misturadas na proporção 1:1 (v:v) em uma fina camada de cristais de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (solução supersaturada de matriz para peptídeos) depositadas sobre a placa de amostragem (0,4 - 0,8  $\mu$ L), deixadas secar no ambiente e depois introduzida no espectrômetro para análise em modo positivo. Foi utilizado o modo automático de controle do equipamento e aquisição de dados do software. A calibração foi sempre externa, utilizando padrões de massa molecular correspondente à faixa de massa a ser analisada.

As amostras que apresentaram mais de uma fração foram repurificadas por um microHPLC Ettan microLC (Amersham), utilizando uma coluna C2/C18  $\mu$ RPC 1mm x 150 mm (Amersham), sob fluxo constante de 50  $\mu$ L/min, gradiente de 5 a 65 % em 60 minutos, monitorada por absorvância a 214 nm. Os solventes

utilizados foram ácido fórmico 0,5% em água (A) e acetonitrila 90% contendo 0,5% ácido fórmico (B). O microHPLC estava diretamente conectado ao espectrômetro de massas ESI-Q-TOF Ultima API (Micromass) e toda a amostra eluída foi introduzida na fonte de ionização, tipo electrospray. Foi gerado um cromatograma de íons correspondente a toda separação cromatográfica e aquisição de dados e processamento foi realizada pelo software MassLynx 4.0 (Micromass).

### **3.5.2. Redução e Alquilação**

O peptídeo purificado previamente e liofilizado foi submetido à redução e alquilação de acordo com Westermeier e Naven (2002). Uma alíquota do peptídeo foi dissolvida em 5µL de solução de ditioneitol (DTT) (5mM em 25mM de  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ ). A amostra foi mantida a 60° C durante 30 minutos. Após a incubação, foi adicionada a amostra, 5µL de solução de iodoacetamida (55mM em 25mM de  $(\text{NH}_4) \text{KCO}_3$ ), e incubada por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. O produto da reação foi analisado por MALDI-ToF/Pro (Amersham Biosciences, Sweden).

### **3.5.3. Clivagem enzimática – tratamento do peptídeo com Tripsina**

O peptídeo foi tratado com tripsina (2µL) (Westermeier e Naven, 2002) em 5 µl de  $(\text{NH}_4) \text{KCO}_3$ . A incubação foi realizada por 15 minutos a 37° C. O produto da reação foi analisado por MALDI-ToF/Pro (Amersham Biosciences, Sweden). Os fragmentos foram liofilizados e dissolvidos em fase móvel de uma

solução de acetonitrila (0,1% de ácido fórmico e purificados por um microHPLC Ettan microLC (Amersham), utilizando uma coluna C2/C18  $\mu$ RPC 1mm x 150 mm (Amersham), sob fluxo constante de 50  $\mu$ L/min, gradiente de 5 a 65 % em 60 minutos, monitorada por absorvância a 214 nm. Os solventes utilizados foram ácido fórmico 0,5% em água (A) e acetonitrila 90% contendo 0,5% ácido fórmico (B). O microHPLC estava diretamente conectado ao espectrômetro de massas ESI-Q-TOF Ultima API (Micromass) e toda a amostra eluída foi introduzida. Para o seqüenciamento *de novo* do peptídeo, o íon de interesse foi selecionado em uma janela e fragmentado por colisão induzida com gás argônio. O espectro dos fragmentos foi tratado pelo módulo MaxEnt III e depois analisado pelo módulo BioLynx de seqüenciamento *de novo* de peptídeos.

#### **3.5.4. Sequenciamento**

Para o seqüenciamento *de novo* do peptídeo, foi realizado em um instrumento Q-TOF Ultima API (Micromass, Manchester, UK). As amostras foram dissolvidas em fase móvel de solução de ácido fórmico 50:50 com 0,1% de acetonitrila e diretamente injetadas (10 $\mu$ L) utilizando um injetor Rheodyne 7010 carreadas por uma bomba LC-10A VP Shimadzu sob fluxo constante de 20 $\mu$ L/min. O íon de interesse foi selecionado em uma janela e fragmentado por colisão induzida com gás argônio. O espectro dos fragmentos foi tratado pelo módulo MaxEnt III e depois analisado pelo módulo BioLynx de seqüenciamento *de novo* de peptídeos.

Para a confirmação da seqüência de aminoácidos e identificar os aminoácidos Leu/Ile, o peptídeo foi submetido um seqüenciador automático de



pulso líquido (Shimadzu PPSQ-21) utilizando-se a degradação de Edman de acordo com as instruções do manual de fabricação.

### **3.11. Análise da Seqüência**

O alinhamento das seqüências foi realizado com ClustalW (Thompson et al., 1994). A filogenia foi analisada pelo programa MEGA4 (Kumar et al., 2004).

### **3.12. Bioensaios**

#### **3.7.1 Atividade Antimicrobiana**

Os procedimentos com a manipulação e realização dos ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana seguiram as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI.

#### **3.12.1.1. Ensaios Antibacterianos**

Os ensaios para avaliar a atividade antibacteriana foram realizados através de dois procedimentos diferentes: ensaio de zona de inibição de crescimento bacteriano (Hultmark et al., 1980) realizado para o monitorar a atividade antibacteriana dos peptídeos durante a etapa de purificação, utilizando-se cepas de bactéria de ocorrência natural provenientes da pele e do ambiente do animal; e ensaio de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido realizado para a determinação da mínima concentração inibitória (MIC - *Minimal inhibitory*

*concentration*), utilizando-se cepas de coleções padronizadas *American Type Cell Culture* (ATCC).

### ***Microrganismos***

*P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 28922, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29912 foram obtidas da Coleção Americana de Tipos Culturas (ATCC - *American Type Cell Culture*) em colaboração Hospital São José de Doenças Infecciosas em estado de conservação por liofilização, devidamente morfológicas, fisiológica e bioquimicamente caracterizadas.

As cepas de ocorrência natural foram isoladas de amostras coletadas de pele do animal e de água da lagoa, onde habita uma grande população de *L. pentadactylus* (Figura 1). Estas foram coletadas a fim de se isolar populações de bactérias de ocorrência do ambiente da rã *L. pentadactylus*. As amostras de água foram coletadas assepticamente de uma região de pouca movimentação pela introdução de uma seringa estéril de 3mL a 10 cm da superfície. Alíquotas foram inoculadas em tubos estéreis contendo meio líquido BHI. Para as amostras da superfície da pele do animal, swabs estéreis foram passados na pele e semeados em tubos contendo meio líquido nutritivo. As culturas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Nos tubos que foram observados crescimento, as bactérias foram classificadas por sua morfologia e microscopicamente pela coloração de Gram. Posteriormente, foram realizadas as provas bioquímicas de acordo com o protocolo de técnicas em microbiologia. A susceptibilidade foi analisada pelo protocolo do método de microdiluição em meio agar Mueller-Hinton de acordo

com as recomendações do CLSI. Os antibióticos testados para bactérias gram-negativas foram: Amicacina (2mg), ampilicina (32mg), ampilicina/sulbactam (32mg), aztreonama (8mg), cefepime (4mg), cefoxime (32mg), cefoxitina (32mg), ceftazidime (8mg), cefalotina (32mg), ciprofloxacina(0.5mg), gentamicina (0.5mg), imipenem (4mg), piperacilina/tazobactam (8mg), meropenem (8mg) e sulfa trimetoprina foram usados. Os antibiogramas das bactérias isoladas foram realizados de acordo com os critérios do CLSI.

### ***Preparação do inóculo para cultivo e ensaios antibacterianos***

As cepas de bactérias ATCC em estado de conservação por liofilização foram obtidas por dissolução em caldo B.H.I (*Brain Heart Infusion, Merck*<sup>®</sup>) de uma alíquota deste material liofilizado, esta foi repicada por 24 horas à temperatura de 37°C e incubada a colônias isoladas de cultivos puros.

As cepas de ocorrência natural, depois de isoladas e devidamente morfológicas, fisiológica e bioquimicamente foram repicadas e incubadas a 37°C.

Antes de serem utilizados nos experimentos, cada cepa bacteriana foi repicada assepticamente em diferentes tubos contendo B.H.I, após incubação dos tubos por cinco horas, visando se obter uma suspensão com turvação moderada, o inóculo foi devidamente padronizado, diluindo-se e corrigindo a turbidez com o auxílio de uma Escala de MacFarland (0,5mL de BaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O 0, 48M em 99,5 ML de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,36 N) para um grau de meio (10<sup>8</sup> unidades formadores de colônia por mililitros).

### **Ensaio de Zona de Inibição de Crescimento Bacteriano**

Durante o procedimento de purificação, a atividade antibacteriana dos peptídeos foi monitorada pelo ensaio de zona de inibição em placas de agarose. Os ensaios foram realizados com cepas isoladas do ambiente do animal *P. aeruginosa* LP01, *Citrobacter freundii* LP02, *Klebsiella pneumoniae* (LP03) e *Aeromonas veroni* (LP04). A suspensão de bactérias ( $2 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>), primeiramente crescidas em meio líquido BHI a 37 °C, foi semeada em placa de Petri contendo 6mL de meio com agarose. As amostras dos peptídeos foram dissolvidas em DMSO 10% e alíquotas de 10 µl inoculadas na placa. A zona de inibição, caracterizada pela formação de um halo sem crescimento bacteriano em volta da região onde amostra foi aplicada, foi avaliada depois de 24 horas de incubação a 37°C.

### **Ensaio de Inibição de Crescimento bacteriano em Meio Líquido**

A mínima concentração inibitória (MIC - *Minimal inhibitory concentration*) foi determinada para as cepas *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 28922, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29912 pelo método de microdiluição em caldo de acordo com as regras do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (formalmente NCCLS) (NCCLS, 2003). Pré-inóculos de bactérias isoladas foram preparadas em caldo de BHI e incubadas por 3 a 4 horas a 37 °C. Alíquotas liofilizadas do peptídeo purificados foram dissolvidas em DMSO 10% (50 µl) e incubados com o inóculo (50 µl of 1 x

10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônia/mL referência de turbidez 0,5 da escala de McFarland) em cultura em fase crescimento logaritmo em placas de 96 poços por 20 h a 37 °C. Depois da incubação, a absorbância de cada poço foi monitorada a 492nm utilizando um leitor de placas. Os ensaios foram realizados em duplicatas para cada cepa e os valores do MIC foram estabelecidos a partir da menor concentração do peptídeo que inibiu completamente o crescimento bacteriano.

### **3.12.1.2. Ensaios Antifúngicos**

#### ***Microrganismos***

Para avaliarmos o potencial antifúngico das frações isoladas da secreção de *L. pentadactylus* foram escolhidos dois modelos diferentes quanto à composição da parede celular e resposta a antifúngicos. Um total de duas cepas de leveduras (*Candida albicans* CEMM 01-3-075 e *Candida tropicalis* CEMM 01-2-078) e cinco cepas de dermatófitos (*Microsporum canis* CEMM 01-2-133, *Microsporum canis* CEMM, *Trichophyton rubrum* CEMM0 1-1-100, *Trichophyton rubrum* CEMM01-1-014 e *Trichophyton rubrum* CEMM 01-2-101) foram incluídas neste estudo. As cepas de leveduras e dermatófitos foram provenientes das coleções de culturas padronizadas do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará. As cepas foram isoladas de pacientes oriundos do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) – UFC ou de cachorro e gatos sintomáticos. As cepas foram mantidas em solução salina (0,9% de NaCl) a 28°C. Para a realização dos ensaios uma alíquota de cada

suspensão foi retirada e inoculada em ágar batata-dextrose (Difco, Detroit, Mi, USA) e incubado a 28°C por 2-10 dias.

### **Preparo do Inóculo para Cultivo**

Para o método de microdiluição o inóculo padronizado  $2,5-5 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup> para *Candida* spp e  $5 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup> para *M. canis* e *T. rubrum* foram preparados por turbimetria. O inóculo estocado foi preparado em 2 dias e 10 dias para leveduras (*Candida* spp.) e dermatofitos (*M. canis* e *T. rubrum*), respectivamente, crescido em ágar batata-dextrose (Difco) a 28°C. Solução salina estéril (0,9%; 3mL) foi adicionado para se obter os conídios das hifas de *M. canis* (Brilhante et al. 2005) e *T. rubrum* e os blatoconídeos de *Candida* spp (Brito et al. 2007). As suspensões de conídios com fragmentos de hifa do inóculo estocado foi preparado em 2 dias e 10 dias para leveduras (*Candida* spp.) e dermatofitos (*M. canis* e *T. rubrum*), respectivamente, crescido em ágar batata-dextrose (Difco) a 28°C. As suspensões de conídios com fragmentos de hifas de *M. canis* e *T. rubrum* foram transferidos para tubos estéreis e o volume foi ajustado para 4ml com solução salina estéril. As suspensões resultantes foram colocadas em repouso por 5 minutos a 28°C, e sua densidade foi lida a 530nm e ajustadas. A suspensão foi diluída de 1:2000 para *Candida* spp e 1:500 para *M. canis* e *T. rubrum*, ambas com meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute – 1640) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), tamponado para pH 7 com  $0,165^{-1}$  de ácido morfolinepropanosulfônico (Sigma), para obter o tamanho do inóculo de  $2,5-5 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup> para *Candida* spp. e  $5 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup> de *M. canis* e *T. rubrum*. A suspensão resultante foi

colocada em agitador de vórtex durante 15 segundos e a densidade celular foi ajustada acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de Mc Farland 0,5.

