



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

LABORATÓRIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA

LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO, EXPRESSÃO E INDUÇÃO DE GENES
QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM *Hypsiboas*
raniceps POR FERRAMENTAS DE BIOLOGIA MOLECULAR E
ESPECTROMETRIA DE MASSA.**

Eder Alves Barbosa

Orientador: Dr. Carlos Bloch Júnior

Co-orientador: Dr. Alan Carvalho Andrade

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia Molecular.

Brasília-DF, Fevereiro de 2010.

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Carlos Bloch Júnior (Orientador) – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

Dr. Octavio Luiz Franco – Universidade Católica de Brasília;

Dr^a. Elisabeth F. Schwartz – Universidade de Brasília.

**Dedico essa dissertação à minha família e
aos meus amigos.**

AGRADECIMENTOS...

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, pela vida e por toda sua “complexidade”. Esta que faz da rotina de um biólogo um verdadeiro e prazeroso desafio. Obrigado, Senhor!.

De forma mais que especial, agradeço aos meus pais, Vicente de Paula Barbosa e Terezinha Alves Dias, aqueles que sempre cuidaram de mim, me educaram e me ensinaram os valores de ser simples, honesto, esforçado, respeitoso e de lutar pelos meus objetivos. Obrigado, pai e mãe, eu amo muito vocês! Agradeço, também, a toda a minha família, em especial aos meus irmãos (mais especialmente ainda à Tânia, à Clébia e ao Clé), aqueles que sempre me ajudaram e que nunca negaram demonstrações de amor e carinho por minha pessoa.

Aos amigos, parte importantíssima em qualquer etapa na vida. Talvez seja difícil lembrar aqui o nome de todos, porém, em especial: Alan Silva, Felipe Vinecky, Gabriel, José Roberto, Antônio Carlos, Marcelo Oliveira, Anderson BO, Alessandra (minha sobrinha mais velha de quem eu mais gosto) e Raquel. Aos amigos do Ministério de Música Servos de Cristo: Léo, Clécia, Renê, Diego e Lúcio, por tantos anos de convivência musical e familiar.

Obrigado aos amigos e companheiros de laboratório por tornarem a execução desse projeto uma atividade tão prazerosa e fazerem do ambiente de pesquisa um lugar no qual o tempo não importa: à galera do LGBM: Alan Andrade, Felipe, Gabriel, Pierre, Ingrid, Kelly, Natália Taioba, Luciana, Mônica e Mariana; do LEM: Bloch, Maura, Luciano, Guilherme, Carol Verde, Flávio, Karla, Natália, Beatriz, Saulo, Marcelo, Sifú, Mariana Quezado, Keliane, Carol, Tatiane e Lindomar; da Agroenergia: Marry, Maria, Hugo, Bárbara e Betúlia. A todos que passaram pelos laboratórios, especialmente a Michelle Cotta. Um agradecimento especial ao pessoal do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília por toda ajuda,

aprendizagem e parceria, em especial à Poliana, pelas madrugadas de experimentos. Obrigado a todos pelo auxílio intelectual, vocês todos fazem parte da minha formação.

Obrigado, Felipe e Lindomar, pela companhia nas diversas saídas de campo realizadas, por tornarem essas obrigações mais um momento prazeroso desse projeto. Valeu, Lindomar, por garantir nosso churrasco no final da madrugada. Agradeço ao Cezão e a Marivan por nos receberem de forma tão prestativa e gratuita na fazenda Saranã, em Flores de Goiás, e por nos oferecerem toda estrutura de acampamento.

Um obrigado muito justo e necessário aos meus orientadores e amigos Carlos Bloch Júnior e Alan Carvalho Andrade por toda a convivência, aprendizagem e por me aceitarem como aluno. Obrigado por acreditarem em meu potencial e me ensinarem os valores da ciência. Com vocês tenho aprendido que a pesquisa é uma atividade séria, a qual requer muita responsabilidade, mas que deve ser realizada de forma prazerosa. Obrigado pelo exemplo singular de vida acadêmica e por apoiarem o projeto aqui apresentado.

Agradeço, também, ao Luciano Paulino Silva e ao Pierre Marraccini, pesquisadores da Embrapa e do CIRAD, respectivamente. Agradeço por toda ajuda, ensinamento e profissionalismo.

Ao meu amigo e professor José Roberto Sousa Almeida Leite. Valeu, Zé. Foi participando de suas aulas que eu descobri a paixão que tenho pela biologia. Além disso, você foi o culpado por eu gostar tanto da pesquisa envolvendo as pererecas. Obrigado por me convidar para fazer parte desse grupo de pesquisa e por todos os ensinamentos, principalmente, por aqueles adquiridos nas diversas saídas de campo que realizamos.

Ao Departamento de Biologia Molecular da Universidade de Brasília por me aceitar em seu corpo discente, em especial à secretária Ana por todo o seu profissionalismo. Ao CNPQ

pela bolsa de estudos e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo espaço físico, equipamentos e todo o suporte necessário ao desenvolvimento desse projeto.

Por fim, obrigado a todos aqueles que de uma maneira ou de outra me apoiaram no desenvolvimento desse projeto.

Sumário

I. ÍNDICE DE FIGURAS	4
II. ÍNDICE DE TABELAS	6
III. ABREVIATURAS.....	7
IV. RESUMO.....	8
V. ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. A PELE DOS ANFÍBIOS.....	10
1.2. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS ISOLADOS A PARTIR DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE ANFÍBIOS	11
1.2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS	11
1.2.2. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM ANUROS	13
1.3. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. JUSTIFICATIVA.....	19
4. MATERIAL.....	21
4.1. OLIGONUCLEOTÍDEOS:.....	21
4.2. MEIOS DE CULTURA PARA CRESCIMENTO DE MICRO-ORGANISMOS:	22
4.3. ENZIMAS:	24
4.4. KITS COMERCIAIS UTILIZADOS:	24
4.5. SOLUÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE RNA	24
4.6. SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE:	25
4.7. SOLUÇÕES PARA O ISOLAMENTO DE PLASMÍDEOS.....	25
4.8. SOLVENTES PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	26
4.10. MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS	28
5. MÉTODOS	29
5.1. LICENÇAS E AUTORIZAÇÕES	29
5.2. CAPTURA DOS ANIMAIS:	29
5.3. OBTENÇÃO DA SECREÇÃO:.....	29
5.4. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS APÓS ESTÍMULO ELÉTRICO:.....	30

5.5. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE GENES INDUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS:.....	30
5.6. DISSECÇÃO DA PELE:	31
5.7. IMAGEM POR ESPECTROMETRIA DE MASSA (IMS):.....	32
5.8. ISOLAMENTO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA:	32
5.9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DOS RNAs QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM <i>H. raniceps</i> :.....	33
5.10. ANÁLISE DE DNA/RNA EM GEL DE AGAROSE:	34
5.11. RECUPERAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DO GEL DE AGAROSE: 34	
5.12. LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA EM VETOR:	35
5.13. TRANSFEÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES POR MEIO DE ELETROPORAÇÃO, E SELEÇÃO DAS COLÔNIAS DE INTERESSE:	35
5.14. ISOLAMENTO DE DNA PLAMIDEAL	36
5.15. SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO DE NUCLEOTÍDEOS.....	37
5.16. CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS E PREPARO DAS SOLUÇÕES VISANDO A ESTIMULAÇÃO DA SÍNTESE DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM <i>H. raniceps</i> :	38
5.17. DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL (QPCR):.....	39
5.18. ENSAIOS DE EXPRESSÃO RELATIVA POR MEIO DE PCR EM TEMPO REAL (QPCR):40	
5.19. ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS/NUCLEOTÍDICAS:	40
6. RESULTADOS	41
6.1. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DE RNAs QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS:.....	41
6.2. DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA ENSAIOS DE qPCR:	45
6.3.1. CINÉTICA DE EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS APÓS A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA:	49
6.3.2. IMAGENS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DOS TECIDOS ISOLADOS APÓS A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA:	52
6.4.1. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS QUANDO <i>H. raniceps</i> É SUBMETIDA AO CONTATO COM DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS	58

6.4.2. IMAGENS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DOS TECIDOS ISOLADOS DE <i>H. raniceps</i> QUANDO ESTA É SUBMETIDA AO CONTATO COM DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS	64
7. DISCUSSÃO	66
8. CONCLUSÃO	75
9. PERSPECTIVAS.....	76
10. ANEXO I. Sequências nucleotídicas dos cDNAs que codificam pré-pró-peptídeos antimicrobianos caracterizados em <i>H. raniceps</i>.....	77
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corte histológico do tecido cutâneo dorsal de <i>Dendropsophus minutus</i> evidenciando glândula mucosa (A) e glândula granular (B).	11
Figura 2. Alinhamento de aminoácidos da estrutura primária de pré-pró-peptídeos antimicrobianos preditos a partir do sequenciamento de cDNAs isolados de diferentes anfíbios anuros.....	15
Figura 3. Análise em gel de agarose a 1% para verificação da integridade do RNA total isolado a partir dos tecidos cutâneos de <i>H. raniceps</i>	41
Figura 4. Análise em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR obtidos a partir do cDNA de <i>H. raniceps</i> utilizando os oligonucleotídeos	42
Figura 5. Sequência nucleotídica de um cDNA que codifica um pré-pró-peptídeo antimicrobiano obtido a partir do tecido cutâneo de <i>H. raniceps</i>	43
Figura 6. Curvas de dissociação dos produtos de PCR realizadas após o ensaio de quantificação relativa por qPCR para análise da especificidades dos oligonucleotídeos aos transcritos de interesse.	48
Figura 7. Cinética dos níveis de transcrição de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em <i>H. raniceps</i> após estímulo elétrico.	51
Figura 8. Cinética dos níveis de transcrição dos grupos de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em <i>H. raniceps</i> após estímulo elétrico.....	52
Figura 9. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de <i>H. raniceps</i> realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado de um animal que não sofreu estimulação elétrica cujo tecido foi obtido no primeiro dia de experimento	53
Figura 10. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de <i>H. raniceps</i> realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado imediatamente (zero hora).....	54
Figura 11. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de <i>H. raniceps</i> realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado 12 horas após o estímulo elétrico.	54
Figura 12. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de <i>H. raniceps</i> realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado 24 horas após o estímulo elétrico.	55
Figura 13. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de <i>H. raniceps</i> realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado 36 horas após o estímulo elétrico.	55
Figura 14. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de <i>H. raniceps</i> realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado 48 horas após o estímulo elétrico.	56

Figura 15. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de <i>H. raniceps</i> realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado 72 horas após o estímulo elétrico.	56
Figura 16. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de <i>H. raniceps</i> realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado 96 horas após o estímulo elétrico.	57
Figura 17. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de <i>H. raniceps</i> realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado 120 horas após o estímulo elétrico.	57
Figura 18. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de <i>H. raniceps</i> realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado de um animal que não sofreu estimulação elétrica cujo tecido foi obtido no último dia de experimento.....	58
Figura 19. Expressão relativa de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em <i>H. raniceps</i> após os anfíbios terem sido submetidos ao contato com diferentes microorganismos por um período de 12 horas.	60
Figura 20. Expressão relativa de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em <i>H. raniceps</i> após os anfíbios terem sido submetidos ao contato com diferentes microorganismos por um período de 36 horas.	61
Figura 21. Expressão relativa de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em <i>H. raniceps</i> após os anfíbios terem sido submetidos ao contato com diferentes microorganismos por um período de 12 horas. Os dados relativos ao controle 2 foram omitidos.	62
Figura 22. Expressão relativa de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em <i>H. raniceps</i> após os anfíbios terem sido submetidos ao contato com diferentes microorganismos por um período de 36 horas. Os dados relativos ao controle 2 foram omitidos.	63
Figura 23. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de <i>H. raniceps</i> realizadas por meio de espectrometria de massa após o contato destes com microorganismos.	65

II. ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados complementares à região 3' de cDNAs/RNAs.....	21
Tabela 2. Oligonucleotídeos degenerados complementares à região 5' de cDNAs que codificam peptídeos antimicrobianos em Hylídeos.....	22
Tabela 3. Mistura de peptídeos utilizados para a calibração do espectrômetro de massa.	28
Tabela 4. Linhagens de micro-organismos utilizados.....	28
Tabela 5. Ciclos de temperatura para PCR.....	33
Tabela 6. Oligonucleotídeos para reação de sequenciamento.	37
Tabela 7. Oligonucleotídeos específicos utilizados como controle endógeno de expressão nos ensaios de qPCR.	39
Tabela 8. Alinhamento das sequências de aminoácidos que compõem os pré-pró-peptídeos obtidos a partir da tradução <i>in silico</i> dos RNAs isolados da pele de <i>H. raniceps</i>	44
Tabela 9. Massas mono-isotópicas teóricas dos peptídeos maduros preditos a partir da clivagem enzimática <i>in silico</i> dos pré-pró-peptídeos antimicrobianos caracterizados.....	45
Tabela 10. Oligonucleotídeos específicos para ensaios de PCR quantitativo.....	46
Tabela 11. Eficiência de amplificação do oligonucleotídeos sintetizados para a utilização nos ensaios de qPCR.	47

III. ABREVIATURAS

EDTA.....	Ácido etilenodiaminotetracético
dCTP.....	Desoxicitosina 5' – trifosfato
dGTP.....	Desoxiguanidina 5' – trifosfato
dATP.....	Desoxiadenina 5' – trifosfato
dTTP.....	Desoxitimina 5' – trifosfato
DNA.....	Ácido desoxirribonucléico
RNA.....	Acido ribonucléico
mRNA.....	RNA mensageiro
dNTP.....	Desoxirribonucleotídeos 5' – trifosfato
G.....	Força G
IPTG.....	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosideo
kb.....	Kilobases
p/v.....	Peso/volume
pb.....	Pares de base
PCR.....	Reação em cadeia da polimerase
pH.....	Potencial hidrogeniônico
RNAse.....	Ribonuclease
rpm.....	Rotações por minuto
U.....	Unidade enzimática
UV.....	Ultravioleta
v.....	Volume
v/v.....	Volume/volume
X-gal.....	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactose
N-terminal.....	Amino-terminal
C-terminal.....	Carboxi-terminal
SDS.....	Sódio dodecil sulfato
Tris.....	Tri(hidroximetil)aminometano

IV. RESUMO

O presente trabalho descreve um modelo experimental que permite avaliar as alterações nos níveis de transcrição de RNAs, síntese e processamento de peptídeos presentes nas secreções cutâneas de anfíbios. A partir deste modelo, foram utilizadas ferramentas de biologia molecular em associação com técnicas de obtenção de imagens moleculares por espectrometria de massa, com o objetivo de avaliar como *Hypsiboas raniceps* reage a um modelo experimental no qual anfíbios são submetidos a diferentes tipos de estresses (bióticos e abióticos). A utilização das técnicas de biologia molecular conjugadas a imagens de íons moleculares por espectrometria de massa permitiu as análises dos níveis de transcrição de diversos genes, assim como da síntese dos peptídeos codificados a partir destes, em uma mesma região do tecido animal. Os resultados sugerem que a aplicação do estímulo elétrico (estresse abiótico) promove um aumento imediato dos níveis de transcrição dos genes e seus respectivos peptídeos antimicrobianos em *H. raniceps* o qual se estende por até 36 horas, período no qual as glândulas granulares tornam-se carregadas de peptídeos novamente e os níveis de transcrição voltam a diminuir. De forma análoga aos dados anteriores, a presença de micro-organismos (Estresse biótico) na pele de *H. raniceps* parece estimular o sistema imune inato de defesa ao promover o aumento dos níveis de transcrição dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos. Sob condições experimentais complementares às anteriores, anfíbios submetidos ao contato tópico com os antibióticos, oxacilina, gentamicina e ampicilina, apresentaram níveis de expressão gênica superiores àqueles dos anfíbios que foram expostos unicamente a micro-organismos. O modelo experimental proposto apresenta-se como uma estratégia alternativa para estudos de análise da expressão diferencial de peptídeos em tecidos biológicos.

V. ABSTRACT

The present work describes a strategy for *in situ* identification of antimicrobial peptides present in frog skin, their respective RNA transcription levels and peptide synthesis variation analysis. The chosen experimental model is based on molecular biology and imaging mass spectrometry (IMS) techniques to investigate the antimicrobial peptide skin composition of *Hypsiboas raniceps* when the anuran is submitted to biotic and abiotic stress. Under a mild electrical shock stimulation high transcriptional levels of RNA encoding antimicrobial peptides can be observed for 36 hours, only after that antimicrobial peptides ions are detected by IMS experiments whereas the transcriptional levels decrease. When the animals are exposed to pathogenic microorganisms (biotic stress) there is an evident increase in gene expression levels leading to a corresponding increment on antimicrobial polypeptide content in the skin. In a complementary experiment, frogs were washed with an antibiotic solution, containing oxacillin, gentamicin and ampicilin. Under this conditions superior RNA expressions levels than the previous experiments were observed suggesting that the microorganism-based molecules that composed the antibiotic solution may have triggered the defense mechanism more efficiently. The experimental model introduced here represents an alternative strategy for differential gene expression analysis and peptides identification directly on biological tissue.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A PELE DOS ANFÍBIOS

A classe Amphibia abrange três ordens: Anura (sapos, rãs e pererecas), Caudata (salamandras) e Gymnophiona (cecílias ou cobras-cegas) (DUELLMAN e TRUEB, 1994). Existem 6433 espécies de anfíbios descritas em todo o mundo (Amphibian Species of the World - <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> - acessado em 25 de Janeiro de 2010). No território brasileiro, são 849 espécies descritas, das quais 821 pertencem à ordem Anura (Sociedade Brasileira de herpetologia - <http://www.sbherpetologia.org.br/>). A pele dos anfíbios é um órgão que desempenha papéis importantes e imprescindíveis para a manutenção fisiológica normal destes organismos. Entre estes, destacam-se: a respiração, o transporte de água e solutos, a regulação osmótica, a regulação da temperatura corporal e a defesa contra predadores e micro-organismos (SEBBEN et al., 1993). A defesa contra micro-organismos patogênicos é importante porque a pele desses animais é um ambiente favorável para o crescimento de bactérias e fungos (TOLEDO e JARED, 1995). Existem dois tipos de glândulas na pele da maioria dos anfíbios: glândulas mucosas e glândulas granulares (Figura 1). As glândulas mucosas, menores e em maior número, são responsáveis por manter a pele úmida e escorregadia por meio da secreção de mucinas. As glândulas granulares, por outro lado, são maiores e apresentam-se em menor número, as quais estão localizadas, principalmente, na parte dorsal da pele desses animais. As glândulas granulares são responsáveis pela produção, armazenamento e liberação de moléculas bioativas, como peptídeos antimicrobianos (TOLEDO e JARED, 1995; DOCKRAY e HOPKINS, 1975).