### ***Teste de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Fungos a Terapia Antifúngica***

Para avaliarmos o potencial antifúngico das frações isoladas da secreção de *L. pentadactylus* e determinarmos a mínima concentração inibitória (MIC - *minimum inhibitory concentration*) para o crescimento de levedura (*Candida albicans* CEMM 01-3-075, *Candida tropicalis* CEMM 01-2-078) foi realizado o método de caldo de microdiluição de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (formalmente NCCLS; M27-A2), (NCCLS M27A 2002). O ensaio de microdiluição em caldo para fungos dermatófitos (*Microsporum canis* CEMM 01-2-133, *Trichophyton rubrum* CEMM 01-1-100) foi realizado como descrito por Jessup et al.(2000), Fernandez-Torres et al. (2002) e Brilhante et al.(2005), baseado nas normas do documento M38-A do CLSI (formalmente NCCLS M38A 2002).

As frações isoladas da secreção de *L. pentadactylus* foram dissolvidas em solução 10% DMSO (Sigma) em água bidestilada. Para a análise de susceptibilidade as frações foram testadas em diferentes concentrações variando de 25 a 500µg/mL.

O teste de microdiluição foi realizado em placas de microdiluição estéreis, com múltiplos poços (96 poços em formato de U). Os ensaios foram desenvolvidos em duplicata. Cada poço da placa de microdiluição foi inoculado

com 90µL de meio estéril acrescido de 100µL da correspondente suspensão do inóculo e alíquotas de 10µL contendo a fração a ser analisada. Os poços controle de crescimento continham 100µL de meio estéril, isento de droga e foram inoculados com 100µL das suspensões de inóculos. As placas de microdiluição foram incubadas a 37°C. A atividade antifúngica foi analisada depois de 2 dias para *Candida* spp. e 5 dias para *M. canis* e *T. rubrum* como recomendado pelo CLSI, observando-se a presença ou a ausência de crescimento visível. O MIC foi definido pela menor concentração da fração que causou 100% de inibição visível do crescimento do fungo.

### **3.13. Ensaio Hemolítico**

O ensaio para a atividade hemolítica foi realizado com eritrócitos humanos. As células eritrocitárias foram separadas do plasma por sedimentação e uma suspensão de 1% de células vermelhas do sangue (RBC - *red blood cells*), lavada por três vezes por centrifugação com PBS 0,15M, pH 7.4, foi preparada. Para determinar a atividade hemolítica, 150µl PBS/solução do peptídeo (75 µM) contendo DMSO 10% foram adicionados a 50 µl de 1% da suspensão de RBC e agitada. Depois de 60 minutos a 37 °C, as amostras foram centrifugadas 3,000 x g for 5 min e alíquotas de 100 µl foram transferidas para um microplaca e a absorbância de cada poço foi mensurada a 405 nm. Amostras de referencia para 100% hemólise foi 1% of RBC incubada com 0.1% Triton X-100, e para não hemólise, 1% de RBC.

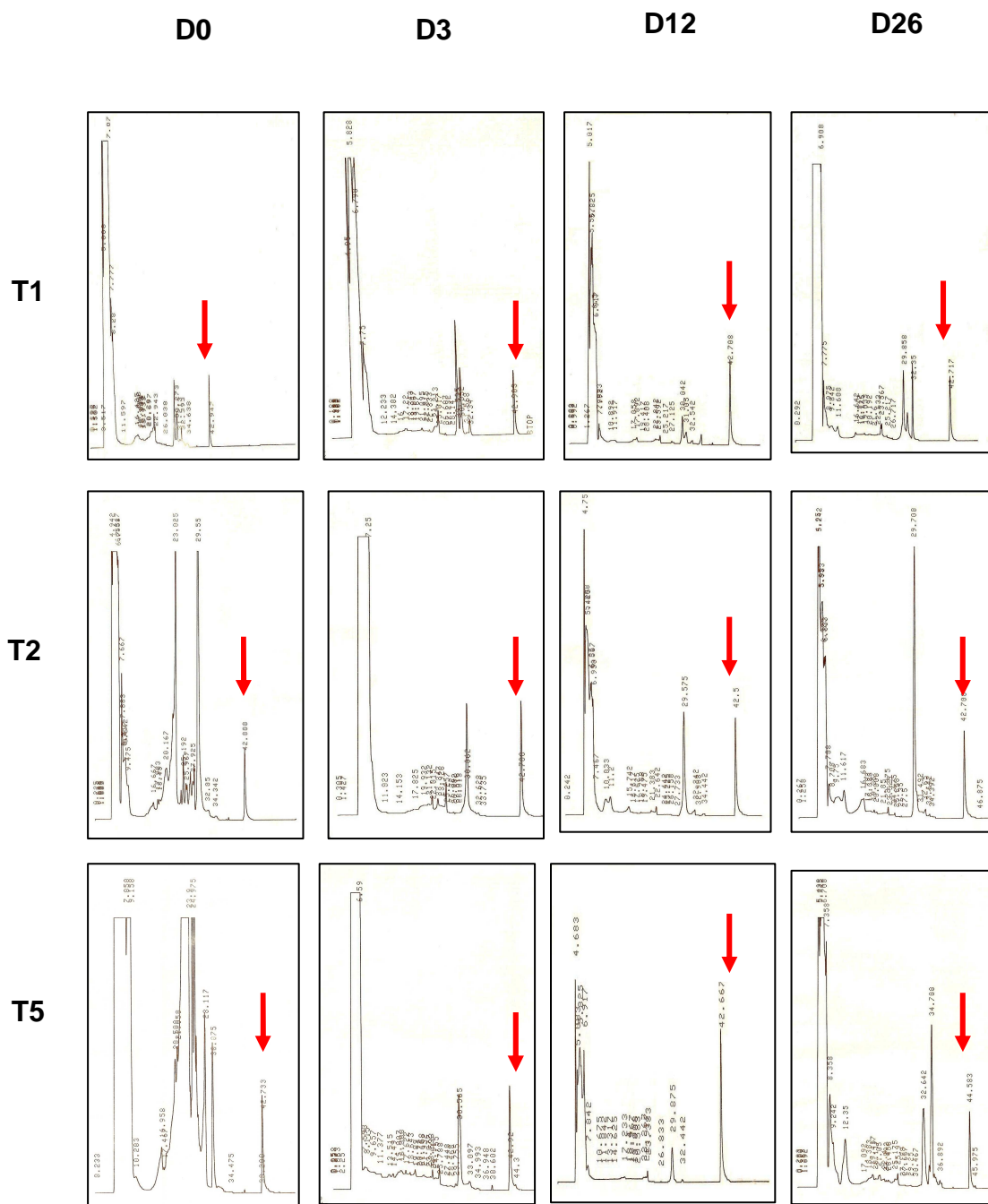


## 4. RESULTADOS

### 4.1. Perfis cromatográficos das secreções obtidas por manipulação mecânica após estímulos exógenos de espécimes de rã *L. pentadactylus*

A análise dos perfis cromatográficos de todos os tratamentos, com exceção do controle, revelou a presença de frações, em grande quantidade, na região de 30 a 50% do gradiente de acetonitrila, característica de peptídeos antimicrobianos (Figura 3). Entretanto, a presença da fração eluída aos 44% de acetonitrila não difere quanto aos tratamentos (Figura 3, setas em vermelho destacando a presença do pico nos diferentes tratamentos). Análise por espectrometria de massa revelou a presença, na região, de um pico com massa de 1762 Da. Não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, todos demonstraram indução da produção em grande quantidade de frações peptídicas que provavelmente são relevantes para a defesa do anfíbio, com exceção do controle.

Diante dos dados adquiridos dos perfis cromatográficos fica claro que a síntese de peptídeos na pele do anfíbio provavelmente é independente do tipo de estímulo aplicado (Figura 3). Porém estímulos ambientais são importantes para a manutenção da maquinaria de síntese desses peptídeos, tal fato é evidenciado pela à presença de poucas frações na região hidrofóbica do grupo controle.



**Figura 3 - Perfil Cromatográfico da Secreção da pele de *L. pentadactylus* obtida por RT-HPLC depois da imunização experimental das rãs. T<sub>1</sub> = Animais controle; T<sub>2</sub>= Escarificações leves na pele (ES); T<sub>5</sub>= ES + 200 µl *Pseudomonas aeruginosa* (10<sup>8</sup> UFC/ml). As setas vermelhas indicam a presença de um pico presentes em todas as secreções.**

## 4.2. Isolamento das Cepas de Ocorrência Natural

Quatro cepas de bactérias foram obtidas do dorso da pele de *L. pentadactylus* e de amostras da água da lagoa onde habita uma grande população de *L. pentadactylus* (Paraipaba, Ceará). Foram identificadas quatro cepas de bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (LP01), *Citrobacter freundii* (LP02), *Klebsiella pneumoniae* (LP03) e *Aeromonas veronii* (LP04). *P. aeruginosa* foi resistente a ampicilina, ampicilin/sulbactam, cefoxitina e cefalotina como demonstrado na Tabela 1. Por um outro lado, *K. pneumoniae* foi resistente a ampicilina e sensível a outros antimicrobianos (Tabela 2)

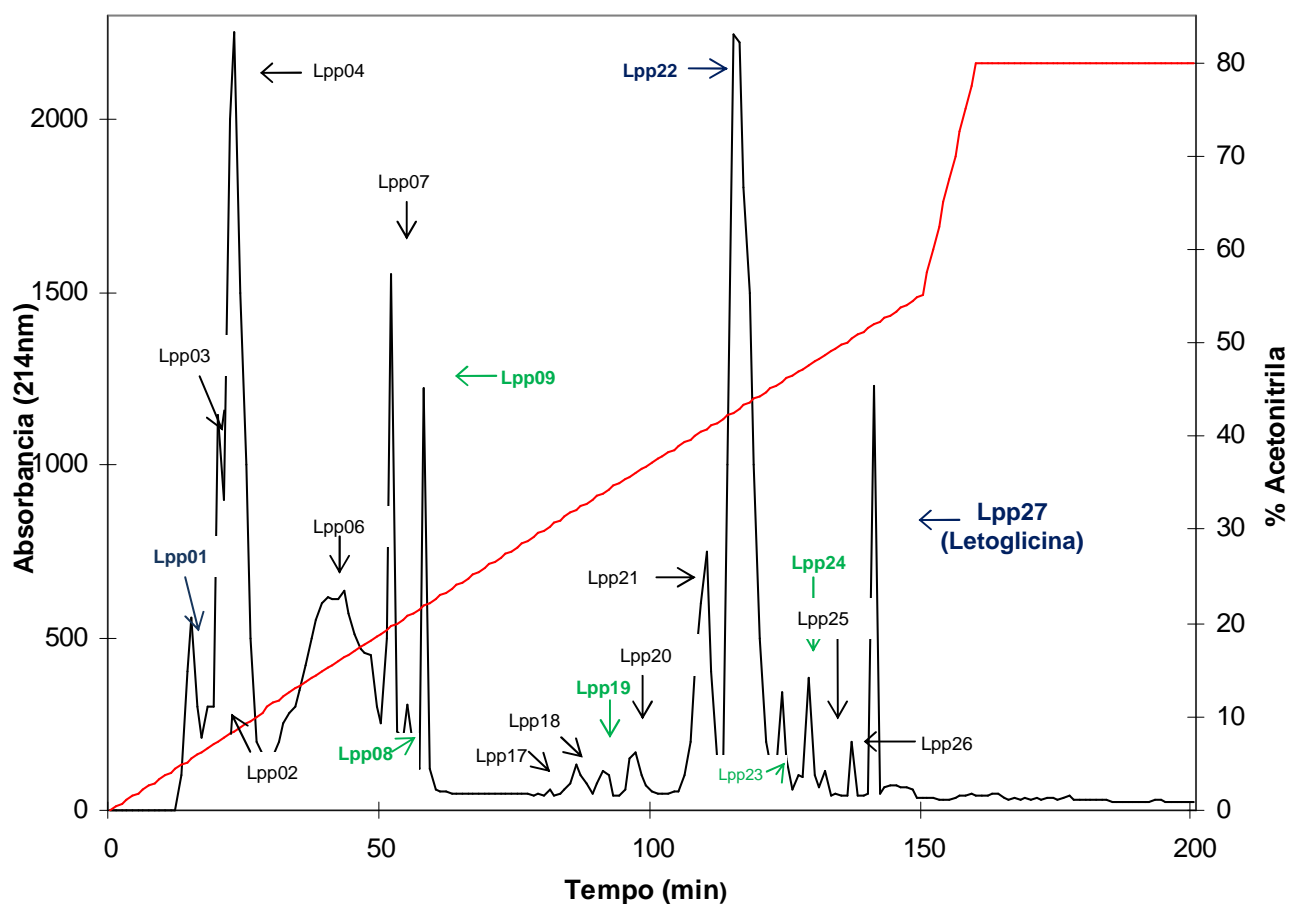
## 4.3. Peptídeos antimicrobianos da secreção da pele

Os peptídeos da secreção das glândulas cutâneas da pele de *L. pentadactylus* extraídos com etanol e ácido trifluoracético foram submetidos à RP-HPLC em coluna semi-preparativa, como demonstrado na Figura 4. As 28 frações (Lpp01, Lpp02, Lpp03, Lpp04, Lpp05, Lpp06, Lpp07, Lpp08, Lpp09, Lpp17, Lpp18, Lpp19, Lpp20, Lpp21, Lpp22, Lpp23, Lpp24, Lpp25, Lpp26, Lpp27, Lpp28) obtidas nas cromatografias tiveram a atividade antibacteriana avaliada utilizando-se *P. aeruginosa* LP01, *Citrobacter freundii* LP02, *Klebsiella pneumoniae* (LP03) e *Aeromonas veroni* (LP04).

**Tabela 2** – Perfil da resistência a antibióticos, realizado por método de microdiluição em caldo, das bactérias isoladas de amostras da pele e da água da alagoa onde vive espécimes de *L. pentadactylus*.

<b>Antibiótico</b>	<b><i>P. aeruginosa</i> (Lp01)</b>		<b><i>K. pneumoniae</i> (Lp03)</b>		<b><i>C. freundii</i> (Lp02)</b>		<b><i>A. veronii</i> (Lp04)</b>	
	<b>MIC</b>	<b>Result</b>	<b>MIC</b>	<b>Result</b>	<b>MIC</b>	<b>Result</b>	<b>MIC</b>	<b>Result</b>
<b>Amikacina</b>	≤2	S	≤2	S	N.D	R	N.D	S
<b>Ampicilina</b>	≥32	R	≥32	R	N.D	R	N.D	N.D
<b>Ampicilina/ sulbactam</b>	≥32	R	8	S	N.D	N.D	N.D	R
<b>Aztreonam</b>	≤8	S	≤8	S	N.D	N.D	N.D	S
<b>Cefepime</b>	≤4	S	≤4	S	N.D	R	N.D	S
<b>Cefotaxime</b>	<32	S	≤4	S	N.D	N.D	N.D	N.D
<b>Cefoxitina</b>	≥32	R	≤2	S	N.D	N.D	N.D	N.D
<b>Ceftazidime</b>	≤8	S	≤8	S	N.D	R	N.D	S
<b>Cefalotina</b>	≥32	R	≤2	S	N.D	N.D	N.D	N.D
<b>Ciprofloxacina</b>	≤0.5	S	≤0.5	S	N.D	S	N.D	S
<b>Gentamicina</b>	≤0.5	S	≤0.5	S	N.D	N.D	N.D	S
<b>Imipenem</b>	≤4	S	≤4	S	N.D	S	N.D	S
<b>Piperacillina / tazobactam</b>	≤8	S	≤8	S	N.D	S	N.D	S
<b>Meropenem</b>	<8	S	≤2	S	N.D	S	N.D	N.D
<b>Sulfa trimethoprim</b>	40	S	≤10	S	N.D	S	N.D	S

MIC- *Minimal inhibitory concentration* (mg); R– Resistente; S– Sensível; N.D. – Não Determinado



**Figura 4 - Perfil cromatográfico da secreção da pele de *L. pentadacylus* obtido por RT-HPLC.** O extrato bruto da secreção da pele foi obtido por estimulação elétrica e submetido à purificação em coluna preparativa C<sub>18</sub>. A linha vermelha representa o gradiente bifásico de acetonitrila: 0 a 50% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA (solvente B) durante 150 minutos, seguido por 50 a 80% do mesmo solvente durante 10 minutos de acetonitrila. As frações em destaque na cor verde representam os picos que apresentaram atividade antifúngica. As frações em destaque na cor azul representam os picos em que foi detectada atividade antibacteriana.

Atividade biológica significativa foi encontrada em três frações eluídas a 5%, 35%, e 45% de acetonitrila obtidas na etapa de purificação em HPLC. Lpp01, Lpp22 e Lpp27, respectivamente (Figura 4). Apesar da inibição total da fração obtida a 5% e 35% resolvemos, nesta fase, trabalhar apenas com as frações hidrofóbicas Lpp22 e Lpp27.

Foram realizados ensaios com modelos utilizando leveduras e dermatófitos. Os ensaios foram realizados com 21 frações isoladas da secreção da pele de *L. pentadactylus* para verificar qual fração possuía atividade antifúngica. Cada fração foi testada em duplicata. Todas as frações testadas foram inativas contra de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Entretanto seis frações apresentaram uma potencial atividade antifúngica, ou seja, inibiram completamente o crescimento contra cepas de fungos dermatófitos e estão demonstradas na Figura 4.

A fração Lpp22 foi submetida a uma segunda etapa de purificação por cromatografia líquida (HPLC) em coluna analítica. O pico 11 (resultante da repurificação da fração Lpp22) apresentou atividade antibacteriana contra *Pseudomonas sp.* A análise por microHPLC acoplado ao espectrômetro de massas ESI-Q-TOF indicou que o pico 11 estava levemente contaminado. Para verificar a integridade do pico 11, ele foi submetido à redução e alquilação seguido de digestão pela enzima tripsina. Após a redução e alquilação a análise por espectrometria de massa revelou que não ocorreu diferença na massa do peptídeo, ou seja, a molécula não apresenta cisteínas em sua estrutura.

Em seguida o peptídeo foi submetido à ação enzimática por tripsina. O produto da reação foi analisado por MALDI-TOF/Pro revelou a presença de quatro fragmentos (757.57Da, 1238.73Da, 1084.73Da, 844.54Da). Após a purificação

dos produtos da digestão por HPLC em coluna de fase reversa, os quatro fragmentos foram individualmente selecionados por análise MS/MS e fragmentados por colisão com argônio (CIF). Os espectros gerados por MS/MS foram analisados pelo módulo BioLynx e a interpretação da seqüência de aminoácidos foi manualmente verificada. Depois das análises realizadas verificou-se a presença de dois peptídeos. As seqüências dos dois peptídeos foram totalmente seqüenciados por espectrometria de massa: GVLDLLKGAAKDLAGHLASKALD-NH<sub>2</sub> e GVLDLLKGAAKNVVGGGLASKALD-NH<sub>2</sub> e dois peptídeos foram identificados e denominados como nova pentadactylin tipo 1 (NP1) e pentadactylin tipo 2 (NP2) devido a homologia com a pentadactylina anteriormente relatada .

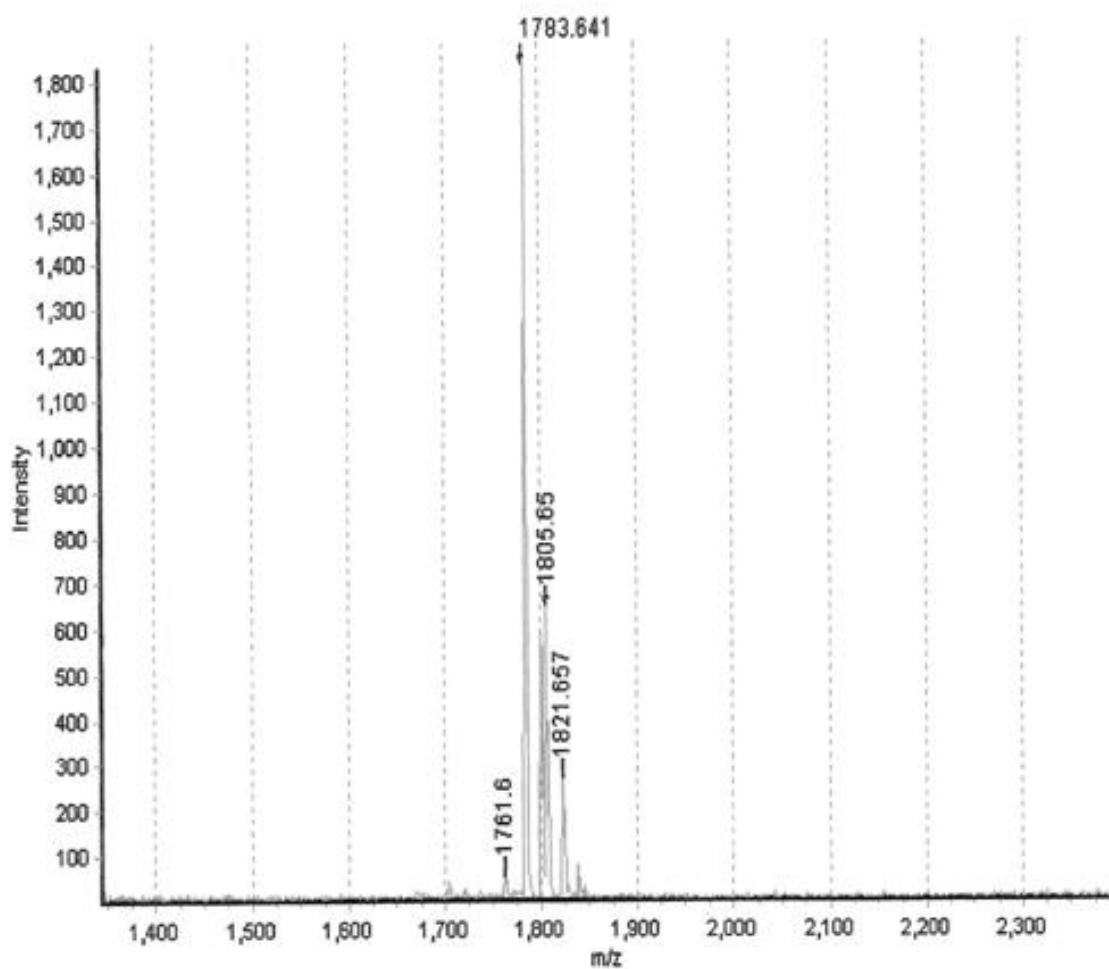
#### **4.4. Purificação e caracterização de LPG**

A fração sobrenadante do centrifugado do extrato bruto da secreção da pele de *L. pentadctylus* foi fracionado em RP-HPLC, como demonstra a Figura 4. Inicialmente o pico apresentou significante atividade contra bactérias Gram-negativas de ocorrência natural, tais como *P. aeruginosa* e *C. freundii*. O pico contendo a fração Lpp27, denominada de LPG, está indicado pela seta. O grau de pureza do peptídeo foi analisado por RT-HPLC (Figura 5) e por MALDI/TOF-MS (Figura 6). A Figura 6 demonstra o peptídeo purificado, um aducto de sódio e aductos de potássio. O pico purificado ativo foi submetido ao sequenciamento *de novo*.



**Figura 5 - Grau de pureza do peptídeo antimicrobiano leptoglicina.** Perfil do peptídeo leptoglicina obtido por RT-HPLC acoplado com coluna analítica C<sub>18</sub> column Shim pack 0.46 X 25 cm. Eluido com um gradiente linear de 40 a 55% de acetonitrila, sob fluxo constante de 1,0mL/min.





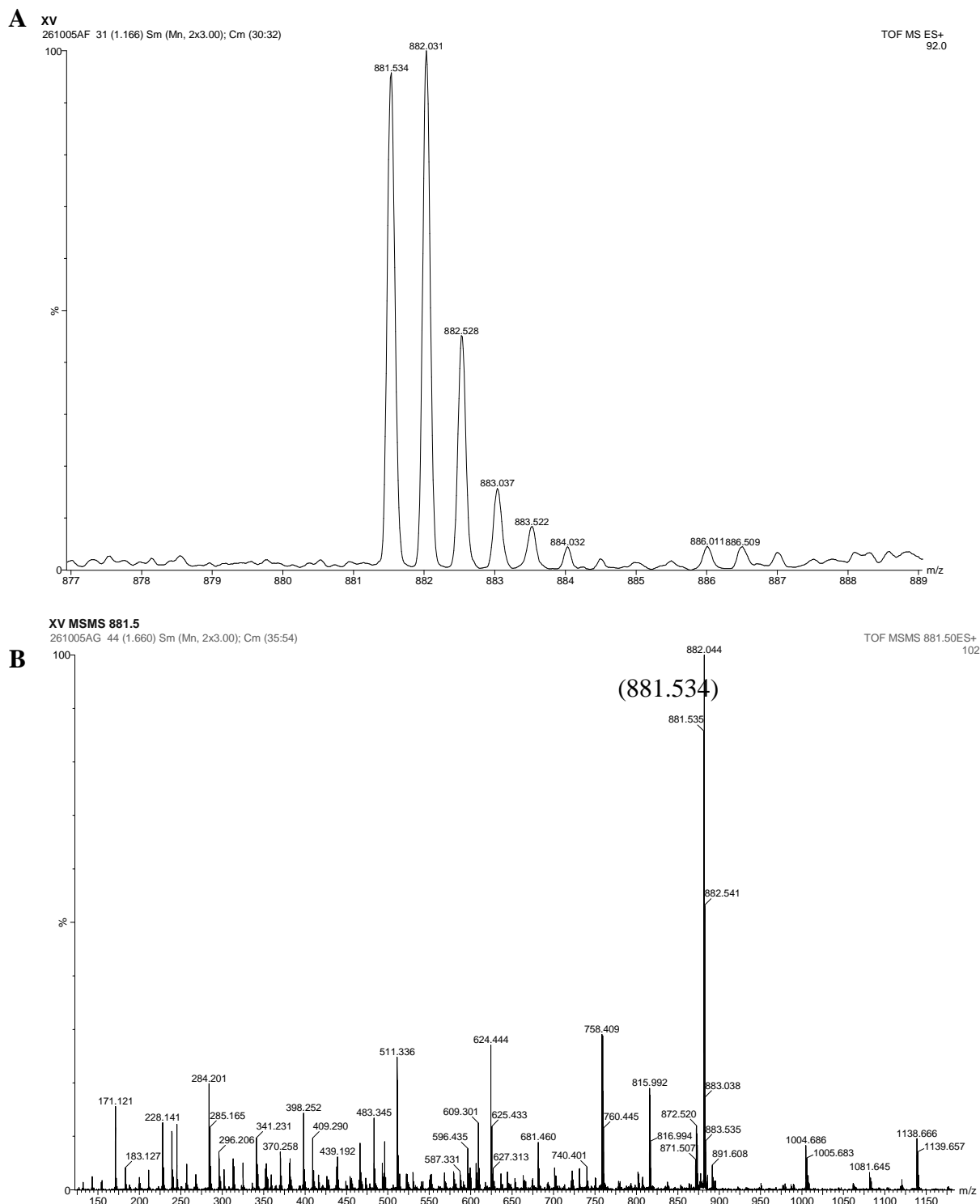
**Figura 6 - Perfil do pico puro leptoglicina obtido por MALDI-TOF/MS. O perfil contém também dois adutos de sódio e um de ácido acético.**