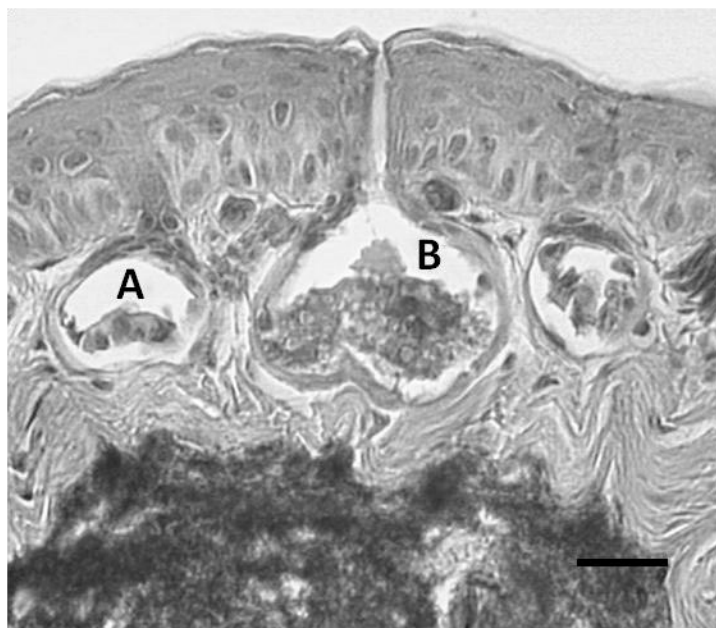


Figura 1. Corte histológico do tecido cutâneo dorsal de *Dendropsophus minutus* evidenciando glândula mucosa (A) e glândula granular (B). A barra horizontal representa uma escala de 5 μm (Fornecido pelo pesquisador Luciano Paulino Silva – Embrapa Cenargen).

1.2. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS ISOLADOS A PARTIR DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE ANFÍBIOS

1.2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS

A produção de peptídeos antimicrobianos em anfíbios faz parte do sistema imune inato, um mecanismo essencial de defesa em organismos multicelulares cuja função é agir como a primeira barreira de proteção contra o ataque e proliferação de micro-organismos patogênicos (BROWN E HANCOCK, 2006). A estrutura primária dos primeiros peptídeos isolados a partir da secreção de anfíbios foi determinada por CSORDÁS E MICHL (1969) enquanto estudavam as toxinas do anfíbio *Bombina variegata*. No entanto, a atividade antimicrobiana desses peptídeos ainda não havia sido caracterizada. ZASLOFF (1987) foi o primeiro a descrever a atividade antimicrobiana de peptídeos caracterizados a partir da secreção cutânea de anfíbios. Estudando a espécie *Xenopus laevis*, o autor isolou, caracterizou e determinou a atividade

antimicrobiana de dois peptídeos, nomeados de Magainina 1 e Magainina 2. Desde então, já foram caracterizados centenas de peptídeos antimicrobianos, isolados a partir da secreção cutânea de várias espécies de anfíbios. Tais peptídeos possuem atividade contra um amplo espectro de patógenos microbióticos e estão agrupados em, pelo menos, 26 famílias distintas (Antimicrobial Peptide Database - <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> - acessado em 25 de janeiro de 2010).

Os peptídeos antimicrobianos isolados a partir da secreção cutânea de anfíbios possuem uma grande diversidade em estrutura primária. No entanto, a maioria desses peptídeos compartilha características físico-químicas comuns, como: carga positiva, devido, principalmente, à presença de resíduos catiônicos em sua estrutura primária; tamanho pequeno, com peptídeos apresentando entre 10-50 resíduos de aminoácidos; e estrutura tridimensional em forma de α -hélice anfipática quando estão em meio apolar (NICOLAS et al., 2003). Especula-se que essas características físico-químicas, comuns aos peptídeos antimicrobianos de anfíbios, sejam essenciais para a sua ação na inibição do crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, assim como, protozoários (MAGALHÃES et al., 2008; BRAND et al., 2006; LEITE et al., 2005; SHAI, 2002; GIANGASPERO et al., 2001; SHAI, 1999; WIEPRECHT et al., 1997;).

A desestabilização de membranas biológicas tem sido considerada o mecanismo pelo qual os peptídeos antimicrobianos exercem sua função, agindo como detergentes, ou formando poros (MEINCKEN et al., 2005; MECKE et al., 2005). No entanto, evidências sugerem que tal desestabilização pode ser apenas um dos mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos agem (SAHL et al., 2005). De qualquer forma, a interação entre os peptídeos antimicrobianos e as membranas biológicas alvo é, aparentemente, imprescindível para a ação destes.

1.2.2. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM ANUROS

Os peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea de anfíbios são sintetizados e processados a partir da tradução de um RNA mensageiro característico o qual contém regiões altamente conservadas entre aqueles pertencentes às famílias Hylidae e Ranidae, principalmente (NICOLAS et al., 2003). Os genes responsáveis pela transcrição de RNAs que codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios possuem em sua estrutura pelo menos dois éxons separados por uma região não codificadora pequena (CHEN et al., 2005; MIELE et al., 1998; VOUILLE et al., 1997). O “éxon1” codifica a sequência de aminoácidos que forma a região do peptídeo sinal, assim como, os primeiros aminoácidos de uma região que contém vários resíduos de aminoácidos carregados negativamente, conhecida como região acídica. O “éxon2” codifica o restante da sequência de aminoácidos da região acídica e a sequência de aminoácidos do que virá a ser o peptídeo ativo. Dessa forma, após o processamento do RNA, a tradução do RNA mensageiro nas células cutâneas dos anfíbios resulta em um pré-pró-peptídeo que comunga três regiões distintas, as quais estão demarcadas pela presença de sítios de clivagem enzimática reconhecidos por serino-proteases do tipo tripsina: uma região de peptídeo sinal formada por 20-27 resíduos de aminoácidos; uma região acídica, rica em resíduos de ácido glutâmico, formada por cerca de 20 resíduos de aminoácidos; e a região do peptídeo ativo, que pode ser constituída por polímeros contendo 10 a 50 resíduos de aminoácidos, os quais serão estocados nas glândulas granulares após o processamento (CHEN et al., 2005; TERRY et al., 1988). Alguns peptídeos sofrem modificações pós-traducionais, dentre as quais, a amidação C-terminal é a mais frequente (PUKALA et al., 2006).

As regiões que compreendem o peptídeo sinal e a região acídica dos pré-pró-peptídeos antimicrobianos de anfíbios são altamente conservadas entre aqueles pertencentes a diferentes gêneros, e, até mesmo, entre anfíbios pertencentes a famílias distintas (NICOLAS et

al., 2003; VANHOYE et al., 2003), em contraste com a região do peptídeo ativo, a qual pode ser altamente variável entre as diferentes espécies (Figura 2). Muitos grupos de pesquisa têm utilizado essa informação para caracterizar estruturas de RNAs que codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios com o auxílio de técnicas de RT-PCR. Oligonucleotídeos específicos complementares às regiões conservadas de tais RNAs são utilizados com o objetivo de selecionar transcritos por meio de PCR. Recentemente, Magalhães e colaboradores (2008) demonstraram, com o auxílio de técnicas de sequenciamento de cDNAs e espectrometria de massa, que peptídeos isolados a partir da secreção cutânea de *Hypsiboas raniceps* sofrem processamento proteolítico após a sua secreção na pele. Este trabalho demonstrou que alguns peptídeos com atividade antimicrobiana encontrados na pele de *H. raniceps*, denominados de Raniseptinas, sofrem clivagem enzimática em sítios específicos, gerando fragmentos peptídicos que possuem baixa atividade antimicrobiana. Outros ensaios biológicos devem ser realizados com o objetivo de investigar uma possível função desses peptídeos gerados a partir da clivagem enzimática.

Espécie	Peptídeo sinal	Região ácida	Sequência progenitora do peptídeo antimicrobiano
<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	MAFLKHSFLVLFGLVPLSFCENDKR	---EGENEE-EQDDD-QSEEKR	ALGT-LLKGVSAVATVGNMVDQFGKLLQAGQG-
<i>Pachymedusa dactinolor</i>	MAFLKHSFLVLFGLVPLSFCENEKR	---EGENEK-EENDD-QSEEKR	SLGS-FMKGVGGLATVGNIVADQFGKLEAGKG-
<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	MAFLKHSFLVLFGLMVSLSICEEKR	---ENDEEL-QEDDEQSEMKR	GLMS-TIKNVGK-----EAAIAAGKAAL-GAL-
<i>Agalychnis annae</i>	MAFLKHSFLVLFGLMVSLSICEEKR	---EEENE-----QEDDEQSEEKR	GMFTWMLKIGLAL---AGQAAALGAVKTLA-GEQ-
<i>Phyllomedusa bicolor</i>	MDILKHSFLVLFGLVLSISICEEKR	---ENEDEE-KQDDE-QSEMKR	AMWADVLLKIGTVALHGAALGAVADTISQGEQ-
<i>Litoria splandida</i>	MAFLKHSFLVLFGLVFSVSIICEEKR	QEDEDEHVEEENQEEGSEEKR	GLLSVL-GSVAKH---VLPHVVPVIAEHLG----
<i>Litoria caerulea</i>	MASLKHSLFVLFGLVFSVSIICEEKR	QEDEDENEEEGESQEEGSEEKR	GLFGLAKGSVAK-----PHVVPVISQLVG----
<i>Litoria infrafirenata</i>	MHFLKHSIFLVLFGLVLSISICEEKR	---EDQNEEEVDEMEEESEEKR	GLMSVLGHAVGN-----VLGGLFKPKS----
<i>Amolops loloensis</i>	MFTLKHSMLLLLFFLGTISLSLCEER	NAD-EDDGE-----LEVKR	GIFALIKRTAAIFVGNLLKQAGKAGLEHLACKANNQC--
<i>Rana schmackeri</i>	MFTLKHSLLVLFGLTISLSLCEQR	AADDEDGEV-----EEVKR	GLFTLIKGAVMIGKTVAEAGKTGLELMACKVTNQC--
<i>Odorrana grahami</i>	MFTMKHSLLLLLFFIGTISLSLCEQR	DADEDEGEAL-----EEVKR	GLWDTIKQ-----AGKFFLVN-----IDAIKCKVAGGCKT
<i>Rana amurensis</i>	MFTMKHSLLLLLFFLGTISLSLCEQR	DADED--EVV-----EEVKR	GLWESIKN-----LGKFFALNI-----MEXLCKFGGGCLP
<i>Rana latouchii</i>	MFTMKHSLLVLFGLTISLSFCEEER	GADEDDVEMT---EEE-KR	GVLDTFRD-----VAIGVAKGAGTVLVKALLCKLDKSC--
<i>Rana latouchii</i>	MFTLKHSLLVLFGLTISLSFCEEER	GADEDDVEMT---EEE-KR	SILDKIKN-----VALGVAKGAGTGILKALLCKLDKSC--
<i>Rana nigrovittata</i>	MFTMKHSLLVLFGLTISLSLCEER	GADEDDGEEMT---EEEVKR	SFLSKFRD-----IALDVAKNAGKGVLTTLACKIDGSC--
<i>Rana livida</i>	MFTMKHSLLLLLFFLGTISLSLCEER	GADEDDGEMT---EEEVKR	GLLDTIKN-----MALMAAKSAGVSVLWLSCKLSKTC--
<i>Rana pipiens</i>	MFTMKHSLLVLFGLTISLSLCEQR	GADEDDGVEIT---EEEVKR	GLMDTVKN-----VAKNLAG-----HMLDKLCKITG-C--
<i>Rana versabilis</i>	MFTLKHSLLVLFGLTITLSLCEQR	GADEDDGEMT---EEEVKR	GLLDTIKN-----TAKNLAV-----GLLDKIKCKMTG-C--
<i>Rana esculenta</i>	MFTMKHSLLVLFGLTISLSLCEER	NADDDGEMT---EEE-KR	GIMDTLKN-----LAKTAGKAGALQSLVMAACKLSGGC--
<i>Limnnectes kuhlii</i>	MFTMKHSLLVLFGLTINLSLCEER	NAEEKIDGD---DENDAEVQR	FIG-----PIIKIASS-----LLPTAICKIFKKC--
<i>Amolops loloensis</i>	MFTLKHSMLLLLFFLGTINLSLCEQR	NADEEDRADD---DENDEVEEKR	FLP-----MLAGLAAN-----FLPKLFCIKTKC--
<i>Rana chybowskii</i>	MFTLKHSMLLLLFFLGTISLTLCEER	DANEENGG---EVAVEEKR	FIGP-----IISALASLFGG-----
<i>Kassina maculata</i>	MLSLSKHSMLLLLFFLGMVFSFIADDKR	EDEGEDKRADE-GEERBAAEKR	FVG-----AIAAALP-----HVISAINKALG-----

Figura 2. Alinhamento de aminoácidos da estrutura primária de pré-pró-peptídeos antimicrobianos preditos a partir do sequenciamento de cDNAs isolados de diferentes anfíbios anuros.

1.3. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

O sistema imune inato é um mecanismo de defesa evolutivamente conservado entre os animais (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002). Acionado quando o organismo é infectado por patógenos, sua ativação acontece por meio de receptores que reconhecem moléculas específicas presentes na superfície dos micro-organismos (HOFFMANN et al. 1999). Entre as moléculas que podem ser reconhecidas pelo sistema imune inato, se destacam os lipopolissacarídeos presentes nas membranas externas de bactérias Gram-negativas, peptidoglicanos de bactérias Gram-positivas e 1,3- β -D-Glucan presentes na superfície de fungos (MEDZHITOV e JANEWAY, 2002). Estudos realizados em insetos demonstram que o reconhecimento dessas moléculas pelo sistema imune inato aciona uma complexa cascata de sinalização do tipo serino-proteinase (JIANG e KANOST, 2000), a qual, em um último estágio, induz a expressão de genes que codificam fatores de transcrição do tipo $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$). Estes fatores de transcrição são sintetizados no citoplasma e posteriormente transportados ao núcleo celular, onde irão interagir com a região promotora dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos, induzindo o aumento da taxa de transcrição de tais genes (ANDERSON, 2000; LEMAITRE e HOFFMANN, 2007). Interessantemente, em moscas do gênero *Drosophila*, existem duas rotas de sinalização diferentes que levam à síntese de peptídeos antimicrobianos por meio da ação de dois tipos de fatores nucleares de transcrição distintos: DIF (dorsal-related immunity factor) e Relish. O primeiro é ativado principalmente em resposta a infecções promovidas por fungos e bactérias Gram-positivas, enquanto o segundo àquelas promovidas por bactérias Gram-negativas (LEMAITRE et al., 1996).

SCHEINMAN e colaboradores (1995) demonstraram que glicocorticóides são capazes de suprimir a síntese de peptídeos antimicrobianos em células humanas por meio da indução

de genes que codificam inibidores dos fatores de transcrição, chamados I- κ B. Esses inibidores (I- κ B) ligam-se à NF- κ B presentes no citoplasma, impedindo sua entrada no núcleo celular.

No que diz respeito à indução da expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios, foi demonstrado que a presença da bactéria *Aeromonas hydrophila* na pele de *Pelophylax esculentus* promove um aumento do pool de peptídeos presentes na secreção cutânea deste, reduzindo a proliferação bacteriana e controlando os níveis de infecção (SIMMACO et al., 1998). MIELE e colaboradores (1998) caracterizaram a presença de sítios de ligação a fatores de transcrição do tipo NF- κ B na região promotora do gene que codifica as bombininas, peptídeos antimicrobianos isolados a partir da secreção cutânea de *Bombina orientalis*, corroborando a hipótese de que o sistema inato de defesa é conservado evolutivamente entre os animais. Além disso, estudos demonstram que sapos da espécie *Pelophylax esculentus*, quando tratados com glicocorticóides, tornam-se temporariamente incapazes de sintetizar peptídeos antimicrobianos para a secreção cutânea. Como demonstrado em células de mamíferos, os glicocorticóides inibem a expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios por meio da indução da síntese de I- κ B, um inibidor de fatores de transcrição do sistema imune inato (SIMMACO et al., 1997).

2. OBJETIVOS

Determinar a estrutura de RNAs que codificam pré-pró-peptídeos antimicrobianos em *H. raniceps*. Avaliar os níveis de transcrição de seus respectivos genes. Determinar a presença e a localização de peptídeos no tecido cutâneo desse mesmo anfíbio. Propor um modelo experimental no qual seja possível analisar as variações dos níveis de transcrição de genes que codificam peptídeos antimicrobianos, assim como, de síntese de peptídeos codificados por estes, quando anfíbios são submetidos a estresses bióticos e abióticos.

3. JUSTIFICATIVA

Nicolas e colaboradores (2003) demonstraram por meio de análises filogenéticas, realizadas a partir do alinhamento de diversas sequências de pré-pró-peptídeos pertencentes a diferentes espécies de anfíbios, que, provavelmente, os peptídeos antimicrobianos encontrados na secreção cutânea de anfíbios descendem de um ancestral comum presente há, aproximadamente, 50 milhões de anos. No que diz respeito aos fatores externos que poderiam estimular a produção e posterior diversificação de peptídeos antimicrobianos na pele dos anfíbios, SIMMACO e colaboradores (1998) demonstraram que uma bactéria isolada a partir da pele do anfíbio *Pelophylax esculentus* é capaz de promover o aumento da síntese de peptídeos antimicrobianos nos anfíbios desta espécie, quando comparado a anfíbios mantidos em ambientes livres de micro-organismos. Esse trabalho demonstrou pela primeira vez que um estímulo externo é importante para que ocorra a produção de peptídeos antimicrobianos na pele de anfíbios. Este é um indício de que a grande diversidade estrutural de peptídeos antimicrobianos encontrada nas diversas espécies de anfíbios pode ser fruto de uma pressão seletiva promovida pelas interações entre o animal e os micro-organismos presentes em seu habitat natural. No entanto, nada se sabe a respeito do que acontece com os níveis de expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos específicos em anfíbios quando estes são submetidos à presença de diferentes micro-organismos patogênicos ao homem.

Os peptídeos antimicrobianos isolados a partir da secreção cutânea de anfíbios têm sido considerados, potencialmente, como uma ferramenta para o desenvolvimento de futuras drogas, por serem eficientes no combate a uma grande variedade de micro-organismos patogênicos ao homem, inclusive contra aqueles que têm adquirido resistência às drogas de uso convencional (CONLON et al., 2004; PRATES e BLOCH, 2000). Dessa forma, é importante, do ponto de vista biológico, estudar as interações que envolvem os anfíbios e os micro-organismos, buscando analisar os efeitos da presença de micro-organismos específicos

na expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos. Este é um passo importante para a compreensão dos mecanismos que promoveram a diversificação dos peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea de anfíbios.

4. MATERIAL

4.1. OLIGONUCLEOTÍDEOS:

Todos os oligonucleotídeos foram dissolvidos em água Milli-Q de forma a obter uma concentração de uso igual a 10 µM. A Tabela 1 apresenta a sequência dos oligonucleotídeos que possuem como alvo a região 3' de RNAs ou cDNAs, assim como sua aplicação.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados complementares à região 3' de cDNAs/RNAs.

Nome	Sequência (5' – 3')	Aplicação
Oligo-dT (15)	TTTTTTTTTTTTTTTT	Síntese de cDNAs visando PCR quantitativo
ED-dTAP	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTT	Síntese de cDNA visando PCR convencional
ED-AP	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	PCR

Com o objetivo de determinar a estrutura de RNAs mensageiros que codificam peptídeos antimicrobianos em *H. raniceps*, oligonucleotídeos degenerados foram desenhados e sintetizados. O desenho dos oligonucleotídeos foi feito com base na constituição dos nucleotídeos que compõe a região codificadora do peptídeo sinal de pré-pró-peptídeos antimicrobianos de anfíbios anuros da família Hylidae, cujas sequências dos cDNAs correspondentes encontram-se depositados em bancos de dados. A Tabela 2 apresenta as sequências dos oligonucleotídeos em questão.

Tabela 2. Oligonucleotídeos degenerados complementares à região 5' de cDNAs que codificam peptídeos antimicrobianos em Hylideos.

Nome	Sequência (5' – 3')
PPS-1	ATG GCT TTC CTG AAR AAR TCB CTT TTY CTT GTA CTA TTC CTT GS
PPS-1A	ATG GCT TTC CTG AAG AAA TCT CTT TTC CTT GTA CTA TTC CTT GG
PPS-2	ATG GCT TTC CTG AAR AAR TCB CTT TTY CTT GTA TTA TTT CTC GG
PPS-2A	ATG GCT TTC CTG AAG AAA TCT CTT TTC CTT GTA TTA TTT CTC GC

4.2. MEIOS DE CULTURA PARA CRESCIMENTO DE MICRO-ORGANISMOS:

Todos os meios de cultura foram autoclavados por 20 minutos a 120 °C , após solubilizar os reagentes em água Milli-Q.

Meio LB (Luria-Bertani)

Peptona de caseína – 1,0% (p/v)

Extrato de levedura – 0,5% (p/v)

NaCl – 1,0% (p/v)

pH ajustado para 7,0 com NaOH

Para meio LB sólido (LB – Agar) é adicionado Agar bacteriológico – 1,5% (p/v)

Meio Mínimo (MM)

Fosfato de potássio bibásico 0,627% (p/v)

Fosfato de potássio monobásico 0,191% (p/v)

Nitrato de sódio 0,501% (p/v)

Sulfato de magnésio 0,099% (p/v)

Sulfato ferroso 0,014% (p/v)

Glicose 8,0% (p/v)

Meio SOC

Peptona – 2,0% (p/v)

Extrato de levedura – 0,5 % (p/v)

NaCl 1M – 1% (v/v)

KCl 1M – 0,25% (v/v)

Água Milli-Q – 98 ml

Após a autoclavagem, adicionar:

Mg⁺ 2M – 1% (v/v)

Glicose 2M (filtrado) – 1% (v/v)

Filtrar a solução final em membrana biológica contendo poros com espessura igual a 0,22 µm (Millipore).

MEIO PARA CULTURA DE FUNGOS (*Aspergillus nidulans*)

KKMg 10X – 100 mL

NaNO₃ 7M – 10 mL

Ágar – 15 g (em caso de meio sólido)

Água Milli-Q – 1000 mL

Após autoclavagem, adicionar:

Glicose 20% – 50 mL

Lisina (200 mg/mL) – 1 mL

Biotina (0,2 mg/mL) – 1 mL

Timberlake* – 1 mL

***TIMBERLAKE (Micro-elementos 1000x)**

ZnSO₄.7H₂O – 76 mM – 2,20 g

H₃BO₃ – 178 mM – 1,10 g

MoCl₂.4H₂O – 25 mM – 0,50 g

FeSO₄.7H₂O – 18 mM – 0,50g

CoCl₂.6H₂O – 7,1 mM – 0,17 g

CuSO₄.5H₂O – 6,4 mM – 0,16 g

Na₂MoO₄.2H₂O – 6,2 mM – 0,15 g

EDTA – 174 mM – 5,0 g

Dissolver na ordem acima em 80 mL de água Milli-Q

Ajustar o pH para 6,5 utilizando KOH

Completar o volume para 100 mL e guardar a 4 °C protegido da luz.

4.3. ENZIMAS:

Platinum *Taq* DNA polymerase High Fidelity – 5 U/μL (Invitrogen)

ImProm II Reverse Transcriptase (Promega)

RQ1 DNase – 1 U/μL (Promega)

4.4. KITS COMERCIAIS UTILIZADOS:

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

pGEM-T and pGEM-T Easy vector system (Promega)

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen)

Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit

4.5. SOLUÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE RNA

Trizol LS Reagent – 100 mL (Invitrogen)

4.6. SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE:

Tampão de corrida para gel de agarose (TAE) 50x:

Tris-base – 24,2% (p/v)

0,5 M EDTA – 1% (v/v)

Ácido Acético Glacial – 5,71% (v/v)

Água Milli-Q - 942,9 mL

Juntar os reagentes e autoclavar a 120 °C por 20 minutos.

Tampão para amostra:

10X Loading Buffer (Invitrogen) – utilizado em uma concentração final igual a 1X.

Solução de brometo de etídio 20.000X

Brometo de etídio – 5 mg/mL

Marcadores de massas moleculares (MM) para DNA

1 Kb Ladder (Promega) – é aplicado um volume contendo 1 µg de DNA.

100 pb DNA Ladder (Promega) – é aplicado um volume contendo 1 µg de DNA.

4.7. SOLUÇÕES PARA O ISOLAMENTO DE PLASMÍDEOS

Solução I

Glicose 20% – 4,6% (v/v)

EDTA 0,5M (pH 8) – 2% (v/v)

Tris 1M (pH 7,4) – 2,6% (v/v)

Água Milli-Q – 454 mL

Solução II

NaOH 4M – 5% (v/v)

SDS (Sódio-Dodecil-Sulfato) – 1% (p/v)

Água Milli-Q – 12,75 mL

Solução III

Acetato de Potássio 5M – 60% (v/v)

Ácido acético glacial – 11,5% (v/v)

Água Milli-Q – 28,5% (v/v)

RNAse

RNAse A – 10 U/ μ L

4.8. SOLVENTES PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Solvente A (Polar) – água Milli-Q contendo ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v)

Solvente B (Apolar) – acetonitrila contendo ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v)

4.9. OUTRAS SOLUÇÕES UTILIZADAS:

Mistura de dNTPs

dATP (Promega) – 10 mM

dCTP (Promega) – 10 mM

dGTP (Promega) – 10 mM

dTTP (Promega) – 10 mM

IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosideo)

IPTG – 100 mM

A solução, preparada com água Milli-Q, é esterilizada por filtração em membrana biológica contendo poros com espessura igual a 0,22 μ m (Millipore).

X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactose)

X-gal – 20 mg/ml (dissolvido em N,N-Dimetilformamida).

Ampicilina

Ampicilina – 1 g dissolvido em água Milli-Q e esterilizada por filtração em membrana biológica contendo poros com espessura igual a 0,22 μ m (Millipore).

Oxacilina

Oxacilina/SIGMA – 100 μ g/mL

Gentamicina

Gentamicina/SIGMA – 50 μ g/mL

Matriz para ionização de peptídeos por meio de MALDI-TOF/MS

α -cyano-4-hydroxicinamico (05 mg/ml) dissolvida em acetonitrila/água/3% ácido trifluoroacético (5:4:1)

Mistura de peptídeos para calibração do espectrômetro de massa (TOF-TOF)

É adicionada uma solução de matriz para ionização na proporção de 1/1 (v/v) à mistura de peptídeos antes da calibração.

Tabela 3. Mistura de peptídeos utilizados para a calibração do espectrômetro de massa.

Peptídeo	Massa Mono-isotópica
Bradykinin(1-7)_[M+H]+_mono	757,4
Angiotensin_II_[M+H]+_mono	1046,5
Angiotensin_I_[M+H]+_mono	1296,7
Substance_P_[M+H]+_mono	1347,7
Bombesin_[M+H]+_mono	1619,8
Renin_Substrate_[M+H]+_mono	1758,9
ACTH_clip(1-17)[M+H]+_mono	2093,1
ACTH_clip(18-39)[M+H]+_mono	2465,2
Somatostatin(28)[M+H]+_mono	3147,5

4.10. MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS

Tabela 4. Linhagens de micro-organismos utilizados.

Bactéria	Linhagem
<i>Escherichia coli</i>	DH5α
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Aspergillus nidulans</i>	PAO-1 (biA1;pyrG89::pAO4-2;lysB5;fwA1;uaY9) Andrade et al (2000) MGG 263:966-977

5. MÉTODOS

5.1. LICENÇAS E AUTORIZAÇÕES

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Uso Animal da Universidade de Brasília (UnBDOC nº 29077/2009). Os animais necessários à execução deste projeto foram capturados conforme permissão legal (Licença número: 17851-1) cedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) após submissão e aprovação do projeto de pesquisa.

5.2. CAPTURA DOS ANIMAIS:

Os anfíbios foram capturados manualmente durante o período noturno, sendo localizados por meio dos sons emitidos durante a vocalização. Após a coleta, e durante o transporte, os anfíbios foram colocados individualmente em recipientes plásticos (20 x 15 cm) contendo água. Amostras das folhagens presentes no local da coleta também foram colocadas nos recipientes para forrar o fundo destes. Anfíbios da espécie *Hypsiboas raniceps* foram coletados em vegetação do tipo bioma cerrado, nas proximidades do município de Flores (GO). Todos os anfíbios eram do sexo masculino.

5.3. OBTENÇÃO DA SECREÇÃO:

A secreção cutânea dos anfíbios foi adquirida com o método não invasivo e não letal de estimulação elétrica (6 V) a qual foi realizada em duas etapas com duração de 30 segundos de estímulo. O material foi coletado com água Milli-Q em tubos de 50 mL mantidos em gelo. Após obtenção da secreção, as amostras foram filtradas (filtros Millipore) e imediatamente congeladas para liofilização.

5.4. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS APÓS ESTÍMULO ELÉTRICO:

Anfíbios da espécie *H. raniceps* foram separados em oito grupos experimentais compreendidos por três animais, cada. Todos os animais foram submetidos previamente à extração/coleta da secreção cutânea com o objetivo de depletar o conteúdo peptídico de suas glândulas granulares localizadas na pele. Os animais foram colocados juntos em cativeiro e separados em grupos experimentais, compreendidos por dois animais cada. Após períodos de tempos pré-determinados, as peles dos animais foram isoladas. Os tempos experimentais foram: 0 hora após a extração da secreção cutânea, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 120 horas. Dois grupos controles foram constituídos por três animais que não foram submetidos à extração da secreção cutânea. Os animais do grupo controle I sofreram os mesmos procedimentos executados nos grupos experimentais antes do início dos experimentos, ao passo que, os do grupo controle II sofreram os mesmos procedimentos no último dia de experimentos. Os tecidos cutâneos isolados foram utilizados para extração do RNA total visando experimentos de expressão relativa de genes por meio de PCR quantitativo - porção esquerda do tecido - e para análise dos componentes moleculares por meio de espectrometria de massa (MALDI – Imaging) - porção direita do tecido. As secreções cutâneas obtidas foram guardadas para análises futuras visando à purificação e ao seqüenciamento de peptídeos.

5.5. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE GENES INDUZIDOS POR MICRO-ORGANISMOS:

Vinte e dois anfíbios foram separados em seis grupos experimentais e dois grupos controles, compreendidos por três animais, cada (exceto os grupos experimentais I e II os quais foram compreendidos por dois animais, cada). Os animais foram colocados individualmente em

recipientes plásticos (20 x 15 cm) previamente lavados com NaOH, enxaguados com etanol 75% e esterilizados por meio de exposição à luz ultravioleta por 20 minutos. Os animais dos grupos experimentais foram submetidos a banhos, a cada seis horas, com 1 ml de solução contendo diferentes micro-organismos. Os grupos experimentais I e IV foram banhados com uma solução contendo *E. coli* (10^6 UFC/mL); os grupos experimentais II e V com *S. aureus* (10^6 UFC/mL) e o grupos experimentais III e VI com solução contendo *A. nidulans* (10^6 conídios/mL). Os anfíbios dos grupos controle I e II foram submetidos a banhos com 1 ml de solução contendo oxacilina, gentamicina e ampicilina, nas concentrações de 100, 50 e 100 µg/ml, respectivamente, também, a cada 06 horas. Os animais dos grupos experimentais I, II e III, assim como os do grupo controle I, foram submetidos aos procedimentos por um período de tempo igual a 12 horas, enquanto os animais dos grupos experimental IV, V e VI, assim como os do grupo controle II, foram expostos aos tratamentos por 36 horas. Após os períodos de exposição, as peles dorsais dos animais de cada um dos grupos, experimentais e controle, foram dissecadas e submetidas à extração de RNA total visando experimentos de expressão relativa de genes por meio de PCR quantitativo - porção esquerda do tecido - e à análise dos componentes moleculares por meio de espectrometria de massa (MALDI – Imaging) - porção direita do tecido.

5.6. DISSECÇÃO DA PELE:

Os anfíbios foram eutanasiados por dupla secção da medula espinhal. O tecido cutâneo dorsal foi isolado com o auxílio de pinças e tesouras. Os tecidos dissecados visando ao isolamento de RNA foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C.

5.7. IMAGEM POR ESPECTROMETRIA DE MASSA (IMS):

Após a dissecação, os tecidos visando experimentos de IMS foram devidamente esticados em lâminas de vidro para secagem à temperatura ambiente. Após a secagem, os tecidos foram fixados em placa de MALDI utilizando fita adesiva dupla-face. Uma camada fina de matriz para a ionização de peptídeos e proteínas foi depositada sobre os tecidos de maneira uniforme com o auxílio de pipeta. Após 60 minutos de secagem, as amostras foram submetidas à análise em espectrômetro de massa UltraFlex III TOF/TOF (Bruker Daltonics) no modo refletido. A varredura automática das amostras, e a aquisição dos dados, foi controlada com o software FlexImaging (Bruker Daltonics) ajustado para rastrear as áreas determinadas em passos únicos de 200 μm , com 50 tiros sendo disparados em cada posição e laser com intensidade igual, ou aproximada, a 30%. O mapeamento foi ajustado para a detecção dos componentes com razão m/z entre 600 e 5000. A calibração do espectrômetro foi realizada utilizando uma mistura de peptídeos, cujas massas moleculares se encontram na tabela 7, da qual foi depositada uma alíquota sobre o tecido a ser analisado. A análise das imagens obtidas foi realizada utilizando os softwares FlexImaging (Bruker Daltonics) e BioMap, este, disponível no sítio: http://www.maldi-msi.org/index.php?option=com_content&task=view&id=14&Itemid=39.

5.8. ISOLAMENTO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA:

Os tecidos foram pulverizados em nitrogênio líquido com o auxílio de pistilo e cadinho. Aproximadamente 10 mg dos tecidos pulverizados foram utilizados para a extração do RNA total, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as normas do fabricante. A integridade do RNA extraído foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%. O RNA total extraído foi submetido a um tratamento com RQ1 DNase (Promega) de acordo com as normas do fabricante, uma nova análise em gel de agarose a 1% é realizada. O RNA total foi, então, quantificado em espectrofotômetro do tipo NanoDrop, modelo ND 1000 (Uniscience),

e armazenado a – 80 °C. Um miligrama de RNA foi submetido à síntese de cDNA com a enzima ImProm II (Promega), segundo as normas do fabricante. Os cDNAs visando reações de PCR quantitativo foram sintetizados utilizando o oligonucleotídeo oligo-dT (15), ao passo que, cDNAs visando PCR cujo produto foi submetido ao seqüenciamento automático de nucleotídeos para a determinação da estrutura de RNAs que codificam peptídeos antimicrobianos foram sintetizados utilizando o oligonucleotídeo ED-dTAP (Tabela 1).

5.9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DOS RNAs QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM *H. raniceps*:

Oligonucleotídeos degenerados foram desenhados e sintetizados com base nas sequências de aminoácidos que compõe a região do peptídeo sinal de pré-pró-peptídeos antimicrobianos já descritos em anfíbios (Tabela 2). Estes foram utilizados em conjunto com o oligonucleotídeo ED-AP (Tabela 1) em reações de PCR do tipo 3'RACE. Os cDNAs sintetizados com o oligonucleotídeo ED-dTAP foram empregados como *template* em reações com a enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), segundo as normas do fabricante. Os ciclos de temperatura foram realizados em um termociclador modelo PTC-100 (MJ Research). Após o pré-aquecimento das amostras a 94 °C por 2 minutos, foram realizados os ciclos térmicos demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5. Ciclos de temperatura para PCR.

Temperatura (°C)	Tempo (s)	Repetições
94	60	4
53	60	
72	60	
94	30	30
53	30	
72	60	
72	300	0

Alíquotas das reações de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0% para análise dos fragmentos amplificados. Aqueles que apresentaram massa molecular entre 250 e 400 pb foram isolados e purificados com *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), segundo as normas do fabricante. As amostras de DNA purificadas foram submetidas à reação de ligação em vetor pGEM-T Easy (Promega), segundo as normas do fabricante, e transfectadas em *E. coli* (DH5 α) por meio de eletroporação. Após a seleção dos clones de interesse, os plasmídeos isolados foram submetidos ao sequenciamento automático de nucleotídeos.

5.10. ANÁLISE DE DNA/RNA EM GEL DE AGAROSE:

O gel de agarose foi preparado com tampão TAE 1X em concentração igual a 1% (p/v). Brometo de etídeo foi adicionado em uma concentração igual a 0,5 $\mu\text{g/mL}$. As amostras aplicadas no gel foram misturadas com o tampão para amostra 10X Loading Buffer (Invitrogen) em uma concentração final igual a 1X e submetidas à eletroforese em tampão TAE 1X. O DNA/RNA foi visualizado com a utilização de um transiluminador de luz ultravioleta.

5.11. RECUPERAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DO GEL DE AGAROSE:

O gel de agarose contendo o fragmento de DNA a ser recuperado foi visualizado em um transiluminador de mão. A porção do gel contendo os fragmentos de interesse foi recortada e transferida para um tubo com o auxílio de uma lâmina de bisturi nova. O isolamento dos fragmentos de DNA a partir do gel de agarose foi feito utilizando *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), seguindo as normas do fabricante.

5.12. LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA EM VETOR:

Os fragmentos de DNA foram ligados em vetor pGEM-T em reações com concentração molar igual a 3:1 (inserto/vetor), utilizando pGEM-T and pGEM-T Easy vector system (Promega), segundo o fabricante.