#### 4.5. Sequenciamento *de novo* da LPG

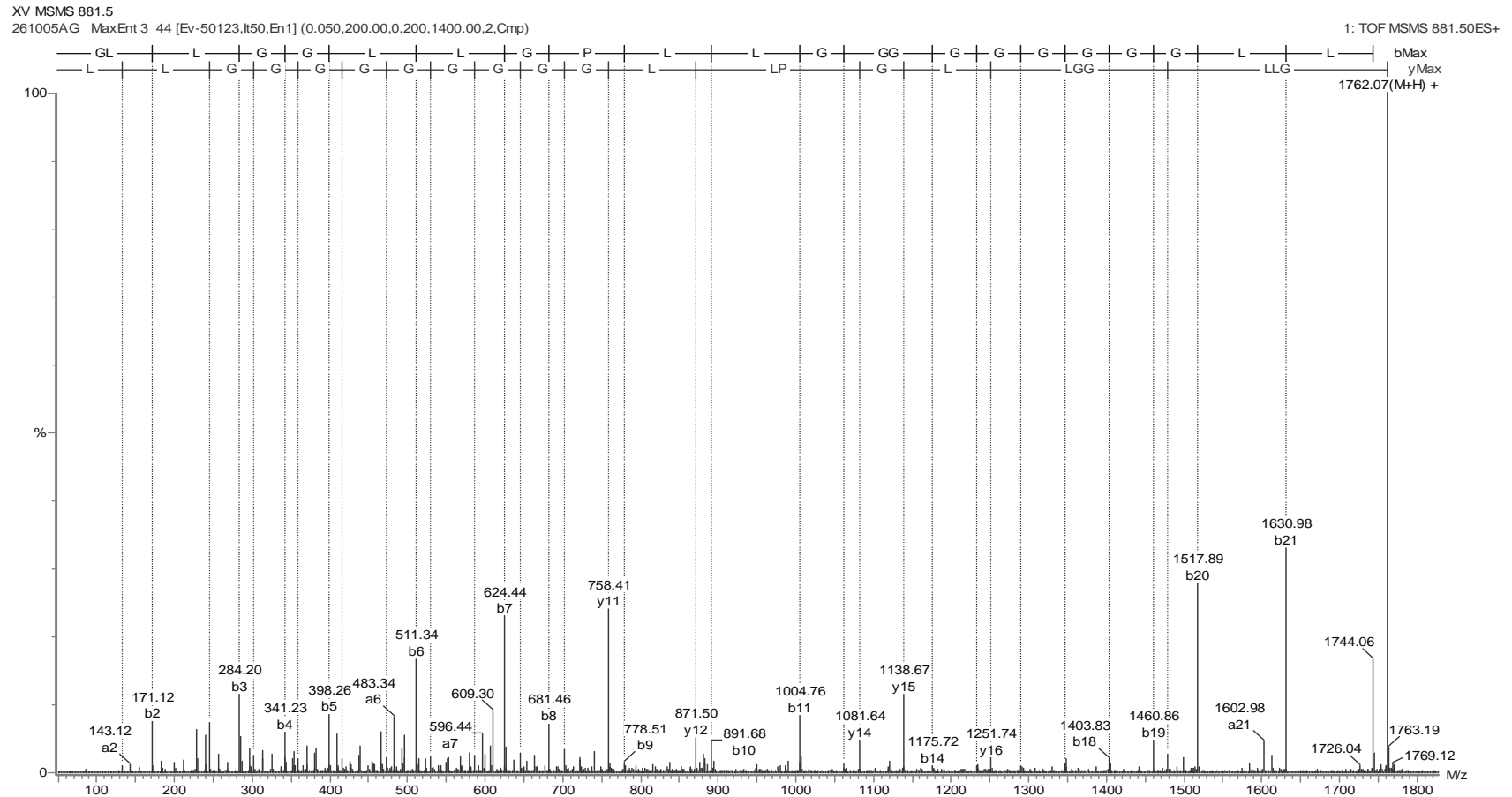
O pico ativo purificado contendo LPG foi selecionado e submetido ao seqüenciamento *de novo*. A massa molecular foi mensurada (Figura 7 A) e em seguida foi realizada a dissociação de íons com o gás argon, gerando um espectro de íons (Figura 7 B). O peptídeo foi reduzido e alquilado de acordo com o protocolo modificado de Westermeier e Raven, 2002, demonstrando a ausência de cisteínas ou pontes dissulfetos na estrutura da molécula, pois não ocorreu mudança de massa depois do processamento da amostra. O espectro MS/MS foi analisado por BioLynx software module de MassLynx 4.0 (Figure 8), a interpretação da seqüência de aminoácidos foi manualmente verificada. O peptídeo foi totalmente seqüenciado por espectrometria de massa e confirmação da seqüência de aminoácidos foi confirmado por degradação automatizada de Edamn. Depois de quimicamente confirmado o sequenciamento, a seqüência de 22 aminoácidos deduzida por MS/MS foi: **Gly-Leu-Leu-Gly-Gly-Leu-Leu-Gly-Pro-Leu-Leu-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Leu-Leu**. A molécula foi identificada como um novo peptídeo bioativo denominado **leptoglicina** (LPG) em referência ao nome do gênero *Leptodactylus* e por sua estrutura possui um teor de glicina.

Baseando-se na seqüência obtida da leptoglicina, verifica-se que é um peptídeo linear com uma particular composição de aminoácidos caracterizado por um alto nível de glicina (59,1%) contendo 36,4% leucinas e uma prolina central. A presença dos resíduos de Leu é responsável pelo caráter hidrofóbico da molécula (hidrofobicidade 36%). Existe uma regularidade na seqüência dos 22 aminoácidos com repetidos e regulares *motifs* GXXXG e um núcleo de nove resíduos de

glicina. A presença de 22 aminoácidos sem resíduos carregados confere a esse peptídeo uma rede de cargas zero e um valor de  $pI$  teórico de 5,52.



**Figura 7 – Análise por ESI-Q-TOF/MS do peptídeo antimicrobiano leptoglicina.** (A) Massa molecular do íon LPG duplamente carregado determinado por ESI-Q-TOF/MS. Os valores  $m/z$  de cada íon estão descrita ao lado de cada íon. (B) Espectro de íons dissociados resultados da fragmentação induzida pela colisão com gás argon.

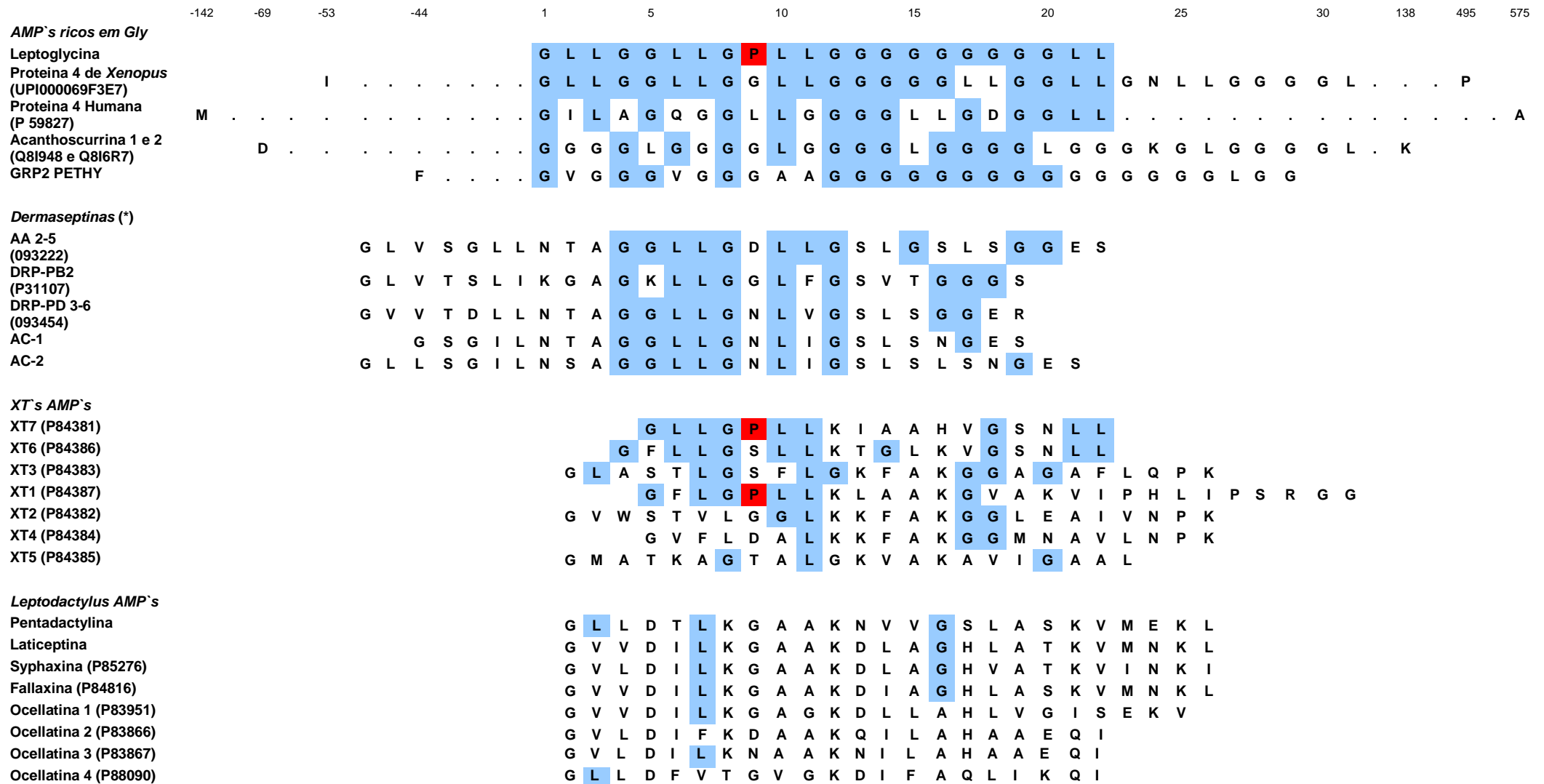


**Figura 8 – Deconvolução representativa do sequenciamento *de novo*, por MS/MS, do peptídeo antibacteriano purificado, leptoglicina.** O íon duplamente carregado foi selecionado por dissociação e o espectro de íons resultantes foi processado pelo programa ByoLynx (Micromass). O espectro é representado pela série de íons b e y. A dedução da seqüência do peptídeo é demonstrada na parte superior do gráfico pelas séries b e y.

#### 4.6. Análise da seqüência da leptoglicina

A leptoglicina foi alinhada com outros peptídeos: 1) membros da família de proteínas BPI/LBP (núcleo da proteína 4 transcrita de *Xenopus* sp., na qual possui homologia com a leptoglicina encontrada através de pesquisas no BLAST e núcleo da proteína 4 de humano); 2) duas isoformas da acanthoscurrina, um peptídeo antimicrobiano da hemolinfa de aranha; 3) representantes da classe de peptídeos antimicrobianos GRPs; 4) peptídeos antimicrobianos do gênero *Leptodactylus*; 5) peptídeos antimicrobianos da *Xenopus*; 6) e membros da família de peptídeo ricos em GLy-Leu (PBN2, dermaseptina AA-2-5, dermaseptina DRP-PD-3-6, AC1, AC2), isolados da secreção da pele de hilídeos sul americanos da subfamília Phyllomedusinae, denominado de dermaseptinas; como demonstrado na Figura 9.

Para gerar a árvore de radiação evolucionária foram utilizados somente os 180 aminoácidos iniciais das proteínas<sup>4</sup> (Figura 10). Pode se observar que os peptídeos de *Leptodactylus* localizado nos braços inferiores da árvore e que são mais diversos dos peptídeos da *Xenopus*, todos os grupos estão separados pelos braços superiores. A leptoglicina, a acantoscrrina e a proteína 4 formam um braço superior separado. Este se aproxima da XT6 e XT7 que pode ser devido ao fato de que esses peptídeos são os mais hidrofóbicos dos *Xenopus* peptídeos e além disso, o XT7 é o único peptídeo que alinham seu resíduo de prolina com a única prolina da LPG (Figure 9, seta).