5.13. TRANSFEÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES POR MEIO DE ELETROPORAÇÃO, E SELEÇÃO DAS COLÔNIAS DE INTERESSE:

Uma alíquota de 50 µL da célula competente (*E. coli* – DH5α) foi descongelada em banho de gelo e misturada com 2 – 5 µL de DNA plasmidial (1-10 ng). O tubo foi incubado em gelo por, aproximadamente, 2 minutos. A mistura de células/DNA foi transferida para uma cubeta de eletroporação (0,1 cm entre eletrodos) previamente resfriada em gelo. A eletroporação foi realizada em um eletroporador modelo MicroPulser (BioRad) ajustado para transfecção de bactérias (ECL1). Após a eletroporação, as bactérias foram suspensas com a adição de 1 mL de meio SOC à cubeta. Essa solução foi transferida para um tubo falcon, esterilizado, com capacidade para 15 mL, o qual foi incubado durante 60 minutos a 37 °C e 300 RPM, por meio do uso de um agitador horizontal. A seleção dos clones foi realizada em meio seletivo sólido (LB Agar), contendo ampicilina, X-Gal e IPTG nas concentrações de 100 µg/mL, 40 µg/mL e 24 µg/ml, respectivamente, onde foram espalhados 50 µL da solução de cultura bacteriana. Após 18 horas de incubação a 37 °C, as colônias que apresentarem coloração branca foram selecionadas e inoculadas em placas de 96 poços contendo 900 µL de meio líquido LB com ampicilina (100 µg/mL). Os inóculos foram incubados a 37 °C com rotação horizontal igual a 300 RPM, por, aproximadamente, 18 horas. Após o crescimento das colônias, o DNA plasmídeo foi isolado, purificado e submetido ao sequenciamento automático de nucleotídeos.

5.14. ISOLAMENTO DE DNA PLAMIDEAL

O isolamento dos plasmídeos foi realizado de acordo com o protocolo que se segue:

1. As placas, contendo as bactérias, foram retiradas do agitador, conferidas quanto à uniformidade do crescimento e submetidas à centrifugação a 4550 G por 6 minutos;
2. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 240 μL de Solução I em cada poço da placa. A placa foi selada com adesivo, levada ao agitador para solubilizar as células e submetida à centrifugação a 4550 G por 6 minutos;
3. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 80 μL de Solução I em cada poço. A placa foi selada com adesivo e levada ao agitador;
4. Foram transferidos 60 μL da suspensão de células para uma placa com fundo em U contendo 2,5 μL de RNAse (10 mg/mL) em cada poço, nos quais foram adicionados 60 μL da Solução II;
5. A placa foi selada, agitada gentilmente e deixada à temperatura ambiente por 7 minutos;
6. Foram adicionados 60 μL de Solução III em cada poço da placa a qual foi selada, agitada gentilmente e deixada à temperatura ambiente por 7 minutos;
7. A placa foi submetida à centrifugação por 6 minutos e, após a remoção do adesivo, colocada em uma estufa a 90 °C por 30 minutos;
8. Após retirar a placa da estufa, esta foi resfriada em gelo por 10 minutos, selada com adesivo e submetida à centrifugação por 4 minutos a 4550 G e 20 °C;
9. A solução presente na placa foi transferida para uma placa filtro de fundo V a qual foi submetida à centrifugação por 5,5 minutos a 4550 G e 20 °C.
10. A placa filtro foi removida e foram adicionados 90 μL de isopropanol 100%, em cada poço da placa;

11. A placa foi selada, agitada gentilmente e submetida à centrifugação por 45 minutos a 4550 G e 20 °C;
12. O sobrenadante foi descartado, foram adicionados 200 µL de etanol 70% gelado e a placa foi submetida à centrifugação por 5 minutos a 4550 G e 20 °C;
13. O sobrenadante foi descartado e a placa, invertida sobre papel toalha, foi submetida à centrifugação por 3 minutos a 300 G e 20 °C;
14. A placa foi colocada em estufa a 37° C por 15 minutos;
15. O precipitado foi solubilizado em 40 µL de água Milli-Q;

5.15. SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO DE NUCLEOTÍDEOS

Amostras de DNA plasmideal foram submetidas à reação de seqüenciamento com Big Dye Terminator (Applied Biosystems), em seqüenciador automático de nucleotídeos modelo 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems), de acordo com o fabricante. Os oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR visando o sequenciamento foram o M13 Forward Primer ou M13 Reverse Primer (Tabela 6).

Tabela 6. Oligonucleotídeos para reação de sequenciamento.

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')
M13 Forward Primer	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13 Reverse Primer	CAG GAA ACA GCT ATG ACC

5.16. CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS E PREPARO DAS SOLUÇÕES VISANDO A ESTIMULAÇÃO DA SÍNTESE DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM *H. raniceps*:

As cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922 e 25923, respectivamente) foram cultivadas em meio mínimo. A incubação foi feita por 18 horas a 37 °C e 300 RPM, em agitador horizontal. Após a proliferação das bactérias, foram realizadas diluições seriadas a partir de uma alíquota do meio de cultura que as contém. Um volume igual a 50 µL de cada uma das diluições foi espalhado em placas contendo meio LB – Agar, as quais foram incubadas a 37 °C por 18 horas. O número de unidades formadoras de colônias (CFU) presentes nas placas após as 18 horas foi utilizado para determinar a proporção de diluição dos meios de cultura que contém as bactérias de maneira a se obter soluções de *E. coli* e *S. aureus* contendo 10⁶ CFU/mL. As diluições foram realizadas utilizando o meio mínimo contendo Biotina, Lisina e Timberlake.

Aspergillus nidulans foi cultivado a 37 °C por um período de tempo necessário para a produção de esporos (aproximadamente, sete dias). Os esporos foram recolhidos da placa de cultura, após serem dissolvidos em água Milli-Q, e foram submetidos à contagem em câmara de Neubauer, após filtração sob vácuo em lã de vidro, para retirada das hifas. Foram preparadas soluções contendo 10⁶ conídeos/mL em meio mínimo (adicionado de Biotina, Lisina e Timberlake). As soluções foram incubadas por 10 horas a 37 °C para promover a germinação dos esporos.

O meio mínimo, livre de micro-organismos, foi utilizado como solução para o controle negativo, na qual foi adicionada, oxacilina, gentamicina e ampicilina, nas concentrações de 100, 50 e 100 µg/mL , respectivamente, além de Biotina, Lisina e Timberlake, nas mesmas concentrações utilizadas para o preparado dos meios contendo os micro-organismos.

5.17. DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL (QPCR):

As sequências nucleotídicas determinadas pelo sequenciamento automático, que possuem a mesma estrutura daquelas que codificam pré-pró-peptídeos antimicrobianos em anfíbios, foram utilizadas como modelo para o desenho e síntese de oligonucleotídeos específicos visando ensaios de expressão relativa de genes por meio de PCR em tempo real. Para o desenho dos primers foi utilizado o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). Como controle endógeno foi utilizado um par de oligonucleotídeos específicos que são complementares ao gene que codifica a proteína actina em *H. punctatus* (tabela 7). A estrutura deste gene foi determinada por meio da análise de sequências nucleotídicas depositadas em uma biblioteca de ESTs, a qual se encontra na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Foi realizado o experimento para determinação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos sintetizados. Para isto, foram realizadas diluições seriadas (razão 1:100) de produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos insertos de interesse. As amostras foram submetidas a ensaios de qPCR realizados em um 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), no modo *Absolute quantification*. Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen) foi utilizado no preparo das reações, de acordo com o fabricante.

Tabela 7. Oligonucleotídeos específicos utilizados como controle endógeno de expressão nos ensaios de qPCR.

Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')
ACTIN_PUN3_F	CCC TGT ATG CCT CTG GTC GTA
ACTIN_PUN_3_R	GCG TGA GGC AGG GCA TAG

5.18. ENSAIOS DE EXPRESSÃO RELATIVA POR MEIO DE PCR EM TEMPO REAL (QPCR):

Uma fração de cDNA, sintetizado com o oligonucleotídeo Oligo-dT (15), foi diluída em H₂O Milli-Q (1:25). Esta solução foi utilizada como *template* nos ensaios de qPCR os quais foram realizados em um 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), no modo *Relative Quantification Plate*. Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen) foi utilizado no preparo das reações, de acordo com o fabricante, em conjunto com os oligonucleotídeos específicos para transcritos de RNAs que codificam pré-pró-peptídeos antimicrobianos em anfíbios. A expressão do gene que codifica a proteína actina foi utilizada como um normalizador. Ao término de cada reação, procedeu-se o ciclo de dissociação para verificação da especificidade dos oligonucleotídeos. O experimento foi realizado em triplicata. As análises estatísticas dos resultados foram feitas de acordo com o manual sugerido pela Applied Biosystems.

5.19. ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS/NUCLEOTÍDICAS:

Foi realizada uma busca por similaridades usando o programa FASTA 3 no Expasy Molecular Server (<http://ca.expasy.org/>). Os alinhamentos das seqüências obtidas foram feitos usando Clustal W. As análises das seqüências de nucleotídeos obtidas foram realizadas utilizando os programas EditSeq e SeqMan (DNASTAR).

6. RESULTADOS

6.1. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DE RNAs QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS:

Cerca de 10 mg dos tecidos pulverizados foram submetidos ao isolamento de RNA total, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), cuja integridade pôde ser observada através de análises em gel de agarose a 1% (Figura 3).

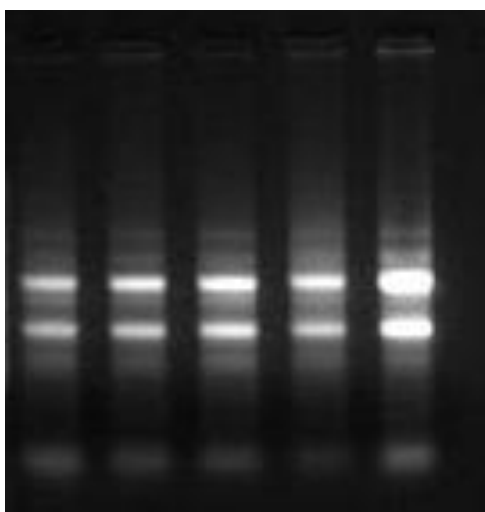


Figura 3. Análise em gel de agarose a 1% para verificação da integridade do RNA total isolado a partir dos tecidos cutâneos de *H. raniceps*.

Após a síntese de cDNAs, realizada a partir do RNA total extraído, os quatro conjuntos de primers degenerados, sintetizados com base na sequência de aminoácidos que compõe a região de peptídeo sinal de RNAs que codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios, foram utilizados em reações de PCR. A partir de análises dos produtos de PCR, feitas em gel de agarose a 1%, observou-se a presença de fragmentos amplificados possuindo peso molecular de vários tamanhos (Figura 4). Fragmentos amplificados que possuíram entre 250 e 400 pb foram isolados e purificados para clonagem em vetor pGEM-T.

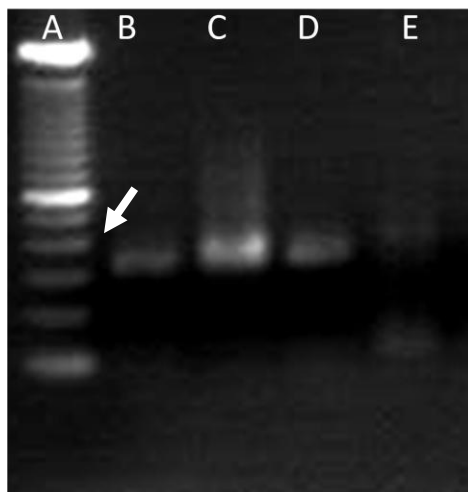


Figura 4. Análise em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR obtidos a partir do cDNA de *H. raniceps* utilizando os oligonucleotídeos (B) PPS-1, (C) PPS-1A, (D) PPS-2 e (E) PPS-2A. (A) Marcador de peso molecular (a seta indica o fragmento que corresponde a 400 pb).

Após a transfecção em *E. coli* (DH5 α), para multiplicação dos plasmídeos, estes foram extraídos, purificados e submetidos ao sequenciamento automático de nucleotídeos, no qual, 192 clones foram sequenciados. A tradução *in silico* dos nucleotídeos permitiu a determinação de 17 seqüências nucleotídicas distintas contendo as características estruturais dos RNAs que codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios (Anexo I). Na Figura 5 é apresentada uma das seqüências caracterizadas, na qual estão assinaladas as três regiões comuns aos pré-pró-peptídeos antimicrobianos de anfíbios (peptídeo sinal, região acídica e peptídeo funcional), assim como, os sítios de clivagem para o processamento do pré-pró-peptídeo.

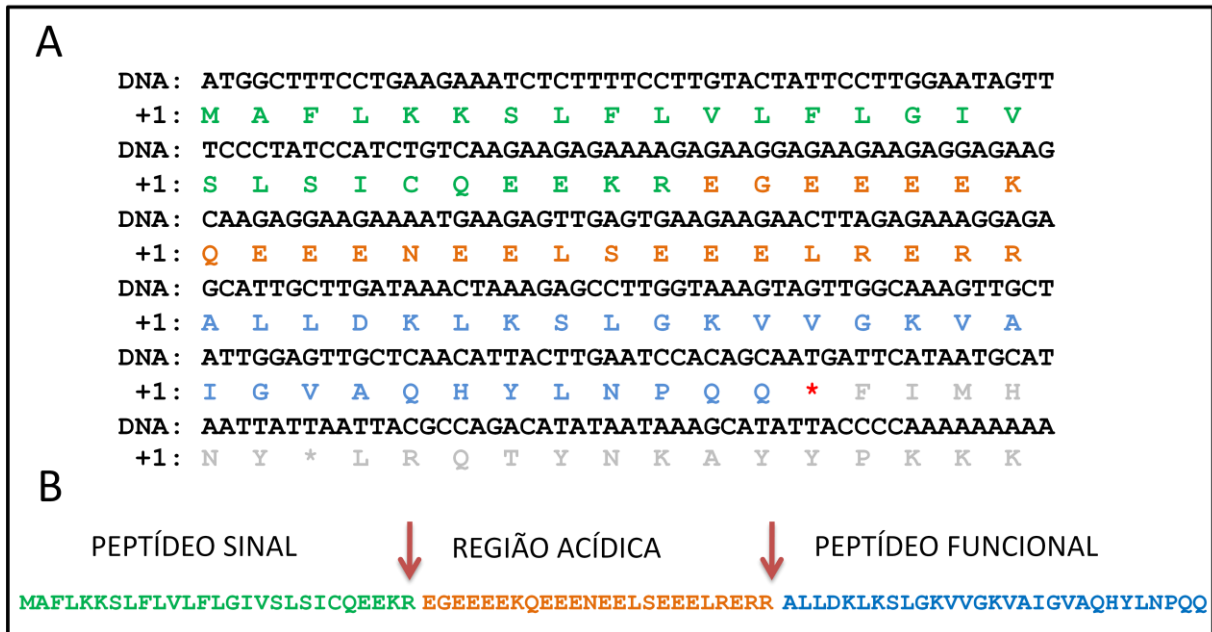


Figura 5. Sequência nucleotídica de um cDNA que codifica um pré-pró-peptídeo antimicrobiano obtido a partir do tecido cutâneo de *H. raniceps*. (A) Tradução *in silico* (A) e (B) destaque do oligopeptídeo traduzido. Observa-se que o oligopeptídeo apresenta a estrutura clássica comum aos pré-pró-peptídeos antimicrobianos de anfíbios. As setas indicam os sítios de clivagem para processamento do peptídeo.

O alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos que compõe os pré-pró-peptídeos caracterizados permitiu a separação destes em quatro grupos distintos que compartilham características estruturais similares. Dessa forma, os pré-pró-peptídeos caracterizados foram separados em quatro famílias diferentes: Raniseptinas A, Raniseptinas B (Rsp), Figaininas (Fgn) e Dissulfinas (Dsf) (Tabela 8). As sequências nucleotídicas que codificam os pré-pró-peptídeos caracterizados foram submetidas a uma busca por similaridade, realizada em bancos de dados, o que permitiu concluir que estas eram inéditas, quando foram caracterizadas. Algumas dessas sequências já foram disponibilizadas na literatura em 2008 como parte de um trabalho desenvolvido por esse mesmo grupo de pesquisa, por meio da publicação de um artigo científico (MAGALHÃES et al., 2008) e, portanto, já se encontram disponíveis em bancos de dados.

Tabela 8. Alinhamento das sequências de aminoácidos que compõem os pré-pró-peptídeos obtidos a partir da tradução *in silico* dos RNAs isolados da pele de *H. raniceps*.

NOME	PRÉ-PRÓ-PEPTÍDEO	FAMÍLIA
Rsp - 6	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SIC EEEKRE G E E E E K Q E E N E E L S E E E L R R R A L L D K L K S L G K V V G K V A L G V V Q N Y L N P R Q	RANISEPTINAS A
Rsp - 7	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SIC EEEKRE G E E E E K Q E E N E E L S E E E L R R R A L L D K L K S L G K V V G K V A L G V A Q H Y L N P Q Q	
Rsp - 11	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SIC EEEKRE G E E E E N Q E E N E E L S E E E L R R R A L L D K L K S L G K V G E K L L --- L E L L N I T -	
Rsp - 12	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SIC EEEKRE G E E E E K Q E E N E E L S E E E L R R R A L L D K L K N L G K V V G K V F F G V A Q H Y L N P Q Q	
Rsp - 13	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SIC EEEKRE G E E E E K Q E E N E E L S E E E L R R R A L L D K L K S L G K V V G K V A L G V V Q H Y L N P R Q *****:*****.*** **: : . **	
Rsp - 3	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SIC EEEKRE G E E E E K Q E E N E E L S E E E L R R R A W L D K L K S I G K V V G K V A I G V A K N L L N P Q -	RANISEPTINAS B
Rsp - 1	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SIC EEEKRE G E E E E K Q E E N E E L S E E E L R E K R A W L D K L K S L G K V V G K V A L G V A Q N Y L N P Q Q	
Rsp - 5	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SIC EEEKRE G E E E E K Q E E N E E L S E E E L R E K R A W L D K L K N L G K V V G K V A L G V V Q N Y L N P R Q	
Rsp - 2	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SIC EEEKRE G E E E E K Q E E N E E L S E E E L R E K R A W L D K L K S L G K V V G K V A L G V A Q N Y L N P Q -	
Rsp - 4	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SIC EEEKRE G E E E E K Q E E N E E L S E E E L R E K R A W L D K L K S L G K V V G K V A F G V A Q N Y L N P R Q	
Rsp - 9	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SIC EEEKRE G E E E E K Q E E N E E L S E E E L R R R A W L D K L K S I G K V V G K V A I G V A K N F L N P Q -	
Rsp - 10	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SIC EEEKRE G E E E E K Q E E N E E L S E E E L R R R A W L D K L K S L G K V V G K V A L G V V Q N Y L N P R Q *****:*****.*****:*.:* ***:	
Fgn - 1	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SIC E E E K R E --- E E E K N E E G A N Q E E N --- A E S K E K R F I G T L I P L --- A L G A L T K L F K G -	FIGAININAS
Fgn - 4	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SV C E E E K R E G E E K E E K R E E E E G K E E N E D G N E E H K E K R F L G A I L K I G H A L A K T V L P M V T N A F K P K Q	
Fgn - 5	MAFLKKS LFLVLF L GIVSL SIC E E E K R E --- E E E K N E E E E N E E D N --- V K N R E K R F F G A I V P W --- L I S L V S S W V K K G - *****:*****:***.**.:*:*: : :*****:***: : : : . *	
Dsf - 1	MAFLKKS LFLVLF L G L V S L I C E E E N R E E E R E E N E P D N S --- E E G N E E E A E D T K E K R D K E R P I C S N T F R G R K C G	DISSULFINAS
Dsf - 2	MAFLKKS LFLVLF L G L V S L I C E E E N R E E E R E E N E G N D S K E E E E G N E E E N E S K E K --- E K R A C F L T R L G T Y V C G *****:*. ******:***: :*. . : **	

Os pré-pró-peptídeos antimicrobianos caracterizados foram submetidos à clivagem enzimática *in silico* com o objetivo de determinar a estrutura primária dos “peptídeos maduros”, os quais são estocados nas glândulas granulares após o processamento pós-traducional nas células cutâneas dos anfíbios. Dessa forma foi possível determinar a sequência primária dos possíveis peptídeos maduros e calcular suas massas mono-isotópicas teóricas (Tabela 9).