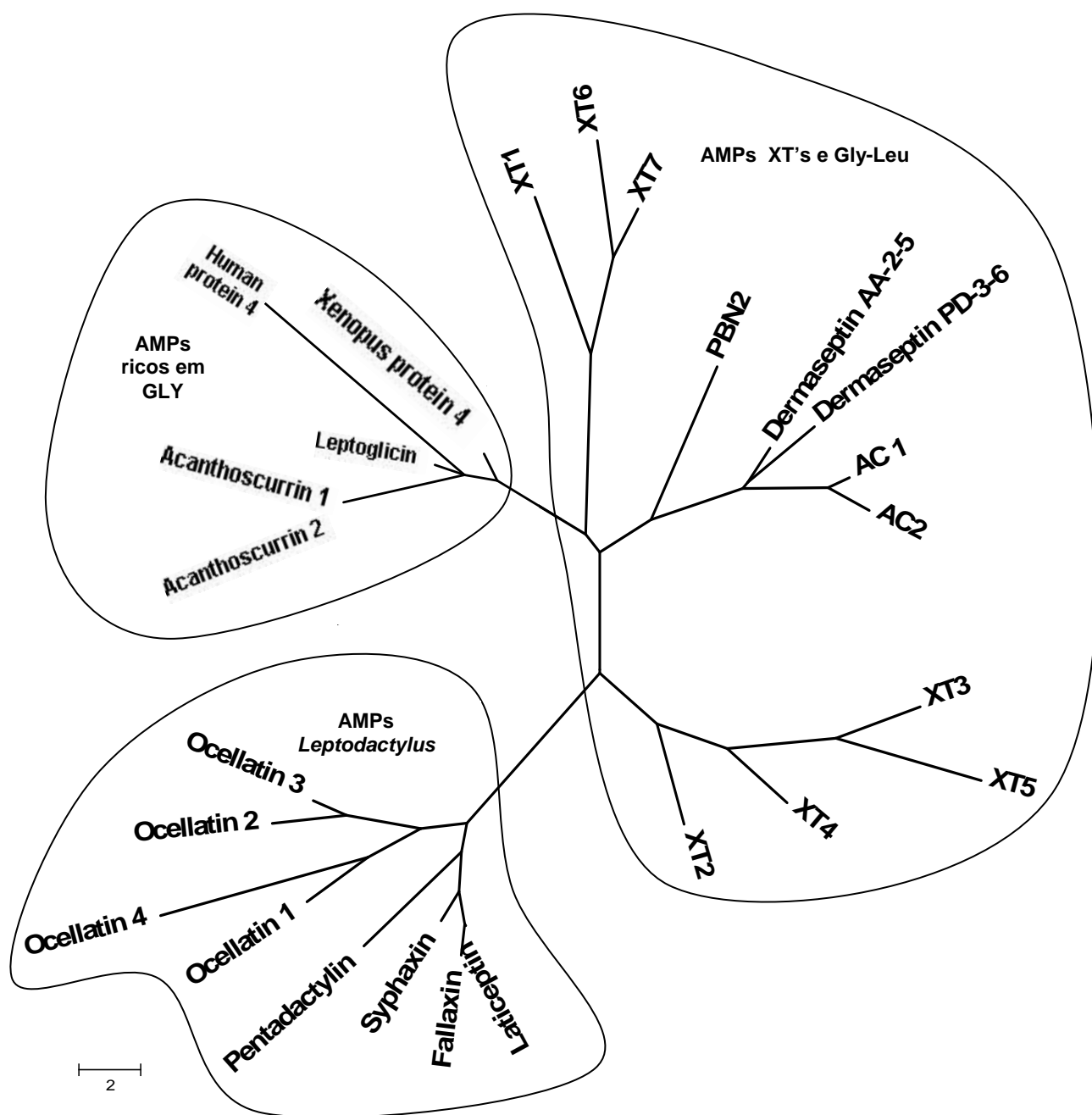


**Figura 9 - Alinhamento de múltiplas seqüências realizado pelo Clustal W. Comparação da seqüência da leptoglicina com outras proteínas e peptídeos.**

As regiões dos outros peptídeos idênticas ao da leptoglicina estão destacadas em azul. A seta vermelha e os aminoácidos em destaque vermelho indicam o único resíduo de prolina da leptoglicina alinhado com os peptídeos XT-7 e XT-1, indicando a conservação de um domínio comum de AMP de diferentes espécies.

Os números em parênteses correspondem ao registro no UniProt (<http://www.uniprot.org>). (\*) Peptídeos ricos em Gly-Leu são de diferentes espécies de hilídeos:

AA = *Agalycnis annae*, AC= *Agalycnis callidryas*, PB= *Phyllomedusa bicolor*, PD= *Phyllomedusa dacnicolor*.



**Figura 10 - Relacionamento evolucionário entre leptoglicina e outro peptídeos antimicrobianos (AMPs).** Leptoglicina claramente forma um grupo com o peptídeo de aranha acanthoscurrina e as duas proteínas 4 (de *Xenopus* e de origem humana). Os dois outros grupos são formados por peptídeos ricos em Gly-Leu e AMPs isolados de espécies do gênero *Leptodactylus*. A análise filogenética foi realizada utilizando o programa MEGA3.



#### 4.7. Atividade antimicrobiana de Leptoglicina

Nos ensaios de zona de inibição de crescimento bacteriano, como também nos ensaio de inibição do crescimento bacteriano em meio líquido, leptoglicina apresentou atividade contra cinco bactérias Gram-negativas como apresentado na Tabela 03. O valor do MIC da leptoglicina foi de 8 $\mu$ M sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027, 50 $\mu$ M contra *E. coli* ATCC 28922 e 75 $\mu$ M contra *C. freundii* ATCC 8090 (Tabela 03). Leptoglicina foi inativa contra cepas de bactéria Gram-positiva, fungo leveduriforme *Candida albicans* e *Candida tropicalis* e contra cepas de fungos dermatófitos *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum*.

#### 4.8. Atividade de leptoglicina contra eritrócitos humanos

No ensaio hemolítico, onde eritrócitos humanos foram incubados em solução salina fosfato-tamponada (PBS) juntamente leptoglicina nas concentrações equivalente aos MIC's encontrados contra *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. freundii* e, o peptídeo não apresentou atividade hemolítica (Tabela 03).

**Tabela 3:** Atividade antimicrobiana do peptídeo neutro leptoglicina

<i>Microorganismos</i>	<i>Atividade antimicrobiana</i>	<i>MIC (µM)</i>
<b>Bactérias Gram-negativas</b>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LP01*	+	N.I
<i>Citrobacter freundii</i> LP02*	+	N.I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LP03*	-	N.I
<i>Aeromonas veronii</i> LP04*	+	N.I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	+	8
<i>E. coli</i> ATCC 28922	+	50
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	+	75
<b>Bactérias Gram-positivas</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923	-	N.A.
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29912	-	N.A.
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	-	N.A.
<b>Leveduras</b>		
<i>Candida albicans</i>	-	N.A.
<i>Candida tropicalis</i>	-	N.A.
<b>Fungos Filamentosos</b>		
<i>Microsporium canis</i> CEMM 01-2-133	-	N.A.
<i>Trichophyton rubrum</i> CEMM0 1-1-100	-	N.A.
Hemolysis %	-	N.A.

N.I: Não Identificado; N.A.: Não ativo em concentrações até 200 µM.

## 5. DISCUSSÃO

Todos os animais pluricelulares estão sujeitos ao freqüente desafio microbiano e ao ataque de endo ou ectoparasitas. Ao lado das defesas contra predadores, a sobrevivência depende, além de outros fatores, da presença de um sistema de defesa imune eficiente, onde o organismo patogênico deve ser rapidamente eliminado ou inativado.

Foram identificados três peptídeos com atividade antimicrobiana, além de seis frações com potencial atividade antifúngica, presentes na secreção cutânea da pele de *L. pentadactylus* (Anura, Leptodactylidae). Esse estudo focou na purificação e caracterização do pico Lpp27 denominado leptoglicina (LPG).

Um novo peptídeo, leptoglicina, isolado da secreção da pele de *L. pentadactylus*, foi caracterizado bioquímica e biologicamente. A leptoglicina não representou um candidato ideal para o sequenciamento por MS/MS devido sua hidrofobicidade e seqüência repetitiva, entretanto, o peptídeo apresenta uma completa dissociação como representado na Figura 7. Inicialmente a seqüência foi deduzida através de sequenciamento por MS/MS (Figura 8) e em seguida foi confirmada por degradação de Edman. A seqüência de aminoácidos da leptoglicina foi deduzida e confirmada quimicamente é: Gly-Leu-Leu-Gly-Gly-Leu-Leu-Gly-Pro-Leu-Leu-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Leu-Leu.

A comparação da leptoglicina com proteínas e peptídeos revelou homologia com três grupos: 1) proteínas e peptídeos e ricos em glicina; 2) peptídeos antimicrobianos de anfíbios denominados de XT's, isolados de *Silurana tropicalis* (Ali et al.,2001) e 3) família de peptídeos de anfíbios ricos em Gly-Leu

chamados de dermaseptinas, isolados da secreção da pele de hílideos sul americanos da subfamília Phyllomedusinae (Vanhoye et al.,2004).

Primeiramente a leptoglicina apresentou alta homologia com proteínas e peptídeos ricos em glicina. As proteínas ou peptídeos ricos em glicina (GRPs – *glycine-rich proteins or peptides*) são caracterizados, de uma forma geral, por conter mais do que 60% de glicina e repetidos *motifs* em sua seqüência e tem sido encontradas em diversos organismos, tais como plantas, insetos, aranhas e mamíferos. A comparação da leptoglicina com proteínas e peptídeos ricos em glicina mostrou um alto grau de similaridade com: proteína 4 associada ao carcinoma de epitélio palatino, pulmonar e nasal da rã *Xenopus tropicalis* (UniProt UPI000069F3E7) e de origem humana (UniProt P59827); uma proteína de defesa de plantas (GRP PETHY) (Condit e Meagher, 1987); um peptídeo antimicrobiano, a acanthoscurrina, isolado de hemócitos de aranha *Acanthoscurria gomesiana* (Lorenzini et al., 2003) e proteínas antifúngicas de insetos (holotricina 3 e tenecina 3) (Lee et al. 1995; Jung et al. 1995).

Os GRPs apresentam um alto conteúdo de glicina: acanthoscurrina, 71%; GRP PETHY, 67%; holotricina 3, 63%, leptoglicina, 59% e proteína 4 humana 51% tenecina 3, 41%. A similaridade entre as seqüências é dada principalmente devido ao alinhamento dos resíduos de glicina (Figura 9).

Primeiramente, utilizando-se o programa FASTA, quando a seqüência da leptoglicina foi apresentada sob seqüência de clusters e não proteínas individuais, foi encontrado 89% de homologia com proteína 4 de *Xenopus* (UniProt UPI000069F3E7) (Figures 9 e 10). A partir disso, encontramos uma homologia de 59% da leptoglicina com a proteína 4 associado ao carcinoma de epitélio palatino, pulmonar e nasal, de origem humana (UniProt P59827). Essas

proteínas são membros da família de proteínas BPI/LBP e são utilizadas como mecanismo de defesa primária reconhecendo e removendo odorantes (toxinas) potencialmente nocivos ou microrganismos patogênicos da mucosa. Essas proteínas ligam-se com alta afinidade a lipopolissacarídeos, um glicolípídeo encontrado na membrana externa de bactérias Gram-negativas (Beamer et al., 1998). A leptoglicina, inicialmente é efetiva contra bactérias Gram-negativas e possui uma forte homologia com a proteína 4.

Outro GRP, a acanthoscurrina apresentou 59% de homologia com leptoglicina. A comparação da leptoglicina demonstrou que sua seqüência de aminoácidos alinha melhor com a acanthoscurrina que é um peptídeo antimicrobiano isolado de aranha do que com outros peptídeos antimicrobianos de anfíbios (Figura 10). Ambas possuem um alto componente hidrofóbico que pode estar associado a alto teor de Gly e Leu prevalecendo em sua seqüência. A acanthoscurrina possui efeito bactericida sobre bactéria Gram-negativa *E. coli*, em uma concentração de 5,6  $\mu\text{M}$  (Lorenzini et al., 2003) e a leptoglicina apresenta efeito antibacteriano sobre bactérias Gram-negativa como *P. aeruginosa* a uma concentração de 8,0  $\mu\text{M}$  (Tabela 2).

Interessantemente, a leptoglicina apresentou também 59% de similaridade com uma proteína isolada da planta *Petunia hybrida* denominada GRP PETHY (Condict e Meagher, 1987). A atividade biológica das proteínas ricas em glicina de plantas não é conhecida. Contudo, sabe-se que as plantas superiores apresentam mecanismo de proteção em várias situações de estresse, tais como ataques de patógenos, ferimentos, presença de produtos químicos incluindo fitohormônios, metais pesados, poluentes do ar e raios ultravioletas, entre outras. Nesta reação, conhecida como resposta de defesa das plantas

superiores, uma série de proteínas são ativamente sintetizadas e por isso, são chamadas de “proteínas relacionadas à defesa”.

Testes antifúngicos utilizando modelos de levedura e fungos demartófitos revelaram a ausência de atividade antifúngica da leptoglicina a diversas concentrações (Tabela 2), entretanto outros peptídeos ricos em glicina, na qual a leptoglicina apresentou alto grau de similaridade, holotricina 3 (54% de similaridade), isolado de *Holotrichia diomphalia* (coleóptera) (Lee et al., 1995) e tenecina 3 (50% de similaridade), isolada de *Tenebrio molitor* (coleóptera) (Jung et al., 1995) apresentam atividade contra *C. albicans* (Lee et al., 1995; Jung et al., 1995).

Poucos peptídeos ricos em glicina têm sido isolados da secreção da pele de anfíbios e é importante notar que os peptídeos isolados de planta (GRP1 PETHY) e aranha (acanthoscurrina) alinham melhor com a leptoglicina do que os peptídeos isolados da pele de anfíbios (Figura 9 e 10). Além disso, a conservação da estrutura primária dos peptídeos ricos em glicina ao longo da evolução sugere que esses peptídeos podem possuir um adicional e importante papel biológico além de sua atividade antimicrobiana. Por outro lado, a conservação dos genes que codificam proteínas ricas em glicina ao longo das espécies, a forte homologia da leptoglicina com essas proteínas e sua atividade contra bactérias Gram-negativas, levam a crer que a leptoglicina é um cripeptídeo de uma (GRP) de *L. pentadactylus*, ou seja, a LPG pode ter sido resultado de um processo de clivagem de proteínas intactas ricas em Gly que podem não ter ou ter atividade antibacteriana. Dessa forma, estudos futuros para o isolamento e caracterização da proteína precursora da LPG e sua atividade se fazem importantes para o

conhecimento da sua função no organismo, como também investigar outras atividades biológicas importantes.

Outro grupo de peptídeos que apresentam homologia com a leptoglicina são os peptídeos antimicrobianos de anfíbios denominados de XT's isolados da secreção da pele de anfíbios da rã *Silurana tropicalis* (formalmente *Xenopus tropicalis*) (Ali et al., 2001). Particularmente XT6 e XT7 (45% de homologia) estão mais próximos da LPG na árvore de alinhamento dos outros peptídeos antimicrobianos de anfíbios (Figura 10). Embora ambos os peptídeos possuam um alto componente hidrofóbico, XT7 é o único peptídeo antimicrobiano que possui uma seqüência idêntica de sete aminoácidos (GLLGPLL), na qual um resíduo de prolina alinha com a seqüência da LPG (Figure 9, seta). Esse resíduo de prolina em  $\alpha$ -hélices pode criar um dobra na estrutura do peptídeo devido à ausência de um próton amido que normalmente criaria uma ponte de hidrogênio, isto é comumente encontrado em peptídeos que formam  $\alpha$ -hélices anfipáticas. Em particular, esse resíduo muitas vezes aparece na região central de peptídeos ativos em membrana e ela pode representar a chave para o processo translocação ou penetração na membrana do microorganismo (Yang et al., 2006). Em adição, a prolina central em peptídeos que formam  $\alpha$ -hélices é importante para as rápidas interações eletrostáticas com as cargas negativas das membranas lipídicas, inicialmente crucial para efetiva translocação dos peptídeos antimicrobianos (Yang et al., 2006). Essa característica pode ser observada na buforina II, descobertas no estômago do sapo asiático *Bufo bufo gargarizans* (Park et al., 1996). Esse peptídeo é eficiente em atravessar a camada bicamada lipídica (Park et al., 1998) e possui uma alta afinidade de ligação com DNA e RNA (Park et al., 2000). Existe uma dobra interna de prolina na buforina II, que é a

chave estrutural para a propriedade de penetração na célula e um fator crítico para a determinação da potencial atividade antimicrobiana da buforina II (Kobayashi et al., 2004). Dessa forma, é interessante realizar futuros estudos que investiguem o papel da prolina central na estrutura rica em glicinas e no mecanismo de ação específico para bactérias Gram-negativas da leptoglicina (tabela 02).

A leptoglicina apresenta de 30 a 45% de homologia com as plasticinas, peptídeos membros da superfamília das dermaseptinas (isolados da secreção da pele de hidriscos sul americanos da subfamília Phyllomedusinae) (Figura 9). Além disso, a leptoglicina contém uma seqüência rica em resíduos de Gly e Leu, e possui repetidos e regulares *motifs* GXXXG em sua seqüência, similarmente aos *motif* das plasticinas (Vanhoye et al., 2004). Essas repetições formam um extenso *motif* de glicina-zipper (GXXXGXXXGXXXGXXXG) em sua estrutura primária.

Contudo é importante observar que a leptoglicina é um peptídeo neutro e possui 36% de homologia com duas plasticinas neutras DPR-PD 3-6 e ANC (Figura 9) que são desprovidos de atividade antimicrobiana. O peptídeo DPR-PD 3-6 adota uma estrutura helical quando se liga a vesículas aniônicas, mas forma predominantemente uma estrutura de  $\beta$ -folha na presença de fosfolipídeos zwitteriônicos. Em contraste, o peptídeo ANC apresenta predominante estrutura  $\beta$ -folha com ambos os tipos de vesículas. O fato é que estrutura do DPR-PD 3-6 difere grandemente na presença de vesículas aniônicas e zwitteriônicas demonstrando que esse peptídeo possui uma versatilidade conformacional em contato com a superfície de membranas, isto é, a seqüência de aminoácidos pode assumir diversas conformações dependendo quase exclusivamente do ambiente molecular lipídico. As plasticinas neutras (DPR-PD 3-6 e ANC) interagem com



vesículas aniônicas e zwitteriônicas principalmente via interações hidrofóbicas. Apesar DRP-PD 3-6 e ANC serem inativas contra bactérias, elas interagem com vesículas DMPG, causando leves perturbações na interface da membrana, mas induzem significativas perturbações no interior da membrana, sugerindo uma inserção do peptídeo dentro da membrana bacteriana. Elas interagem com vesículas DMPC sem causar perturbações na interface ou no interior da bicamada, entretanto esses peptídeos apresentam atividade hemolítica *in vitro* (El Amri e Nicolas, 2008).

Na literatura, poucos peptídeos com uma rede de cargas zero, isolados de rãs, foram reportados (Mangoni et al., 2001; Isaacson et al., 2002; Thompson et al., 2007; El Amri e Nicolas, 2008) (ver Tabela 4). Todos esses peptídeos são descritos como inativos contra cepas de bactérias e possuem atividade hemolítica *in vitro* (Tabela 4). A ausência de atividade inibitória de crescimento dos peptídeos neutros contra bactérias é consistente com a proposta que a rede de cargas positivas é importante para se ligarem aos fosfolipídeos negativamente carregados da membrana da parede bacteriana (Dathe e Wieprecht, 1999). Entretanto, recentemente isolada, a ocellatina 4 é caracterizada por possuir uma rede de cargas nula, porém possui fraca atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas (Nascimento, 2007) demonstrando que mesmo com a ausência de cargas o peptídeo pode interagir com membranas carregadas negativamente causando morte celular por mecanismos que devem ser esclarecidos. A descoberta da leptoglicina, caracterizada possuir uma rede de cargas nula e apresentar atividade contra bactérias Gram-negativas (MIC 8,0 $\mu$ M contra *P. aeruginosa*) reforça essa possibilidade. Por outro lado, a maioria dos peptídeos neutros apresentou atividade hemolítica, provavelmente resultante de

características da molécula, tais como, alto índice de resíduos hidrofóbicos e presença de um C-terminal amidado. A leptoglicina não apresentou atividade hemolítica, ela é o peptídeo menos hidrofóbico do grupo e não possui C-terminal amidado (Tabela 4). Embora existam poucos estudos biofísicos sobre a avaliação das interações de peptídeos neutros com modelos em membranas, a atividade antimicrobiana identificada na leptoglicina e sua estrutura peculiar abrem perspectivas para realização estudos de novos mecanismos pelos quais peptídeos, apesar de neutros, possam ser ativos, ou seja, interagir e causar danos a membrana de bactérias.

Outro importante aspecto, é que a seqüência da leptoglicina é constituída de 59% de glicinas. A glicina possui um importante papel na permeabilização da membrana e na flexibilidade conformacional de muitos peptídeos. Além disso, um crescente número de estudos tem demonstrado que a versatilidade estrutural dos peptídeos em contato com a membrana pode levar a alternativos mecanismos de ações. A Clavinina constitui um interessante exemplo de que a flexibilidade conformacional, dirigida principalmente pelas glicinas, é o maior fator determinante de sua atividade antimicrobiana. A classe II das bacteriocinas, incluindo brochocinas, termofilinas, plantarinas ou lactococinas também são peptídeos ricos em glicinas e que apresentam uma plasticidade conformacionais, assim como as plasticinas (Kan et al., 2001; El Amri, et al., 2007). Futuros estudos que investiguem a função das numerosas glicinas na estrutura da leptoglicina são importantes para entender seu papel para sua atividade antimicrobiana, além disso, a leptoglicina poderá ser considerada um modelo de peptídeo neutro ativo guiado pela sua flexibilidade estrutural.

**Tabela 4** – Seqüência de aminoácidos, características físico-químicas e biológicas de peptídeos neutros isolados da secreção de anfíbios.

Peptídeo	Seqüência	Carga pH 7.0	Resíduos hidrofóbicos (%)	Atividade hemolítica	MIC ( $\mu$ M)	
					<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Bombina GH-1L e GH-1D	IIGPVLGLVGKPLESLLE-NH <sub>2</sub>	0	50	+	N.A	N.A
Phylloseptina - 14	FLSLIPAAISAVSALADHF-NH <sub>2</sub>	0	68	N.I	N.A	N.A
Temporina -1JA	ILPLVGNLLNDLL-NH <sub>2</sub>	0	62	N.I	>100	>100
DRP-PD 3-6	GVVTDLLNTAGLLGNLVGSLSGGER – NH <sub>2</sub>	0	38	+	N.A	N.A
Ocellatina 4	GLLDFVTGVGKDIFAQLIKQI-NH <sub>2</sub>	0	52	+	64	64
Leptoglicina	GLLGLLGPLLGGGGGGGGLL	0	36	-	50	N.A

É importante assinalar que a leptoglicina foi também alinhada com família peptídeos antimicrobianos do gênero *Leptodactylus* e esta apresentou uma baixa homologia.

Classicamente peptídeos antimicrobianos são testados contra cepas patogênicas humanas para a pesquisa de novos antibióticos. Realmente, poucos estudos têm sido realizados com cepas bactérias de ocorrência do ambiente natural, tais como as que estão presentes na pele de anfíbios (Ashcroft, et al., 2007). De fato, a síntese e a liberação de peptídeos antimicrobianos na pele de anfíbios dependem do ambiente e fatores espécie-específicos (Matute et al., 2000; Magoni et al., 2001). Leptoglicina apresenta atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas isoladas da pele de *L. pentadactylus*, *P. aeruginosa*, *A. veronii* and *C. freundii* (Tabela 2). Além disso, a habilidade desses peptídeos inibirem o crescimento de cepas de bactéria de referência *P.aeruginosa*, *C. freundii* and *E. coli* (Tabela 2), sugerindo que este pode ser utilizado como ferramenta para o desenvolvimento de uma nova classe de drogas antibióticas.

## 5. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra a presença, na secreção da pele de *L. pentadactylus*, de diversas moléculas que servem como elementos na defesa deste anfíbio contra microorganismos invasores. De especial interesse está à identificação da leptoglicina uma molécula que age especificamente contra cepas de bactérias Gram-negativas e com uma estrutura não usual que parece ser a descoberta de uma nova classe de peptídeos antimicrobianos. O estudo aprofundado de sua estrutura e de seu mecanismo de ação mostra-se muito promissor. Além disso, este trabalho prepara caminho para futuros estudos sobre o uso dessa molécula como ferramenta para o desenvolvimento de novas drogas antibióticas.

## 6. REFERÊNCIAS

Ali, M.F.; Soto, A.; Knoop, F.C.; Conlon, J.M. Antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the diploid frog, *Xenopus tropicalis* (Pipidae), *Biochim. Biophys. Acta* 1550 (2001), 81-89.

Amiche, M.; Se ´on, A.; Pierre, T. N.; Nicolas, P. The dermaseptin precursors: a protein family with a common pre-proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 456 (1999), 352-356.

Andersson, E.; Sorensen, O.E.; Frohm, B.; Borregaard, N.; Egesten, A.; Malm, J. Isolation of human cationic antimicrobial protein-18 from seminal plasma and its association with prostasomes. *Human Reproduction* 17 (2002), 2529-2534.

Apponyi, M.A.; Pukala, T.L.; Brinkworth, C.S. Host-defense peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. *Peptides* 25 (2004), 1035-1054.

Arrighi, R. B. G.; Nakamura, C.; Miyake, J.; Hurd, H.; Burgess, J. G. Design and activity of antimicrobial peptides against sporogonic-stage parasites causing murine malarias. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002), 2104-2110.

Avrahami, D.; Shai, Y. Conjugation of a Magainin Analogue with Lipophilic Acids Controls Hydrophobicity, Solution Assembly, and Cell Selectivity. *Biochemistry* 41 (2002), 2254-2263.