Tabela 9. Massas mono-isotópicas teóricas dos peptídeos maduros preditos a partir da clivagem enzimática *in silico* dos pré-pró-peptídeos antimicrobianos caracterizados.

NOME	SEQUÊNCIA DO PEPTÍDEO PREDITO	[M+H]⁺ (Da)
Rsp-8	ALLDKLKSLGKVVVGKVAIGVAQHYLNPQQ	3088.80
Rsp-6	ALLDKLKSLGKVVVGKVALGVVQNYLNPRQ	3121.86
Rsp-7	ALLDKLKSLGKVVVGKVALGVAQHYLNPQQ	3088.80
Rsp-11	ALLDKLKSLGKVKVEKLLLELLNIT	2750.72
Rsp-12	ALLDKLKNLGKVVVGKVVFGVAQHYLNPQQ	3325.83
Rsp-13	ALLDKLKSLGKVVVGKVALGVVQHYLNPQR	3144.88
Rsp-3	AWLDKLSIGKVVVGKVAIGVAKNLLNPQ	2960.78
Rsp-1	AWLDKLSIGKVVVGKVALGVAQNYLNPQQ	3138.78
Rsp-5	AWLDKLNKLGKVVVGKVALGVVQNYLNPRQ	3221.87
Rsp-2	AWLDKLSIGKVVVGKVALGVAQNYLNPQ	3010.72
Rsp-4	AWLDKLSIGKVVVGKVAFGVAQNYLNPRQ	3200.81
Rsp-9	AWLDKLSIGKVVVGKVAIGVAKNFLNPQ	2994.77
Rsp-10	AWLDKLSIGKVVVGKVALGVVQNYLNPRQ	3194.87
Fgn-1	FIGTLIPLALGALTCLFKG	1974.22
Fgn-4	FLGAILKIGHALAKTVLPMVTNAFKPKQ	3007.77
Fgn-5	FFGAIVPWLISLVSSWVKKG	2235.27
Dsf-1	DKERPICSNTFRGRKCG	1967.97
Dsf-2	ACFLTRLGTYVCG	1404.68

[M+H]⁺ corresponde à massa mono-isotópica teórica.

6.2. DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA ENSAIOS DE qPCR:

As sequências nucleotídicas que codificam os novos pré-pró-peptídeos antimicrobianos caracterizados foram submetidas a análises visando o desenho de oligonucleotídeos específicos com o objetivo de realizar ensaios de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Devido à alta similaridade existente entre os transcritos que codificam os pré-pró-peptídeos antimicrobianos pertencentes às famílias Raniseptinas A e B, não foi possível desenhar oligonucleotídeos específicos de maneira que permitisse analisar os níveis de transcrição individual de cada um deles. Dessa forma, apenas os transcritos que codificam as Raniseptinas 3, 11 e 12 foram analisados de maneira individual. Todos os transcritos pertencentes às famílias das Figaininas e Dissulfinas foram analisados de maneira individual. Além de oligonucleotídeos visando a amplificação de transcritos específicos, também foram desenhados

oligonucleotídeos capazes de anelar em regiões conservadas dos transcritos pertencentes à família das Raniseptinas A ou das Raniseptinas B, assim como, de qualquer RNA mensageiro que possua a região codificadora do peptídeo sinal compartilhada pelos pré-pró-peptídeos antimicrobianos de anfíbios, o qual será tratado aqui como “Antimicrobianos Totais”. A tabela 10 apresenta a sequência dos oligonucleotídeos sintetizados.

Tabela 10. Oligonucleotídeos específicos para ensaios de PCR quantitativo.

Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')	Alvo
ALL7_F2	GCA TTG CTT GAT AAA CTA AAG AAC CTC	Raniseptina 12
ALL7_R2	TGC TGT GGA TTC AAG TAA TGT TGA	
ALL6_F	GAG GAA GAA AAT GAA GAA TTG AGT GA	Raniseptina 11
ALL6_R	AGC AAC TCC AAT AGC AAC TTT TCC	
AWL1_F	GGC TTG ATA AAC TAA AGA GCA TTG G	Raniseptina 3
AWL1_R	TGA TGA ATC ATT GTG GAT TCA AGA G	
AWLG_F	GAA AAG AGA AGG AGA AGA AGA GGA GAA	Raniseptinas B
AWLG_R	CCA AGG CTC TTT AGT TTA TCA AGC C	
ALLG_F	GAA AAG AGA AGG AGA AGA AGA GGA GAA	Raniseptinas A
ALLG_R	CCA AGG CTC TTT AGT TTA TCA AGC A	
FGL1_F2	GAA TGA AGA GGG TGC AAA CCA G	Figainina 1
FGL1_R	CAA AGC TCC TAA AGC CAG AGG A	
FGL4_F	CGG CGC TAT TTT AAA AAT TGG A	Figainina 2
FGL4_R	GCT TTG GTT TAA AGG CAT TGG TC	
FGL5_F	CTA TTG TAC CTT GGC TTA TAT CAC TTG TTA G	Figainina 3
FGL5_R	CAT GCT CCT TAG AGA TAA AAC ATT ACA TTT	
SS1_F	AGG AGC GTC CCA TTT GTT CA	Dissulfina 1
SS2_F	AAA GAA AAG GAA AAG CGT GCA T	Dissulfina 2
qPPS_F	GAA GAA ATC TCT TTT CCT TGT ACT ATT CCT	Antimicrobianos Totais
qPPS_R2	CTC TTT TCT CTT CTT CAC CGA TGG	

Os oligonucleotídeos foram submetidos à análise visando à determinação das eficiências de amplificação. Todos os oligonucleotídeos sintetizados apresentaram uma boa eficiência de amplificação (Tabela 11) cujos valores de eficiência encontram-se próximos daqueles aceitáveis ($100 \pm 10\%$). Os parâmetros utilizados para calcular os valores da eficiência de amplificação foram retirados do manual fornecido pela Applied Biosystems (<http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/d1jg4lmm.pdf> - acessado em 20 de Janeiro de 2010).

Tabela 11. Eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos sintetizados para a utilização nos ensaios de qPCR.

Alvo do Oligonucleotídeo	Inclinação da reta	R²	Eficiência (%)
Raniseptina 3	-3.319	0.995	100.139
Raniseptina 11	-3.601	1	89.530
Raniseptina 12	-3.595	0.999	89.742
Raniseptinas A	-3.44	1	95.306
Raniseptinas B	-3.581	0.998	90.208
Figainina 1	-3.488	1	93.943
Figainina 2	-3.287	1	98.517
Figainina 3	-3.214	0.998	95.286
Dissulfina 1	-3.342	0.999	99.157
Dissulfina 2	-3.449	0.999	94.942
Antimicrobianos totais	-3.605	1	89.405
Actina	-3.175	0.995	93.481

Foi realizada a análise das curvas de dissociação dos fragmentos amplificados ao final dos ensaios de qPCR, para cada par de oligonucleotídeo utilizado, com o objetivo de verificar a especificidade de anelamento dos oligonucleotídeos aos fragmentos de interesse. Os resultados permitem concluir que cada par de oligonucleotídeo promoveu a amplificação de produtos apresentando um mesmo tamanho, reflexo de uma boa especificidade de anelamento (Figura 6). Os produtos de PCR podem ainda ser submetidos ao sequenciamento automático

de nucleotídeos, como alternativa de validar ainda mais a especificidade de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados.

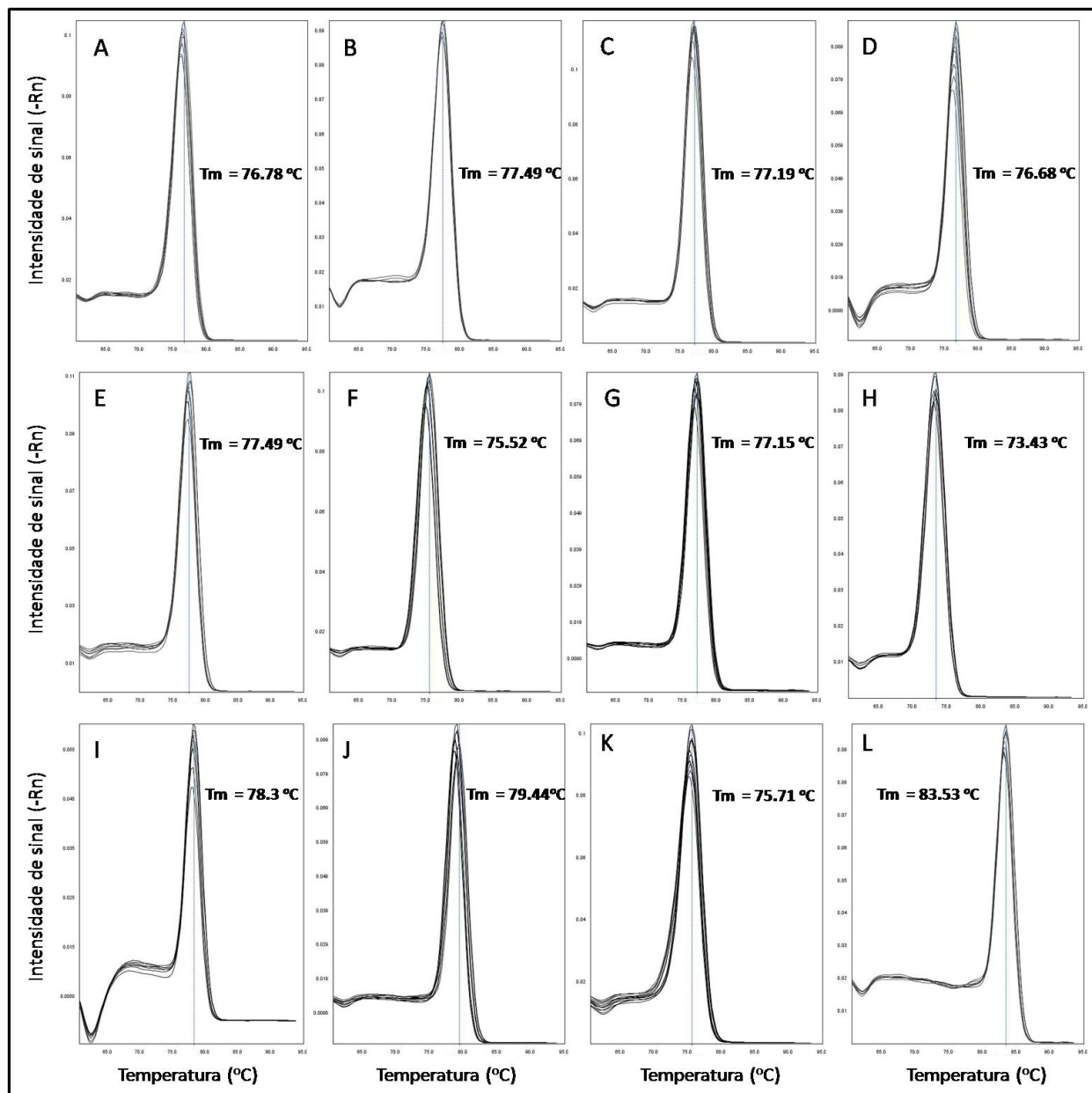


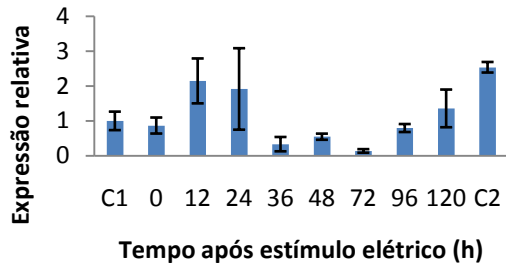
Figura 6. Curvas de dissociação dos produtos de PCR realizadas após o ensaio de quantificação relativa por qPCR para análise da especificidades dos oligonucleotídeos aos transcritos de interesse. Tm representa a temperatura na qual 50% dos produtos da amplificação encontram-se em dupla fita e 50% encontram-se dissociados em fitas simples. A – Raniseptina 11. B – Raniseptina 12. C – Raniseptinas A. D – Raniseptina 3. E- Raniseptinas B. F – Figainina 1. G – Figainina 2. H – Figainina 3. I – Dissulfina 1. J – Dissulfina 2. K – Antimicrobianos totais. L – Controle endógeno (Actina).

6.3.1. CINÉTICA DE EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS APÓS A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA:

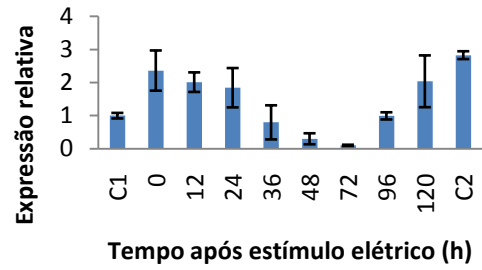
Foi determinada a variação dos níveis de expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em *H. raniceps* após estimulação elétrica. Após a aplicação do estímulo em 24 animais, seguida pela coleta da secreção em tubos tipo Falcon, estes foram colocados juntos em cativeiro. Os animais foram eutanasiados zero hora após a aplicação do estímulo, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 120 horas. As peles dos animais foram dissecadas e submetidas ao isolamento do RNA total com o objetivo de quantificar a expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos, por meio de qPCR, em cada um dos tempos após o estímulo. Foi realizada a análise de oito genes específicos estruturalmente relacionados com peptídeos antimicrobianos isolados de anfíbios.

Os resultados obtidos permitem concluir que a aplicação do estímulo elétrico promoveu o aumento da expressão da maioria dos genes estudados nas primeiras 24 horas, quando os níveis de expressão dos genes começam a baixar até próximos do nível basal (Figura 7). As taxas de expressão dos genes nas primeiras 24 horas após o estímulo foram, aproximadamente, duas vezes maiores que as do controle C1 (animais que não sofreram estimulação elétrica cujos RNAs foram obtidas no primeiro dia de experimento). As exceções são as taxas de expressão dos genes *Fgn1* e *Fgn2*, as quais foram mais altas 36 horas após a aplicação do estímulo. Além disso, observa-se que houve um aumento nos níveis de expressão de alguns genes 96 horas após a aplicação do estímulo elétrico.

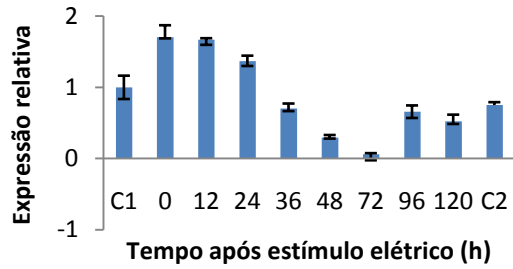
Raniseptina 11



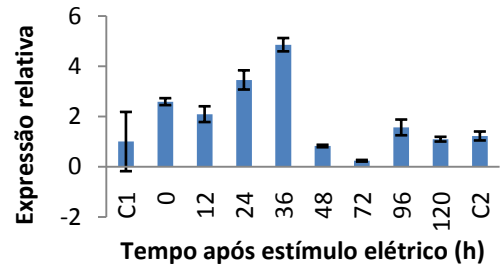
Raniseptina 12



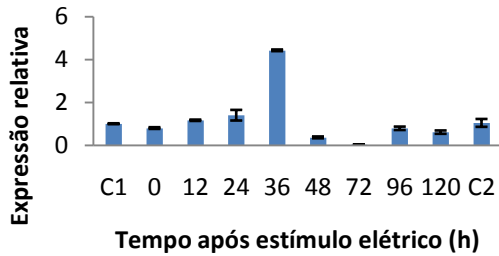
Raniseptina 3



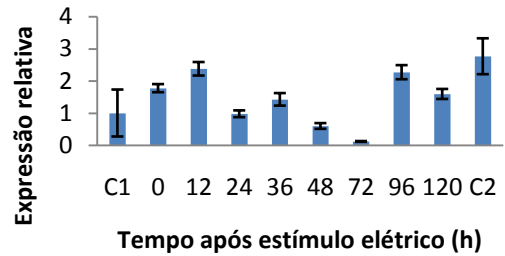
Figainina 1



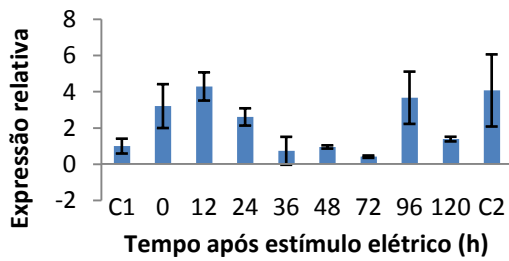
Figainina 2



Figainina 3



Dissulfina 1



Dissulfina 2

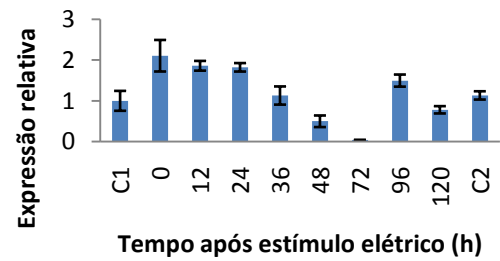
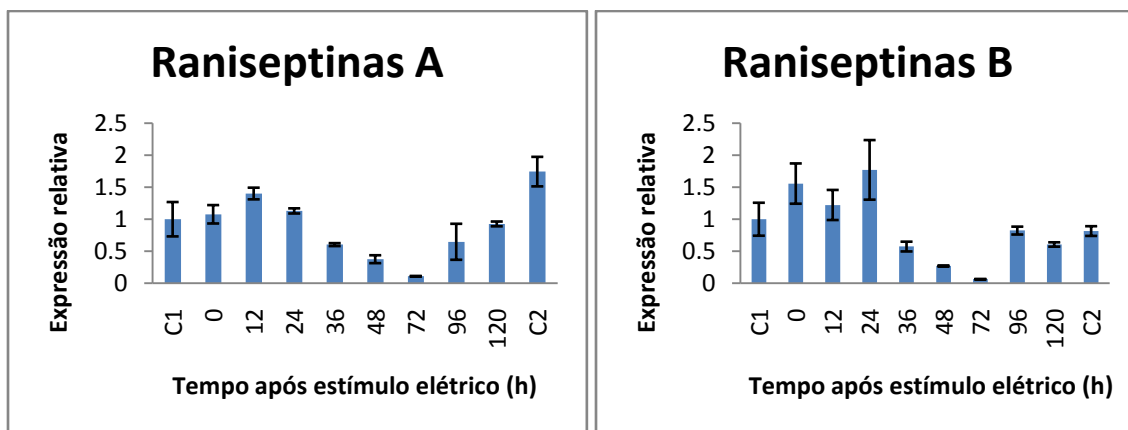


Figura 7. Cinética dos níveis de transcrição de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em *H. raniceps* após estímulo elétrico. As expressões são relativas ao tempo C1. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica para a proteína actina. C1 – nível de transcrição dos genes em animais que não sofreram estimulação elétrica cujos RNAs foram obtidas no primeiro dia de experimento. C2 – nível de transcrição dos genes em animais que não sofreram estimulação elétrica cujos RNAs foram obtidos nos último dia de experimentos (120 dias em cativeiro). As barras horizontais representam os desvios padrões médios.