Baker, M. A.; Maloy, W. L.; Zasloff, M.; Jacob, L. S. Anticancer efficacy of magainin 2 and analogue peptides. *Cancer Res.* 53 (1993), 3052-3057.

Bals, R.; Wang, X.; Zasloff, M.; Wilson, J.M. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998), 9541–9546.

Basir, Y.J.; Conlon, J.M. Peptidomic analysis of the skin secretions of the pickrel frog *Rana palustris* identifies six novel families of structurally-related paptides. *Paptides* 24 (2003), 379-383.

Batista, C.V.F.; Rosendo da Silva, L.; Sebben, A.; Scaloni, A.; Ferrara, L.; Paiva, G.R.; Olamendi-Portugal, T.; Possani, L.D.; Bloch Jr., C. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomadusa distincta*. *Paptides* 20 (1999), 679-686.

Bellamy, W.; Takase, M.; Yamauchi, K.; Wakabayashi, H.; Kawase, K.; Tomita, M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1121 (1992), 130-136.

Bessalle, R.; Haas, H.; Gorla, A.; Shalit, I.; Fridkin, M. Augmentation of the Antibacterial Activity of Magainin by Positive- Charge Chain Extension. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36 (1992), 313-317.

Boevé, J. –L.; Kuhn-Nentwig, L.; Keller, S.; Nentwig, W. Quantity and quality of venom released by a spider (*Cupiennius salei*, Ctenidae). *Toxicon* 33 (1995), 1347-1357.

Boman, H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine* 254 (2003), 197-213.

Boman, H.G. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* 65 (1991), 205-207.

Boman, H. G.; Agerberth, B.; Boman, A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect. Immun.* 61 (1993), 2978-2984.

Braff, M.H.; Bardan, A.; Nizet, V.; Gallo, R. Cutaneous Defense Mechanisms by antimicrobial peptides. *J. Invest. Dermatol.* 125 (2005), 9-13.

Brand, G. D.; Leite, J. R.; Silva, L. P.; Albuquerque, S.; Prates, M. V.; Azevedo, R. B.; Carregaro, V.; Da Silva, J. S.; Sa, V. C.; Brandao, R. A.; e Bloch, C. Jr. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002), 49332-40.

Brilhante, R.S.N.; Cordeiro, R.A.; Medrano, D.J.; Monteiro, A.J.; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G. Antifungal susceptibility and genotypical pattern of *Microsporum canis* strains. *Can. J. Microbiol.* 51 (2005), 507–510.

Brito, E.H.S.; Fontenelle, R.O.S.; Brilhante, R.S.N.; Cordeiro, R.A.; Soares Jr, F.A.; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *M. pachydermatis* strains from dogs. *Vet. J.* 174 (2007), 147–153.

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

Brown, K.L.; Hancock, R.E.W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.* 18 (2006), 24-30.



Bulet, P.; Hetru, C.; Dimarcq, J. –L.; Hoffmann, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Develop. Comp. Immunol.* 23 (1999), 329-344.

Bulet, P.; Stocklin, R.; Menin, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Reviews* 198 (2004), 169-184.

Bulet, P.; Urge, L.; Ohresser, S.; Hetru, C.; Otvös, L. Enlarged scale chemical synthesis and range of activity of drosocin, an O-glycosylated antibacterial peptide of *Drosophila*. *Eur. J. Biochem.* 238 (1996), 64 – 69.

Casteels, P.; Tempst, P. Apidaecin-type peptide antibiotics function through a nonporeforming mechanism involving stereospecificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 (1994), 339-345.

Chen, T.; Tang, L.; Shaw, C. Identification of three novel *Phyllomedusa sauVagei* dermaseptins by cloning from a skin secretion-derived cDNA library, *Regul. Peptides* 116 (2003), 139-46.

Chen, Y.; Xu, X.; Hong, S.; Chen, J.; Liu, N.; Underhill, C. B.; Creswell, K.; Zhang, L. RGD-tachyplesin inhibits tumor growth. *Cancer Res.* 61(2001), 2434-2438.

Chromek, M.; Slamova, Z.; Bergman, P.; Kovacs, L.; Podracka, L.; Ehrén, I.; Hökfelt, T.; Gudmundsson, G.H.; Gallo, R.L.; Agerberth, B.; Brauner, A. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nature Medicine* 12 (2006), 636-641.

Conceição, K.; Konno, K.; Richardson, M.; Antominazzi, M.M.; Jared, C.; Daffre, S.; Camargo, A.C.M.; Pimenta, D.C. Isolation and biochemical characterization of

pptides presenting antimicrobial activity from the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides* 27 (2006), 3092-3099.

Conde, R.; Zamudio, F.Z.; Rodriguez, M.H.; Possani, L.D. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.* 471 (2000), 165–168.

Condit, C.M.; Meagher, R.B. Expression of a gene encoding a glycine-rich protein in petunia. *Mol. Cell Biol.* 7(1987), 4273-4279.

Conlon, J. M.; Kolodziejek, J.; Nowontny, N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochim. Biophys. Acta* 1696 (2004), 1-14.

Conlon, J.M.; Seidel, B.; Nielsen, P.F. An atypical member of the brevinin-1 family of antimicrobial peptides isolated from the skin of the European frog *Rana dalmatina*. *Comp. Biochem. Physiol.* 137 (2004), 191-196.

Cowland, J.B.; Johnsen, A.H.; Borregaard, N. hCAP-18, a cathelin/ pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett.* 368 (1995), 173–176.

Cruciani, R. A.; Barker, J. L.; Zasloff, M.; Chen, H. C.; Colamonici, O. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 (1991), 3792-3796.

Daher, K. A.; Selsted, M. E.; Lehrer, R. I. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J. Virol.* 60 (1986), 1068-1074.

Ganz, T.; Lehrer, R. I. Defensins. *Pharmacol. Ther.* 66 (1995), 191-205.

Dangl, J. L.; Jones, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411 (2001), 826-833.

Dann, S.M.; Eckmann, L. Innate immune defenses in the intestinal tract. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23 (2007), 115-120.

Dathe, M.; Wieprecht, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biocim. Biophys. Acta* 1462 (1999), 71-87.

De Lucca, A.J.; Walsh, T.J. Antifungal peptides: Origin, activity and therapeutic potencial. *Rev. Iberoam. Micol.* 17 (2000), 116-120.

Delatorre, P.; Olivieri, J. R.; Ruggiero Neto, J.; Lorenzi, C. C. B.; Canduri, F.; Fadel, V.; Konno, K.; Palma, M. S.; Yamane, T.; de Azevedo, W. F. Preliminary cryocrystallography analysis of an eumenine mastoparan toxin isolated from the venom of the wasp *Anterhynchium flavomarginatum* micado. *Biochim. Biophys. Acta* 1545 (2001), 372-376.

Delfino G.; Drewes R.C.; Magherini S.; Malentacchi C.; Nosi D.; Terreni A. Serous cutaneous glands of the Pacific tree-frog *Hyla regilla* (Anura, Hylidae): Patterns of secretory release induced by nor-epinephrine. *Tissue and Cell* 38 (2006), 65–77.

Delfino, G.; Brizzi, R.; Alvarez, B. B.; Kracke-Berndorff, R. Serous cutaneous glands in *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae): secretory patterns during onto-genesis. *Tissue Cell* 30 (1998), 30–40.

Egorov, T.A.; Odintsova, T.I.; Pukhalsky, P.A.; Grishin, E.V. Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides* 26 (2005), 2064-73.

El Amri, C. Bruston, F. Joanne, P., Lacombe., Intrinsic flexibility and structural adaptability of plasticins membrane-damaging peptides as strategy for functional versatility. *Eur. Biophys. J.* 36 (2007), 901 – 909.

El Amri, C.; Lacombe, C.; Zimmerman, K.; Ladran, A.; Amiche, M.; Nicolas, P.; Bruston, F. The plasticins: membrane adsorption, lipid disorders, and biological activity. *Biochemistry* 45 (2006), 14285-14297.

El Amri, C.; Nicolas, P. Plasticins: membrane-damaging peptides with chameleon-like properties. *Cell. Mol. Life. Sci.* 65 (2008), 895-909.

Espamer, V.; Melchiorri, P. Active polypeptides: from amphibian skin to gastrointestinal tract and brain of mammals. *TIPS* (1980), 391-395.

Fehlbaum, P.; Bulet, P.; Chernysh, S.; Briand, J.-P.; Roussel, J.-P.; Leitellier, L.; Hetru, C.; Hoffmann, J. A. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (1996), 1221-1225.

Fernandez-Lopez, S.; Kim, H. S.; Choi, E. C.; Delgado, M.; Granja, J. R.; Khasanov, A.; Kraehenbuehl, K.; Long, G.; Weinberger, D. A.; Wilcoxon, K. M.; Ghadiri, M. R. Antibacterial agents based on the cyclic D,L-alpha-peptide architecture. *Nature* 412 (2001), 452-455.

Frohm, M.; Agerberth, B.; Ahangari, G.; Stahle-Backdahl, M.; Liden, S.; Wigzell, H.; Gudmundsson, G. H. The expression of the gene coding for the antibacterial

peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), 15258-15263.

Ganz, T.; Lehrer, R. I. Defensins. *Pharmacol. Ther.* 66 (1995), 191-205.

Gomes V.M.; Carvalho, A.O.; Da Cunha, M.; Keller, M.N.; Bloch Jr., C.; P. Deolindo, P.; Alves, E.W. Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 45 (2005), 817–827.

Gudmundsson, G. H.; Lidholm, D. A.; Asling, B.; Gan, R.; Boman, H. G. The cecropin locus. Cloning and expression of a gene cluster encoding three antibacterial peptides in *Hyalophora cecropia*. *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 11510-11517.

Hancock, R.E.W. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *LANCET Infect. Diseases*.1 (2001), 156-164.

Hancock, R. E. W.; Diamond, G. The role of cationic antimicrobial peptide in innate host defences. *Trends Microbiol.* 8 (2000), 402-410.

Hancock, R.E.W.; Lehrer, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Tibtech* 16 (1998), 82-88.

Hancock, R.E.W.; Sahl, H-G. Antimicrobial and host defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature* 24 (2006), 1551-1557.

Hancock, R.E.W.; Scott, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000), 8856-8861.

Harder, J.; Meyer-Hoffert, U.; Teran, L. M.; Schwichtenberg, L.; Bartels, J.; Maune, S.; Schröder, J-M. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- $\alpha$ , and IL-1, but not IL-6, induce human  $\beta$ -defensin-2 in respiratory epithelia. *Am. J. Resir. Cell Mol. Biol.* 22 (2000), 714-721.

Herbinière, J.; Braquart- Varnier, C.; Grève, P.; Strub, J-M.; Frère, J.; Dorselaer, A.V.; Martin, G. Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). *Develop. and Compar. Immun.* 29 (2005), 489-499.

Hirakura, Y.; Kobayashi, S.; Matsuzaki, K. Specific interactions of the antimicrobial peptide cyclic beta-sheet tachyplesin I with lipopolysaccharides. *Biochim. Biophys. Acta* 1562 (2002), 32-36.

Hoffmann, J. A.; Kafatos, F. C.; Janeway, C. A.; Ezekowitz, R. A. Phylogentic perspectives in innate immunity. *Science* 284 (1999), 1313-1318.

Huang, C.M.; Chen, H.C.; Zierdt, C.H. Magainin analogs effective against pathogenic protozoa. *Antimicrob Agents Chemother* 34 (1990), 1824–1826.

Hultmark, D.; Engstrom, A.; Andersson, K.; Steiner, H.; Bennich, H.; Boman, H.G. Insect immunity: Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* 2 (1983), 571-576.

Huttner, K. M.; Lambeth, M. R.; Burkin, H. R.; Burkin, D. J.; Broad, T. E. Localization and genomic organization of sheep antimicrobial peptide genes. *Gene* 206 (1998), 85-91.

Isaacson, T.; Soto, A.; Iwamuro, S.; Knoop, F. C.; Conlon, J. M. Antimicrobial peptides with atypical structural features from the skin of the Japanese brown frog *Rana japonica*. *Peptides* 23 (2002), 419-425.

Kagan, B. L.; Selsted, M. E.; Ganz, T.; Lehrer, R. I. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 (1990), 210-214.

Keller, B; Sauer, N.; Lamb, C.J. Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO J.* 7 (1988), 3625-3633.

Kieffer, A.-E.; Goumon, Y.; Ruh, O.; Chasserot-Golaz, S.; Nullans, G.; Gasnier, C.; Aunis, D.; Metz-Boutigue, M.-H. The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *FASEB J.* 17 (2003), 776-778.

Kim, H.J.; Kim, S.S.; Lee, M.H.; Lee, B.J.; Ryu, P.D. Role of C-terminal heptapeptide in pore-forming activity of antimicrobial agent, gaegurin 4. *J. Peptide Res.* 64 (2004), 151-158.

Kimbrell, D. A.; Beutler, B. The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Reviews Genetics* 2 (2001), 256-266.

Kourie, J. I.; Shorthouse, A. A. Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *Am. J. Physiol-Cell Physiol.* 278 (2000), C1063-C1087.

Kreil, G. Structure of melittin isolated from two species of honeybees. *FEBS Lett.* 54 (1973), 241-244.

Kwak, K.J.; Kim, Y.O.; Kang, H. Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. *J. Experim. Bot.* 56 (2005), 3007-3016.