Análises da expressão global dos genes que codificam os peptídeos pertencentes à família das Raniseptinas também foram realizadas. Para isso, foram sintetizados oligonucleotídeos específicos capazes de anelar em regiões conservadas compartilhadas apenas por RNAs que codificam peptídeos pertencentes a essa família. Além disso, também foram realizadas análises da expressão de todos os genes que contêm a estrutura do peptídeo sinal compartilhada pelos peptídeos antimicrobianos de anfíbios. Para isso, foram sintetizados oligonucleotídeos com base na sequência nucleotídica que codifica o peptídeo sinal de tais moléculas. Os resultados obtidos também permitem concluir que os níveis de expressão dos genes dos peptídeos antimicrobianos em *H. raniceps* são mais altos nas primeiras 24 horas que sucedem ao estímulo (Figura 8).



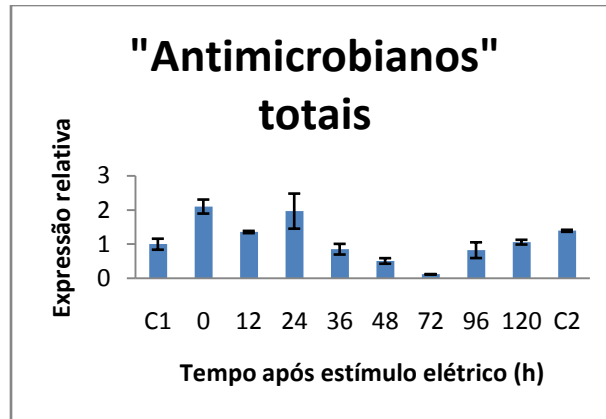


Figura 8. Cinética dos níveis de transcrição dos grupos de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em *H. raniceps* após estímulo elétrico. As expressões são relativas ao tempo C1. Os dados foram normalizados com os níveis de transcrição do gene que codifica para a proteína actina. C1 – nível de transcrição dos genes em animais que não sofreram estimulação elétrica cujos RNAs foram obtidas no primeiro dia de experimento. C2 – nível de transcrição dos genes em animais que não sofreram estimulação elétrica cujos RNAs foram obtidos nos último dia de experimentos (120 dias em cativeiro). As barras horizontais representam os desvios padrões das médias.

Dessa forma, como a expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos em *H. raniceps* foi mais elevada nas primeiras 24 horas após a aplicação do estímulo elétrico, e começou a diminuir após as 36 horas que sucederam ao estímulo, os ensaios de indução e determinação da expressão de genes motivada por micro-organismos foram realizados com a exposição dos animais aos micro-organismos por um tempo igual a 24 e 36 horas.

6.3.2. IMAGENS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DOS TECIDOS ISOLADOS APÓS A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA:

As massas moleculares dos peptídeos deduzidos a partir dos pré-pró-peptídeos antimicrobianos caracterizados com o sequenciamento de cDNAs foram calculadas. Dessa forma, foram feitos experimentos de obtenção de imagens moleculares por espectrometria de massa (IMS) com o objetivo de localizar esses peptídeos na pele de *H. raniceps*, assim como, determinar o tempo necessário para a síntese *de novo* desses peptídeos após o estímulo elétrico. A porção direita da pele dorsal dos mesmos animais submetidos às análises de expressão relativa dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos foi utilizada para os experimentos de IMS. Os resultados demonstram que os íons com massa molecular que

correspondem aos peptídeos caracterizados pelo sequenciamento de cDNA começam a ser detectados na pele 24 horas depois que o estímulo elétrico foi aplicado (Figura 13) e alcançam níveis de detecção e distribuição mais altos 36 horas após o estímulo, momento no qual os níveis de expressão dos genes que codificam os peptídeos antimicrobianos começam a baixar (Figuras 9-18).

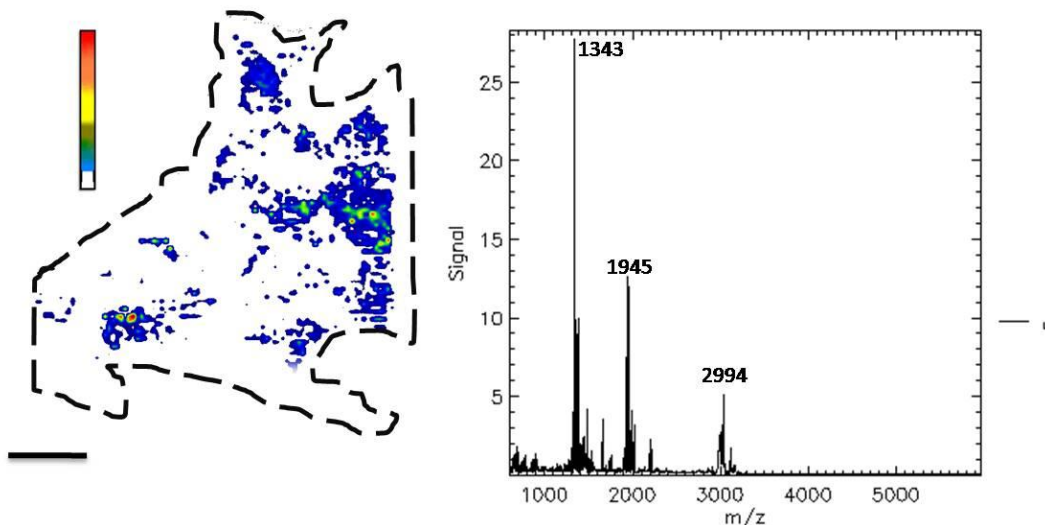


Figura 9. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de *H. raniceps* realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado de um animal que não sofreu estimulação elétrica cujo tecido foi obtido no primeiro dia de experimento – Controle C1 - (animal não submetido ao catifeiro). O gráfico à direita representa o espectro de massas global resultante da análise. Apenas os íons com massa molecular igual aquela dos peptídeos caracterizados por sequenciamento de cDNA estão representados nas imagens (Tabela 10). As linhas pontilhadas representam a área do tecido a qual foi feita a varredura. As barras horizontais localizadas no canto inferior esquerdo de cada imagem representam uma escala de 5 mm.

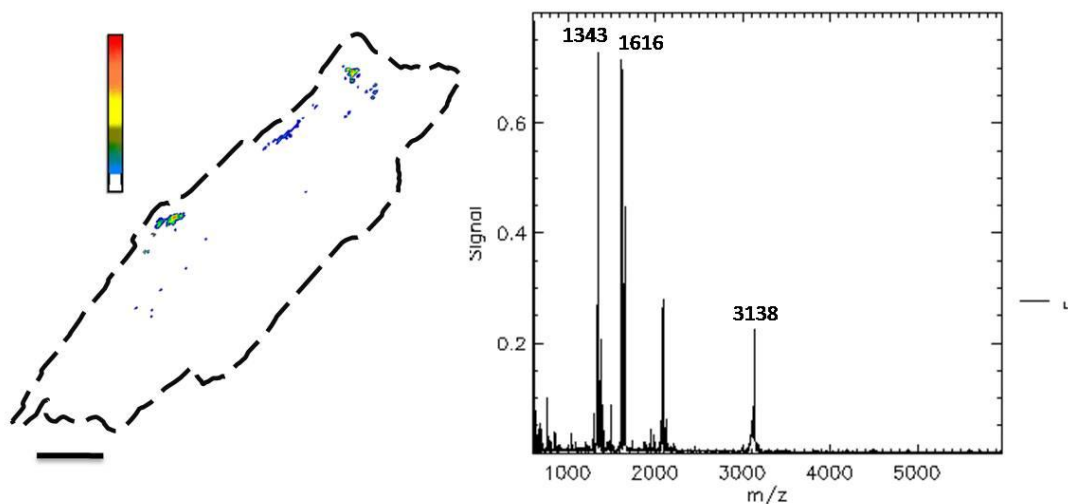


Figura 10. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de *H. raniceps* realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado imediatamente (zero hora) após o estímulo elétrico. O gráfico à direita representa o espectro de massas global. Apenas os íons com massa molecular igual aquela dos peptídeos caracterizados por sequenciamento de cDNA estão representados nas imagens (Tabela 10). As linhas pontilhadas representam a área do tecido a qual foi feita a varredura. As barras horizontais localizadas no canto inferior esquerdo de cada imagem representam uma escala de 5 mm.

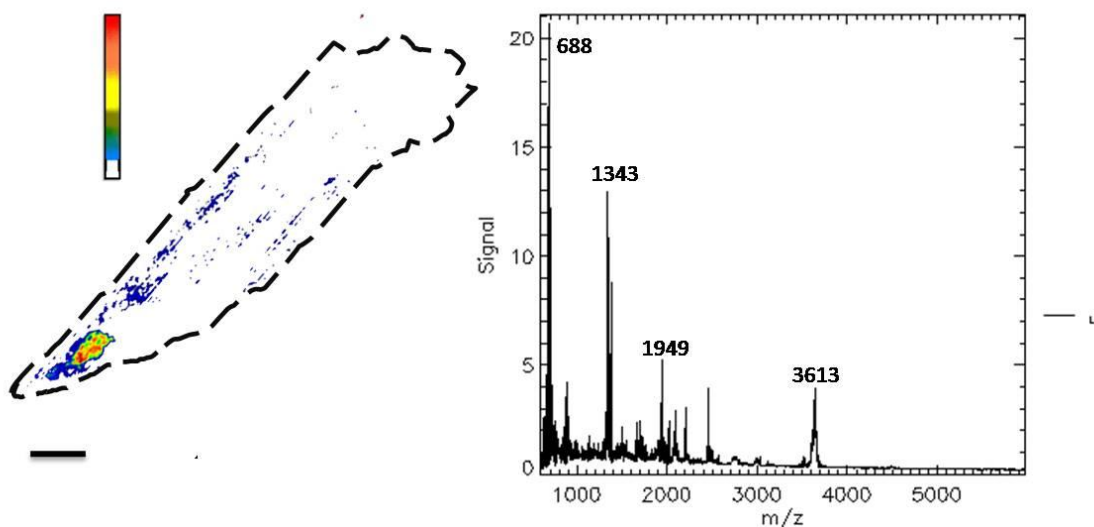


Figura 11. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de *H. raniceps* realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado 12 horas após o estímulo elétrico. O gráfico à direita representa o espectro de massas global. Apenas os íons com massa molecular igual aquela dos peptídeos caracterizados por sequenciamento de cDNA estão representados nas imagens (Tabela 10). As linhas pontilhadas representam a área do tecido a qual foi feita a varredura. As barras horizontais localizadas no canto inferior esquerdo de cada imagem representam uma escala de 5 mm.

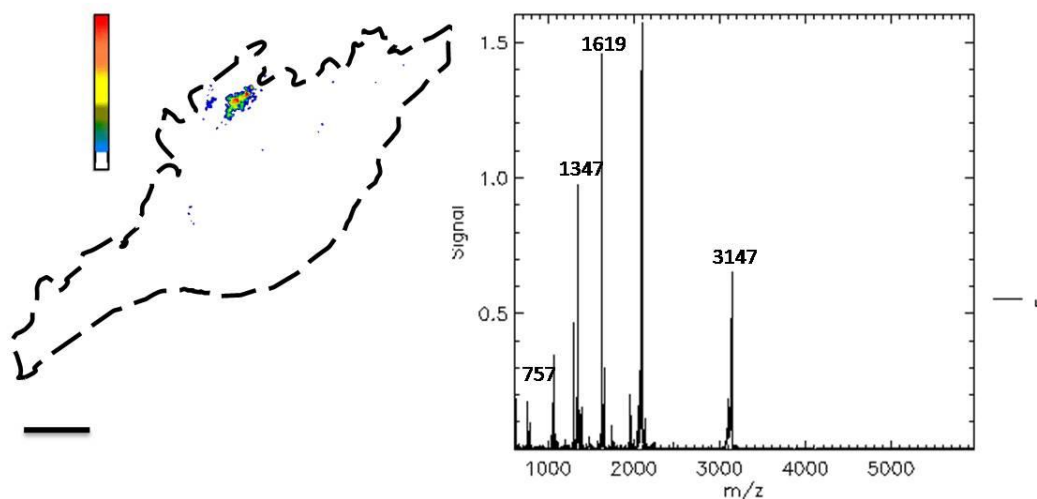


Figura 12. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de *H. raniceps* realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado 24 horas após o estímulo elétrico. O gráfico à direita representa o espectro de massas global. Apenas os íons com massa molecular igual aquela dos peptídeos caracterizados por sequenciamento de cDNA estão representados nas imagens (Tabela 10). As linhas pontilhadas representam a área do tecido a qual foi feita a varredura. As barras horizontais localizadas no canto inferior esquerdo de cada imagem representam uma escala de 5 mm.

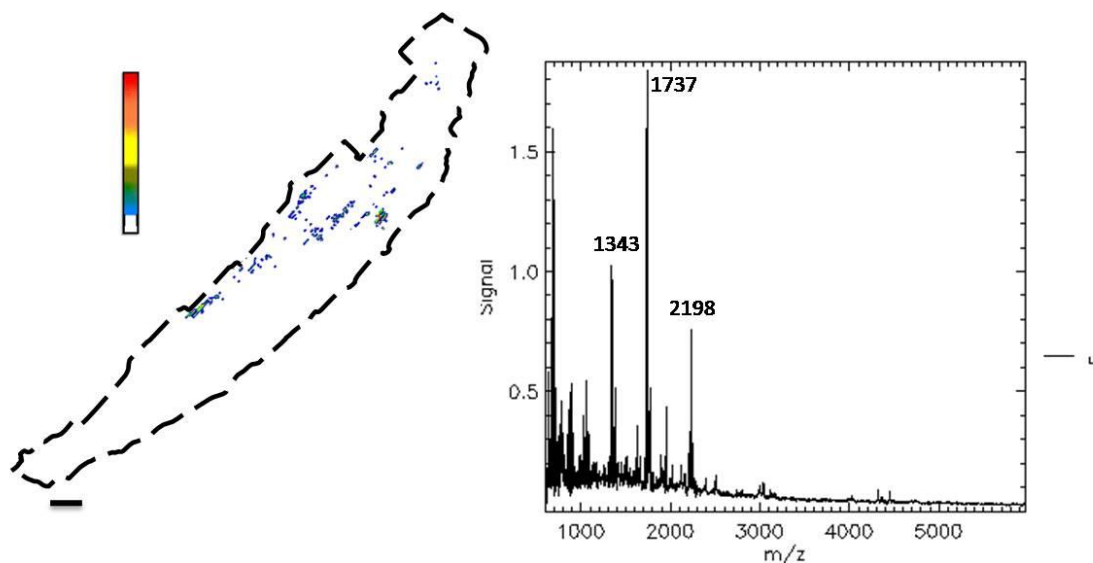


Figura 13. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de *H. raniceps* realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado 36 horas após o estímulo elétrico. O gráfico à direita representa o espectro de massas global. Apenas os íons com massa molecular igual aquela dos peptídeos caracterizados por sequenciamento de cDNA estão representados nas imagens (Tabela 10). As linhas pontilhadas representam a área do tecido a qual foi feita a varredura. As barras horizontais localizadas no canto inferior esquerdo de cada imagem representam uma escala de 5 mm.

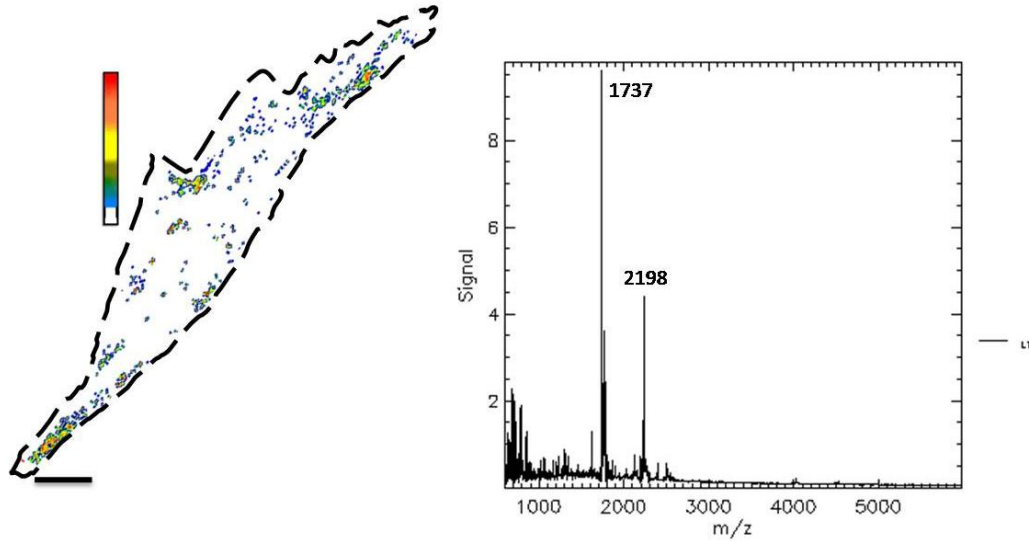


Figura 14. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de *H. raniceps* realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado 48 horas após o estímulo elétrico. O gráfico à direita representa o espectro de massas global. Apenas os íons com massa molecular igual aquela dos peptídeos caracterizados por sequenciamento de cDNA estão representados nas imagens (Tabela 10). As linhas pontilhadas representam a área do tecido a qual foi feita a varredura. As barras horizontais localizadas no canto inferior esquerdo de cada imagem representam uma escala de 5 mm.