Lacombe, C.; Cifuentes-Diaz, C.; Dunia, I.; Auber-Thomay, M.; Nicolas, P.; Amiche, M. Peptide secretion in the cutaneous glands of South American tree frog *Phyllomedusa bicolor*: an ultrastructural study. *Eur. J. Cell Biol.* 79 (2000), 631–641.

Lamberty, M.; Zachary, D.; Lanot, R.; Bordereau, C.; Robert, A.; Hoffmann, J.; Bulet, P. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. *J. Biol. Chem.* 276 (2000), 4085–4092.

Larrick, J.W.; Hirata, M.; Balint, R.F.; Lee, J.; Zhong, J.; Wright, S.C. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.* 63 (1995), 1291–1297.

Lequin, O.; Ladram, A.; Chabbert, L.; Bruston, F.; Nicolas, P.; Amiche, M. Dermaseptin S9, an alpha-helical antimicrobial peptide with a hydrophobic core and cationic termini. *Biochemistry* 45 (2006), 468 – 480.

Lindholm, P.; Göransson, U.; Johansson, S.; Claesson, P.; Gullbo, J.; Larsson, R.; Bohlin, L.; Backlund, A. Cyclotides: a novel type of cytotoxic agents. *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002), 365-369.

Lorenzini, D. M.; Silva, P. I. Jr.; Fogac, A. C.; Bulet, P.; Daffre, S. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the



hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Develop. and Comp. Immun.* 27 (2003), 781–791.

Mangoni, M. L.; Rinaldi, A. C.; Di Giulio, A.; Mignogna, G.; Bozzi, A.; Barra, D.; Simmaco, M. Structure-function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000), 1447-1454.

Mangoni, M.L.; Grovaleb, N.; Giorgi, A.; Mignognab, G.; Simmacoa, M.; Barrab, D. Structure-function relationships in bombinins H, antimicrobial peptides from *Bombina* skin secretions. *Peptides* 21 (2000), 1673–1679.

Marcotte, I.; Wegener, K.L.; Lam, Y-H.; Chia, B.C.S.; De Planque, M.R.R.; Bowie, J.H.; Auger, M. Interaction of antimicrobial peptides from Australian amphibians with lipid membranes. *Chem. Phys. Lip.* 122 (2003), 107-120.

Matsuzaki, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1376 (1998), 391-400.

Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Miyajima, K.; McIntosh, T. J.; Holloway, P. W. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing iposomes as a model for outer membranes of gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* 4492 (1999), 221-224.

Matsuzaki, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Bioch. et Biophys. Acta* 1462 (1999), 1-10.

Matsuzaki, K.; Yoneyama, S.; Fujii, N.; Miyajima, K.; Yamada, K.; Kirino, Y.; Anzai, K. Membrane permeabilization mechanisms of a cyclic antimicrobial peptide, tachyplesin I, and its linear analog. *Biochemistry* 36 (1997), 9799-9806.

McGwire, B.S.; Olson, C.L.; Tack, B.F.; Killing of African trypanosomes by antimicrobial peptides. *J. Infect. Dis.* 188 (1993), 146–152.

Meister, M.; Lemaitre, B.; Hoffmann, J.A. Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *BioEssays* 19 (1997), 1019-1026.

Moffitt, M. C.; Neilan, B. A. The expansion of mechanistic and organismic diversity associated with non-ribosomal peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 191 (2000), 159-167.

Moore, A. J.; Devine, D. A.; Bibby, M. C. Preliminary experimental anticancer activity of cecropins. *Pept. Res.* 7 (1994), 265-269.

Mousavi, A.; Hotta, Y. Glycine-rich proteins: a class of novel proteins. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 120 (2005), 169-174.

Nomata, T.; Kabeya, Y.; Sato, N.V. Cloning and characterization of glycine-rich RNA binding protein cDNAs in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.* 45 (2004), 48-56.

Park, C.B.; Kim, M.S.; Kim, S.C. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 218 (1996), 408-413.

Pelegrini, P.B.; Franco, O.L. Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005), 2239- 53.

Pelegriani, P.B.; Murad, A.M.; Silva, L.P.; Dos Santos, R.C.P.; Costa, F.T.; Tagliari, P.D.; Bloch Jr., C.; Noronha, E.F.; Miller, R.N.G.; Franco, O.L. Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against gram-negative bacteria. *Peptides* 8 (2008), 1271-1279.

Perez-Paya, E.; Houghten, R. A.; Blondelle, S. E. Determination of the secondary structure of selected melittin analogs with different hemolytic activities. *Biochem. J.*, 299 (1994), 587-591.

Peschel, A.; Sahl, H-G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature* 4 (2006), 529-536.

Pimenta, D. C.; Lebrun, I. Cryptides: buried secrets in proteins. *Peptides* 28 (2007), 2403-10.

Pukala T.L.; Bowie J.H.; Maselli V.M.; Musgrave I.F.; Tyler M.J. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. *Nat. Prod. Rep.* 23 (2006), 368-393.

Reddy, K.V.R.; Yedery, R.D.; Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Intern. J. Antimic. Agents* 24 (2004), 536-547.

Rinaldi, A. C.; Di Giulio, A.; Liberi, M.; Gualtieri, G.; Simmaco, M.; Barra, D.; Bozzi, A. Effects of temporins on molecular dynamics and membrane permeabilization in lipid vesicles. *J. Pept. Res.* 58 (2001), 213-220.

Rinaldi, A.C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. *Current Opinion in Chemical Biology* 6 (2002), 799-804.

Ringli, C.; Keller, B.; Ryser, U. Glycine-rich protein as structural components of plant cell walls. *Cell Mol. Life Sci.* 58 (2001), 1430-1441.

Robinson Jr., W. E.; McDougall, B.; Tran, D.; Selsted, M. E. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 63 (1998), 94-100.

Miyasaki, K. T.; Lehrer, R. I.  $\beta$ -Sheet antibiotic peptides as potential dental therapeutics. *Int. J. Antimicrob. Agents* 9 (1998), 269-280.

Robinson Jr., W. E.; McDougall, B.; Tran, D.; Selsted, M. E. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 63 (1998), 94-100.

Rollins-Smith, L.A.; Reinert, L.K.; Miera, V.; Conlon, J.M. Antimicrobial peptide defenses of the Tarahumara frog, *Rana tarahumarae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 (2002), 361-367.

Rozek, T.; Wegener, K.L.; Bowie, J.H.; Olver, I.N.; Carver, J.A.; Wallace, J.C.; Tyler, M.J. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000), 5330-5341.

Ryan, L. K.; Rhodes, J.; Bhat, M.; Diamond, G. Expression of beta-defensin gene in bovine alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 66 (1998), 878-881.

Schröder, J-M. Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999), 121-134.

Scocchi, M.; Wang, S.; Zanetti, M. Structural organization of the bovine cathelicidin gene family and identification of a novel member. *FEBS Lett.* 417 (1997), 311-315.

Selitrennikoff, C.P. Antifungal proteins. *Appl. Envir. Microbiol.* 67 (2001), 2883-2894.

Selsted, M.E.; Novotny, M.J. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J. Biol. Chem.* 267 (1992), 4292–4295.

Silva, P.I. Jr.; Daffre, S.; Bulet, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 33464–33470.

Simmaco, M.; Mignogna, G.; Barra, D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* 47 (1998), 435-450.

Simmaco, M.; Mignogna, G.; Canofeni, S.; Miele, R.; Mangoni, M. L.; Barra, D. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur. J. Biochem.* 242 (1996), 788-792.

Sitaram, N.; Nagaraj, R. Host-defense Antimicrobial Peptides: Importance of Structure for Activity. *Current Pharm. Design* 8 (2002), 727-742.

Someya, K.; Matsuo, Y.; Wakamatsu, K.; Mukai, H. Cryptides: Functional Cryptic Peptides Hidden in Protein Structures. *Biopolymers (Peptide Science)* 88 (2007), 190-198.

Soravia, E.; Martini, G.; Zasloff, M. Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Lett.* 228 (1988), 337-340.

Spencer, J. H. Antimicrobial peptides of frog skin. *Adv. Enzyme Regul.* 32 (1992), 117-129.

Subbalakshmi, C.; Bikshapathy, E.; Sitaram, N.; Nagaraj, R. Antibacterial and Hemolytic Activities of Single Tryptophan Analogs of Indolicidin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 274 (2000), 714-716.

Taylor, R. H.; Acland, D. P.; Attenborough, S.; Cammue, B. P.; Evans, I. J.; Osborn, R. W.; Ray, J. A.; Rees, S. B.; Broekaert, W. F. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seeds of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), 24480 – 24487.

Tamamura, H.; Ishihara, T.; Otaka, A.; Murakami, T.; Ibuka, T.; Waki, M.; Matsumoto, A.; Yamamoto, N.; Fujii, N. Analysis of the interaction of an anti-HIV peptide, T22 ([Tyr<sup>5</sup>, 12, Lys<sup>7</sup>]-polyphemusin II), with gp120 and CD4 by surface plasmon resonance. *Biochim. Biophys. Acta* 1298 (1996), 37-44.

Thompson, A.H.; Bjourson, A.J.; Orr, D.F.; Shawb, C.; McClean, S. A combined mass spectrometric and cDNA sequencing approach to the isolation and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretions of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*. *Peptides* 28 (2007), 1331–1343.

Tsai, H.; Bobek, L. A. Human salivary histatins: promising anti-fungal therapeutic agents. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9 (1998), 480-497.

Yang, D.; Biragyn, A.; Kwak, L. W.; Oppenheim, J. J. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 23 (2002), 291-296.

Utsugi, T.; Schroit, A. J.; Connor, J.; Bucana, C. D.; Fidler, I. J. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res.* 51 (1991), 3062-3066.

VanCompernelle, S.E.; Taylor, R.J.; Oswald-Richter, K.; Jiang, J.; Youree B.E.; Bowie, J.H.; Tyler, M.J.; Conlon, J.M.; Wade, D.; Aiken, C.; Dermody, T.S.; KewalRamani, V.N.; Rollins-Smith, L.A.; Unutmaz, D. Antimicrobial Peptides from Amphibian Skin Potently Inhibit Human Immunodeficiency Virus Infection and Transfer of Virus from Dendritic Cells to T Cells. *JOURNAL OF VIROLOGY* (2005), 11598-11606.

Vanhoye, D.; Bruston, F.; Nicolas, P.; Amiche, M. Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *Eur. J. Biochem.* 270 (2003), 2068–2081.

Wachinger, M.; Kleinschmidt, A.; Winder, D.; Von Pechmann, N.; Ludvigsen, A.; Neumann, M.; Holle, R.; Salmons, B.; Erfle, V.; Brack-Werner, R. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *J. Gen. Virol.* 79 (1998), 731-740.

Wang, T.; Zhang, J.; Shen, J-H.; Jin, Y.; Lee, W-H.; Zhang, Y. Maximins S, a novel group of antimicrobial peptides from toad *Bombina maxima*. Bioch. Biophys. Res. Comm. 327 (2005), 945-951.

Wang, W.; Owen, S.M.; Rudolph, D.L.; Cole, A.M.; Hong, T.; Waring, A.J.; Lal, R.B.; Lehrer, R.I. Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1. J. Immunol. 173 (2004), 515–520.

Westermeier, R.; Raven, T. Proteomics in Practice. Weinheim, Wiley-VCH (2002).

White, S.H.; Wimley, W.C.; Selsted, M.E. Structure, function, and membrane integration of defensins. Current Opinion in Structural Biology 5 (1995), 521-527.

Won, H-S.; Kim, S.S.; Jung, S-J.; Son, W-S.; Lee, B.;Lee, B-J. Structure-activity relationships of antimicrobial paptides from the skin of *Rana esculenta* inhabiting in Korea. Mol. Cells. 17 (2004), 469-476.

Yang, L.; Harroun, T. A.; Weiss, T. M.; Ding, L.; Huang, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. Biophys. J. 81 (2001), 1475-1485.

Yang, S.T.; Lee, J.Y.; Kim, H.J.; Eu, Y.J.; Shin, S.Y.; Hahm, K.S.; Kim, J.I. Contribution of a central proline in model amphipathic  $\alpha$ -helical peptides to self-association, interaction with phospholipids, and antimicrobial mode of action. FEBS J. 273 (2006), 4040-4054.



Yeaman, M.R.; Yount, N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55 (2003), 27-55.

Yoo, Y. C.; Watanabe, S.; Watanabe, R.; Hata, K.; Shimazaki, K.; Azuma, I. Bovine lactoferrin and Lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* 443 (1998), 285-291.

Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415 (2002), 389-395.

Zasloff, M. Defending the epithelium. *Nat. Med.* 12 (2006), 607-608.

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

Zasloff, M.; Martint, B.; Chen, H.-C. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 (1988), 910-913.

Zhang, L.; Yu, W.; He, T.; Yu, J.; Caffrey, R.E.; Dalmasso, E.A.; Fu, S.; Pham, T.; Mei, J.; Ho, J.J.; Zhang, W.; Lopez, P.; Ho, D.D. Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science* 298 (2002), 995–1000.

Zhao, H.; Rinaldi, A. C.; Giulo, A. D.; Simmaco, M.; Kinnunen, P. K. F. Interactions of the antimicrobial peptides temporins with model biomembranes. Comparison of temporin B and L. *Biochemistry* 41 (2002), 4425-4436.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)