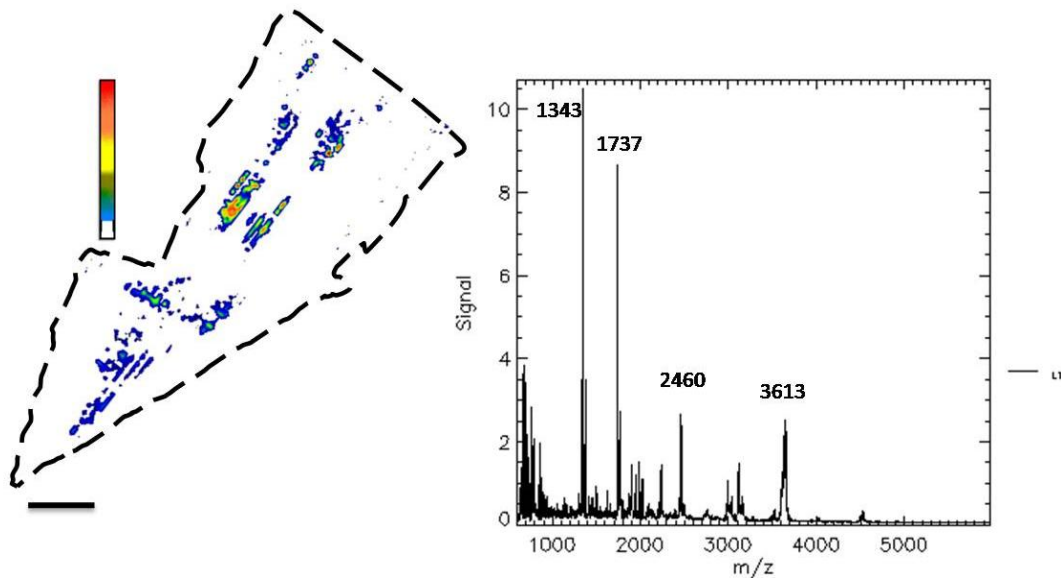


Figura 15. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de *H. raniceps* realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado 72 horas após o estímulo elétrico. O gráfico à direita representa o espectro de massas global. Apenas os íons com massa molecular igual aquela dos peptídeos caracterizados por sequenciamento de cDNA estão representados nas imagens (Tabela 10). As linhas pontilhadas representam a área do tecido a qual foi feita a varredura. As barras horizontais localizadas no canto inferior esquerdo de cada imagem representam uma escala de 5 mm.

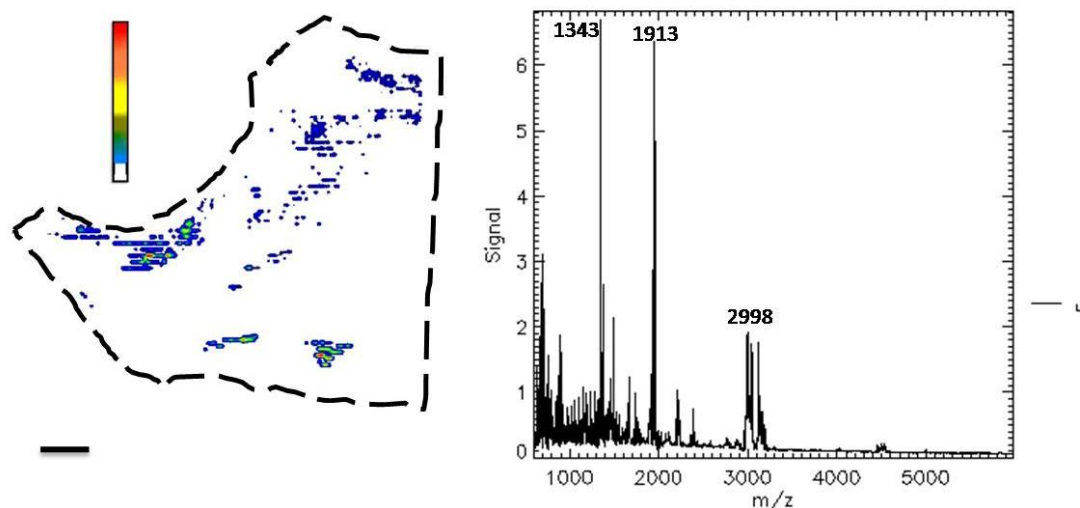


Figura 16. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de *H. raniceps* realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado 96 horas após o estímulo elétrico. O gráfico à direita representa o espectro de massas global. Apenas os íons com massa molecular igual aquela dos peptídeos caracterizados por sequenciamento de cDNA estão representados nas imagens (Tabela 10). As linhas pontilhadas representam a área do tecido a qual foi feita a varredura. As barras horizontais localizadas no canto inferior esquerdo de cada imagem representam uma escala de 5 mm.

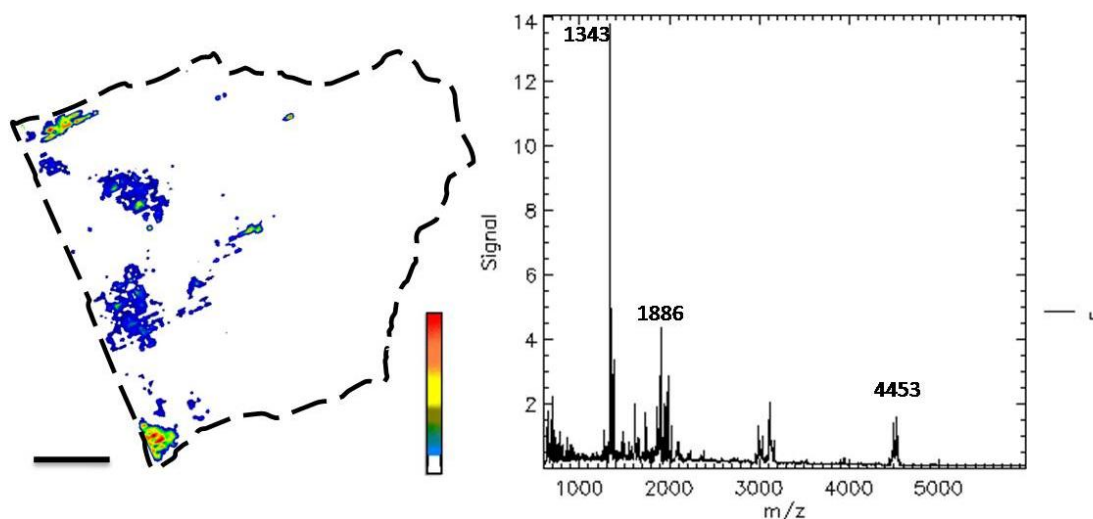


Figura 17. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de *H. raniceps* realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado 120 horas após o estímulo elétrico. O gráfico à direita representa o espectro de massas global. Apenas os íons com massa molecular igual aquela dos peptídeos caracterizados por sequenciamento de cDNA estão representados nas imagens (Tabela 10). As linhas pontilhadas representam a área do tecido a qual foi feita a varredura. As barras horizontais localizadas no canto inferior esquerdo de cada imagem representam uma escala de 5 mm.

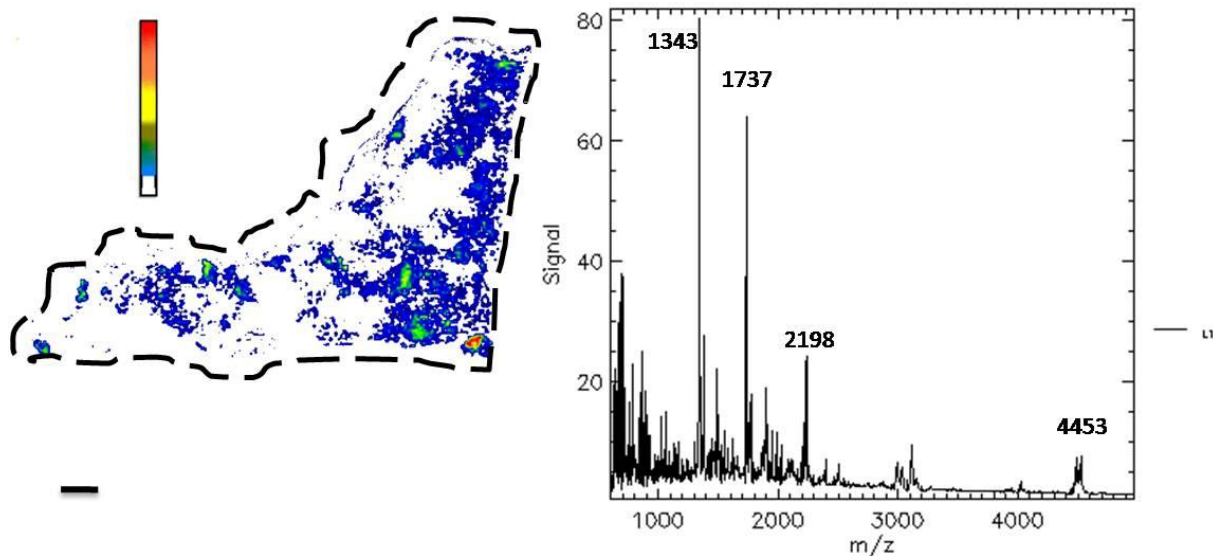


Figura 18. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de *H. raniceps* realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado de um animal que não sofreu estimulação elétrica cujo tecido foi obtido no último dia de experimento – Controle C2 – (120 dias em cativeiro). O gráfico à direita representa o espectro de massas global. Apenas os íons com massa molecular igual aquela dos peptídeos caracterizados por sequenciamento de cDNA estão representados nas imagens (Tabela 10). As linhas pontilhadas representam a área do tecido a qual foi feita a varredura. As barras horizontais localizadas no canto inferior esquerdo de cada imagem representam uma escala de 5 mm.

6.4.1. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS QUANDO *H. raniceps* É SUBMETIDA AO CONTATO COM DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS

Os níveis de expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos foram determinados após anfíbios terem sido expostos ao contato com diferentes micro-organismos. Grupos de anfíbios foram banhados a cada 6 horas com 1 mL de solução contendo *E. coli* ou *S. aureus* ou *A. nidulans* (10^6 conídios/mL) por 12 e 36 horas. Como controle experimental, dois grupos de anfíbios foram banhados a cada 6 horas com 1 mL de solução contendo oxacilina, gentamicina e ampicilina, por 12 e 36 horas, respectivamente, assegurando, assim, a ausência de micro-organismos em tal solução. Após os tempos de exposição, as peles dos anfíbios foram dissecadas e submetidas ao isolamento do RNA total com o objetivo de

quantificar a expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos, por meio de qPCR. Foi realizada a análise da expressão de oito genes específicos, estruturalmente relacionados com peptídeos antimicrobianos isolados de anfíbios, além dos grupos de genes que codificam as Raniseptinas A e Raniseptinas B.

As figuras 19 e 20 apresentam, respectivamente, os gráficos de expressão relativa dos genes após 12 e 36 horas de exposição dos anfíbios aos micro-organismos. Além do controle experimental (Controle 2), no qual foram realizados banhos com solução contendo antibióticos, os resultados foram comparados com os resultados do experimento da cinética de expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos após a estimulação elétrica (Item 6.3.1), no que se diz respeito aos tempos 12 e 36 horas após o estímulo elétrico (Controle 1).

Os resultados demonstram que a presença dos micro-organismos na pele dos anfíbios promoveu o aumento dos níveis de expressão de todos os genes analisados, tanto após 12, quanto após 36 horas de exposição, quando comparados com os níveis de expressão daqueles anfíbios que sofreram apenas a estimulação elétrica (Controle 1). Por outro lado, e de forma interessante, os anfíbios submetidos aos banhos com solução contendo antibióticos (Controle 2) apresentaram altíssimos níveis de expressão relativa dos genes analisados, de tal maneira que estes superaram até mesmo aqueles dos anfíbios submetidos ao contato com os micro-organismos.

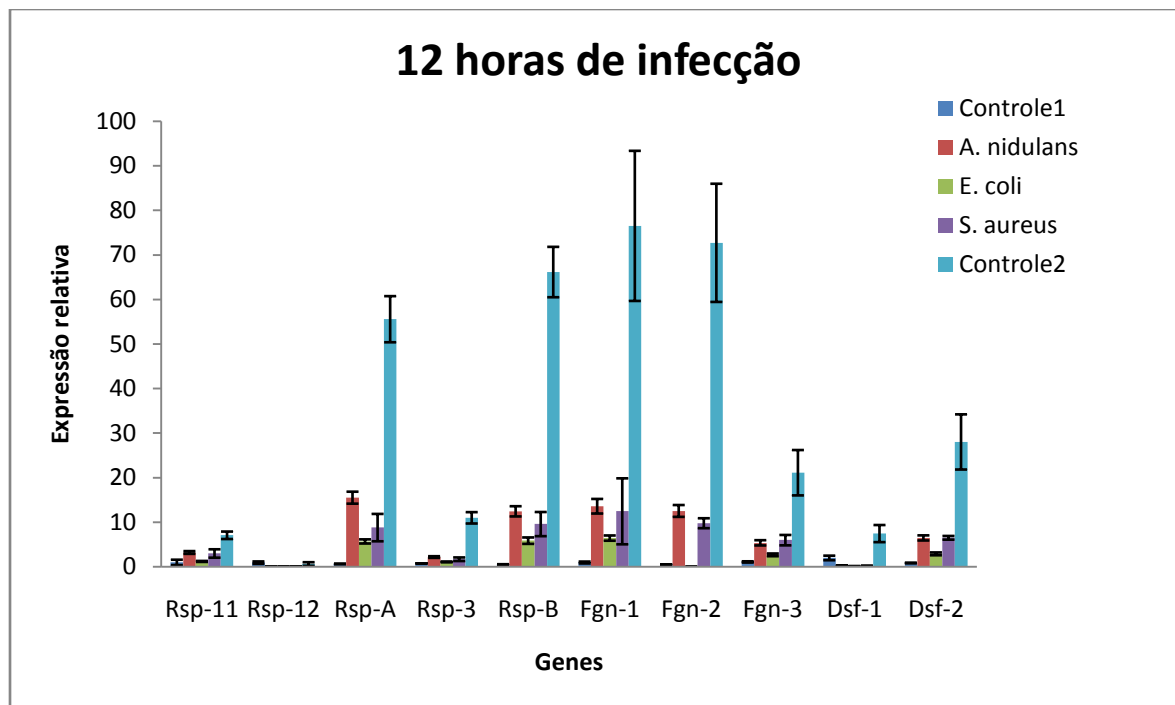


Figura 19. Expressão relativa de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em *H. raniceps* após os anfíbios terem sido submetidos ao contato com diferentes micro-organismos por um período de 12 horas. As expressões são relativas ao gene ALL6 do Controle1. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica para a proteína actina. Controle 1 – animais submetidos apenas à estimulação elétrica cujos tecidos foram isolados 12 horas após a aplicação do mesmo. Controle 2 – animais que foram banhados com solução contendo tetraciclina, eritromicina e ampicilina. As barras horizontais representam os desvios padrões médios.

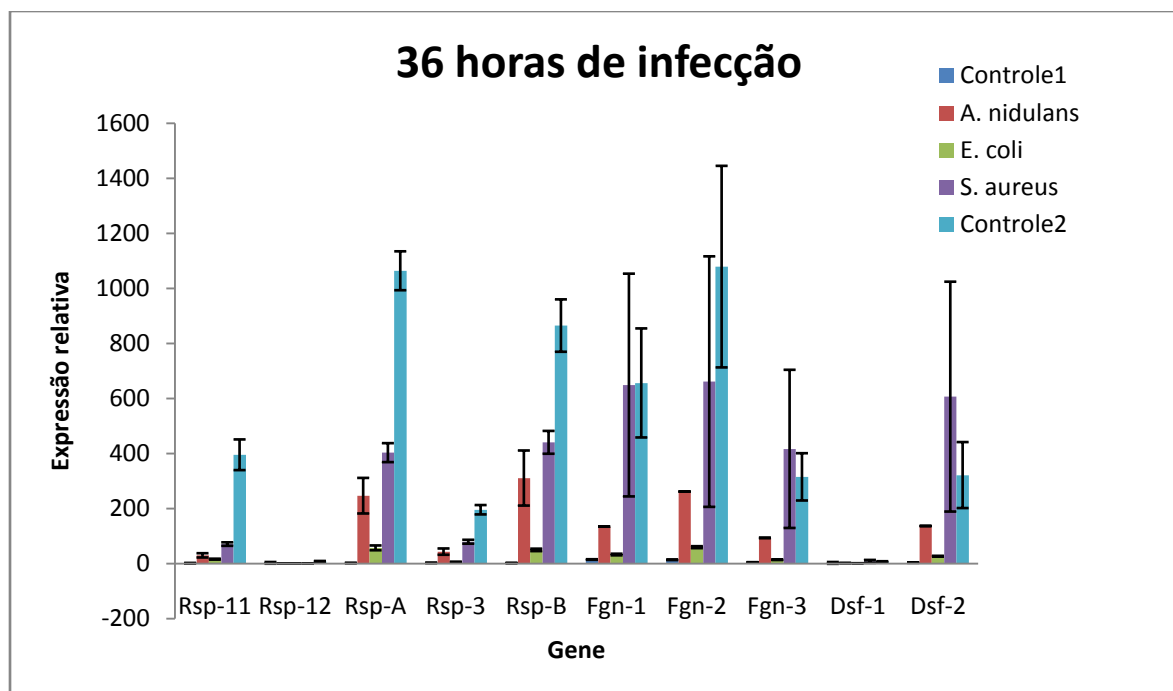


Figura 20. Expressão relativa de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em *H. raniceps* após os anfíbios terem sido submetidos ao contato com diferentes micro-organismos por um período de 36 horas. As expressões são relativas ao gene ALL6 do Controle1. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica para a proteína actina. Controle 1 – animais submetidos apenas à estimulação elétrica cujos tecidos foram isolados 36 horas após a aplicação do mesmo. Controle 2 – animais que foram banhados com solução contendo tetraciclina, eritromicina e ampicilina. As barras horizontais representam os desvios padrões médios.

Para permitir uma análise mais precisa, no que se diz respeito apenas aos níveis de expressão gênica apresentados pelos anfíbios submetidos ao contato com os micro-organismos, os dados relacionados à expressão dos controles contendo antibióticos foram retirados (Figuras 21 e 22).

No que se diz respeito aos níveis de expressão dos genes quando os anfíbios foram submetidos ao contato com micro-organismos específicos, tanto após 12, quanto após 36 horas de infecção, a presença de *A. nidulans* e *S. aureus* promoveu um aumento maior na expressão dos genes analisados, quando comparado com aquela promovida por *E. coli*.

Após 12 horas de exposição dos anfíbios aos micro-organismos, os genes que codificam para a Figainina 1 e 2 foram mais expressos em todos os tratamentos. Observa-se que apesar de os genes que codificam para as Rsp-A e Rsp-B apresentarem níveis de expressão tão altos quanto aqueles das Fgn-1 e Fgn-2, aqueles representam a expressão de grupos de moléculas, e não moléculas individuais. Quanto aos anfíbios que ficaram em contato com os micro-organismos por 36 horas, o gene da Figainina 2 foi mais expresso nos tratamentos com *A. nidulans* e *E. coli*, enquanto, a presença de *S. aureus* promoveu um aumento da expressão nos genes da Figainina 1, 2 e 3 e Dissulfina 2.

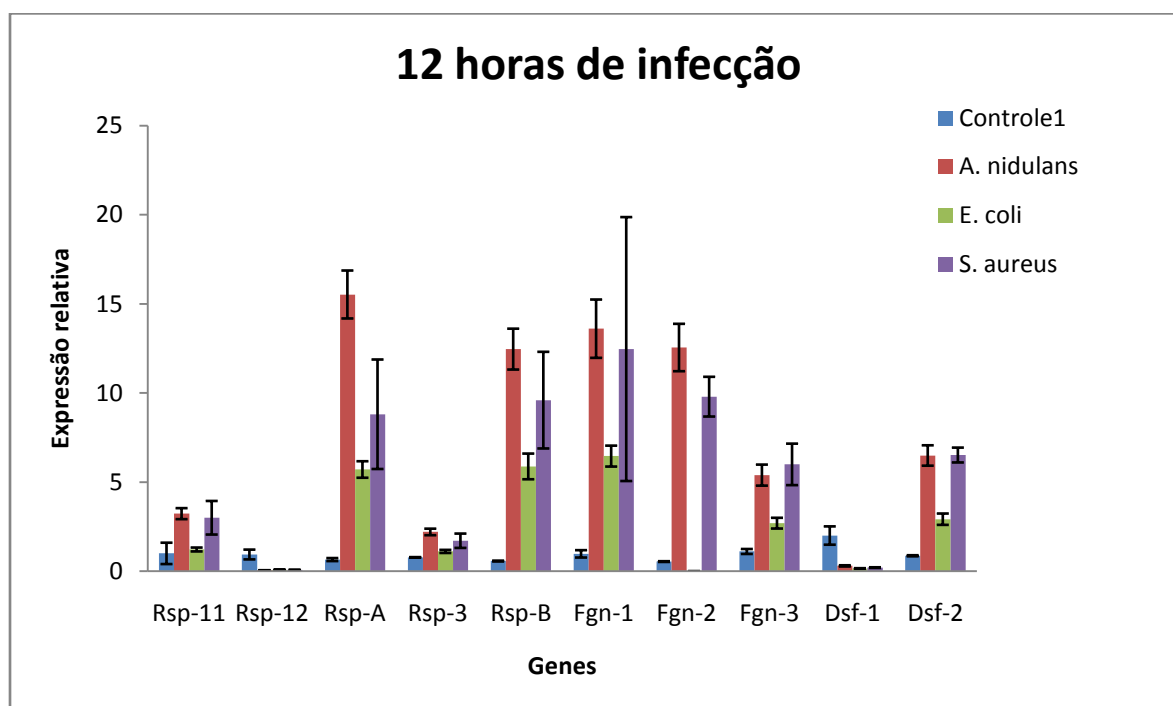


Figura 21. Expressão relativa de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em *H. raniceps* após os anfíbios terem sido submetidos ao contato com diferentes micro-organismos por um período de 12 horas. Os dados relativos ao controle 2 foram omitidos. As expressões são relativas ao gene ALL6 do Controle1. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica para a proteína actina. Controle 1 – animais submetidos apenas à estimulação elétrica cujos tecidos foram isolados 12 horas após a aplicação do mesmo. As barras horizontais representam os desvios padrões médios.

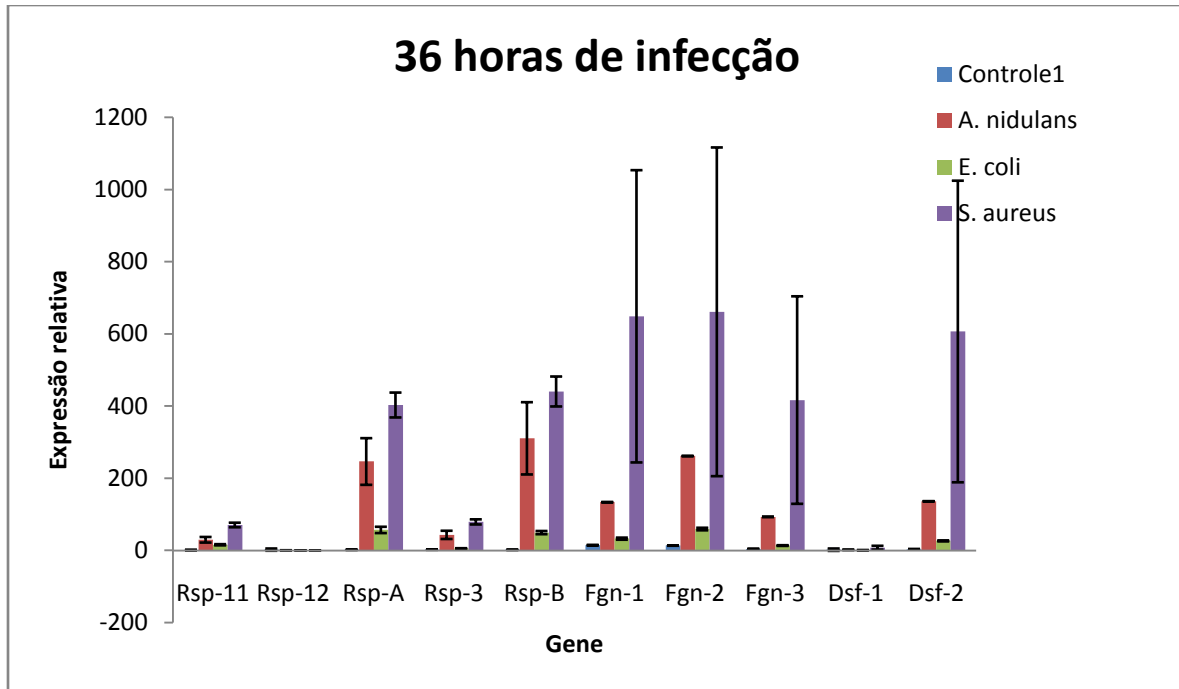


Figura 22. Expressão relativa de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em *H. raniceps* após os anfíbios terem sido submetidos ao contato com diferentes micro-organismos por um período de 36 horas. Os dados relativos ao controle 2 foram omitidos. As expressões são relativas ao gene ALL6 do Controle1. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica para a proteína actina. Controle 1 – animais submetidos apenas à estimulação elétrica cujos tecidos foram isolados 36 horas após a aplicação do mesmo. As barras horizontais representam os desvios padrões médios.

6.4.2. IMAGENS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DOS TECIDOS ISOLADOS DE *H. raniceps* QUANDO ESTA É SUBMETIDA AO CONTATO COM DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS

Utilizando técnicas de obtenção de imagens por espectrometria de massa, foram realizadas análises dos componentes moleculares presentes no tecido cutâneo dorsal de *H. raniceps* após esses anfíbios serem submetidos ao contato com *A. nidulans* ou *E. coli* ou *S. aureus* por um período de tempo igual a 12 e 36 horas. A exposição ocorreu da mesma maneira que foi descrita no item 6.4.1.

Como pode ser observado na Figura 23, os resultados demonstram que existe uma maior concentração de peptídeos na pele dos anfíbios expostos aos micro-organismos, após 12 e 36 horas de exposição, quando comparados com as imagens adquiridas a partir de anfíbios que sofreram apenas a estimulação elétrica e permaneceram em cativeiro pelo mesmo período de tempo (Item 6.3.1). Pode ser observado, também, que o tecido dorsal dos anfíbios controle (banhados com antibióticos) apresenta uma grande concentração de peptídeos, confirmando os dados de expressão os quais demonstram um aumento inesperado na taxa de transcrição dos genes nesses anfíbios. Os resultados apresentados aqui corroboram aqueles apresentados no experimento de determinação dos níveis de transcrição dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos quando *H. raniceps* é submetida ao contato com micro-organismos.

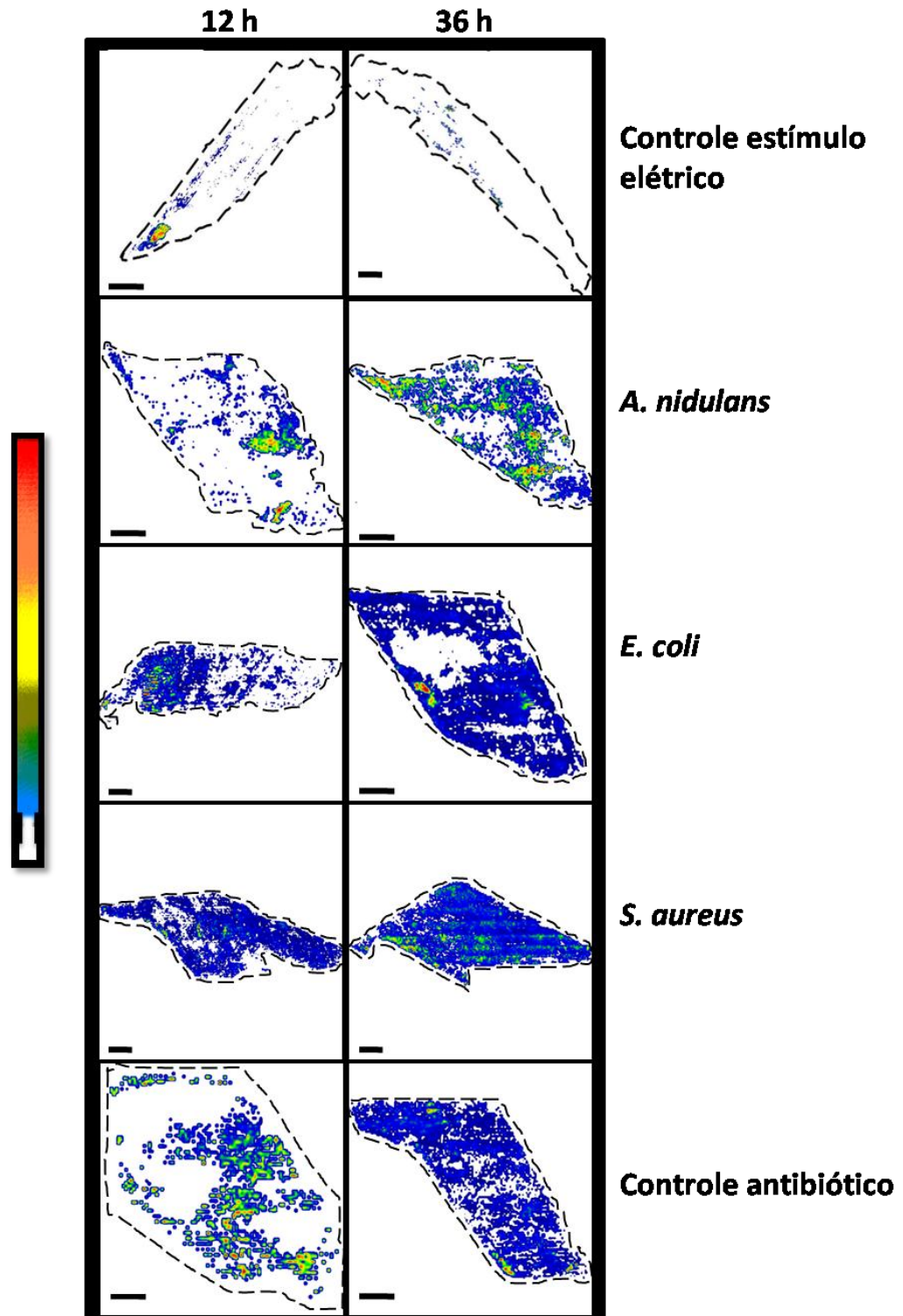


Figura 23. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de *H. raniceps* realizadas por meio de espectrometria de massa após o contato destes com micro-organismos. Apenas os íons com massa molecular igual aquela dos peptídeos caracterizados por sequenciamento de cDNA estão representados nas imagens (Tabela 10). As linhas pontilhadas representam a área do tecido a qual foi feita a varredura. As barras horizontais localizadas no canto inferior esquerdo de cada imagem representam uma escala de 5 mm.

7. DISCUSSÃO

A estratégia utilizada para o sequenciamento de transcritos que codificam pré-pró-peptídeos antimicrobianos em *H. raniceps* produziu o objetivo esperado. Foram sequenciados 17 transcritos com as características estruturais dos RNAs que codificam pré-pró-peptídeos antimicrobianos os quais puderam ser classificados em quatro famílias distintas de acordo com o grau de similaridade existente entre eles, após a tradução *in silico*: Raniseptinas A e Raniseptinas B (Rsp), Figaininas (Fgn) e Dissulfinas (Dsf) (Tabela 8).

Todas as sequências eram inéditas quando caracterizadas, de forma que a família das Raniseptinas configura uma nova classe de peptídeos antimicrobianos isolados a partir da secreção de anfíbios, cuja atividade já foi determinada por esse grupo de pesquisa (MAGALHÃES et al., 2008). Por outro lado, as Figaininas e Dissulfinas se apresentam potencialmente como novas famílias de peptídeos antimicrobianos devido à estrutura característica e diferenciada dos transcritos. No entanto, ensaios biológicos devem ser realizados para determinar a atividade biológica destes, isso porque já foi demonstrado que peptídeos com outras atividades, diferentes da antimicrobiana, caracterizados a partir da secreção cutânea de anfíbios, também apresentam transcritos os quais compartilham das mesmas características de peptídeos sinal e região acídica conservados (THOMPSON et al., 2006).

A maioria dos peptídeos gerados pela digestão *in silico*, realizada a partir das sequências dos peptídeos gerados pela tradução dos cDNAs obtidos, foram caracterizados pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) utilizando técnicas de espectrometria de massa ou degradação de Edman. Em alguns casos, apenas fragmentos correspondentes a estes foram sequenciados. Somente as estruturas peptídicas das Raniseptinas 7, 11, 12 e 13 e a Figainina 3 ainda não foram determinadas pelos métodos bioquímicos. No entanto, isso não é

uma surpresa, desde que a experiência tem demonstrado que as técnicas de sequenciamento de cDNAs e bioquímicas, nos modelos empregados aqui, se complementam, de tal forma que, alguns peptídeos só têm sido caracterizados por técnicas bioquímicas, enquanto outros, apenas por técnicas de biologia molecular.

Todas as sequências nucleotídicas caracterizadas foram submetidas a análises visando o desenho e síntese de oligonucleotídeos específicos para realização de ensaios de expressão relativa de genes por meio de PCR em tempo real (qPCR). Foram desenhados oligonucleotídeos específicos complementares aos transcritos que codificam cada uma das Figaininas e Dissulfinas. No entanto, o alto grau de similaridade existente entre as sequências que codificam as Raniseptinas dificultou o desenho de oligonucleotídeos específicos para todas estas. Sendo assim, apenas os níveis de transcrição correspondentes às Raniseptinas 3, 11 e 12 foram analisados. Dessa forma, para suprir a necessidade de analisar a expressão dos genes que codificam as Raniseptinas, oligonucleotídeos complementares às regiões conservadas dessas moléculas foram desenhados e sintetizados, de tal forma que tornasse possível a amplificação de todas Raniseptinas A ou Raniseptinas B, e, conseqüentemente, a análise dos níveis de transcrição de tais genes. Todos os oligonucleotídeos foram testados quanto a sua eficiência de amplificação os quais apresentaram valores permitidos de inclinação da reta nos ensaios empregados, de tal forma que essa eficiência foi sempre próxima dos 100%. Além disso, a análise das curvas de dissociação dos produtos de PCR correspondente a cada par de oligonucleotídeo permite concluir que estes anelaram de forma específica aos seus respectivos transcritos alvo. Desta forma, os pares de oligonucleotídeos puderam ser utilizados com segurança nas reações de qPCR para fins de comparação de níveis de transcrição entre os diferentes genes de interesse.

Anfíbios têm sido utilizados como modelo de infecção e a estimulação elétrica tem sido empregada como uma maneira de normalizar a quantidade de peptídeos estocados nas

glândulas destes, pelo fato de esse procedimento depletar o conteúdo das glândulas granulares em tais animais (MANGONI et al, 2001; SIMMACO et al, 1998). No entanto, nenhum experimento havia sido realizado com o objetivo de investigar as conseqüências fisiológicas causadas por tal estímulo, no que se diz respeito à síntese *de novo* dos peptídeos e a armazenagem destes nas glândulas. Dessa forma, a primeira etapa deste trabalho foi determinar o perfil dos níveis de expressão dos genes que codificam peptídeos bioativos no tecido cutâneo dorsal desses animais após estes serem induzidos, via estímulo elétrico, a secretar o conteúdo de suas glândulas granulares.

Como pode ser observado nas figuras 6 e 7, houve um aumento nos níveis de transcrição dos genes imediatamente após a aplicação do estímulo elétrico nos anfíbios. Tais níveis de expressão permaneceram elevados 36 horas após o estímulo elétrico, momento no qual os peptídeos começam a ser detectados na pele por meio da utilização da técnica de obtenção de imagens por espectrometria de massa (Figura 12).

O estímulo elétrico promove a depleção dos peptídeos presentes nas glândulas granulares dos anfíbios porque estimula o sistema nervoso simpático, levando à contração involuntária da musculatura lisa em tais animais. Dessa forma, a contração da musculatura que envolve as glândulas granulares resulta na exsudação do conteúdo destas, momento no qual os peptídeos são expelidos para a superfície cutânea, sendo, então, lavados e coletados em tubos. Com isso, de acordo com resultados, e de forma intuitiva, deve existir algum mecanismo capaz de perceber a ausência de peptídeos estocados nas glândulas granulares, de tal forma a induzir o processo de síntese *de novo* de peptídeos para serem estocados na mesma. Da mesma forma, algum mecanismo molecular interromperia esse processo de síntese acelerada quando a concentração dos peptídeos estocados nas glândulas alcança níveis satisfatórios. Em *H. raniceps* tais níveis foram alcançados 36 horas após a aplicação do estímulo elétrico. Outros estudos devem ser realizados para comprovar a existência de tal mecanismo.

Além disso, observa-se que houve um aumento nos níveis de expressão de alguns genes 96 horas após a aplicação do estímulo elétrico. Provavelmente, seguindo a mesma linha de raciocínio, esse aumento ocorreu porque a partir do momento em que existem peptídeos disponíveis nas glândulas granulares uma parcela destes já é enviada para a superfície da pele, onde irão exercer sua função. Sendo assim, o aumento observado foi necessário para manter os níveis mínimos de peptídeos estocados nas glândulas.

Os anfíbios foram submetidos ao contato com diferentes micro-organismos com o objetivo de avaliar as conseqüências desse contato na expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos. No experimento que descreveu a cinética de expressão dos genes após o estímulo elétrico, observa-se que tais níveis de expressão aumentam nas primeiras 24 horas os quais começam diminuir 36 horas após o estímulo. Dessa forma, os anfíbios foram expostos ao contato com micro-organismos durante 24 e 36 horas para avaliar se a expressão dos genes seria diferente daquela observada com aplicação do estímulo elétrico após os mesmos períodos de tempo.

Alguns estudos já haviam demonstrado que a presença de microorganismo afeta a quantidade de peptídeos presentes na secreção cutânea de anfíbios (MANGONI et al., 2001; SIMMACO et al., 2008). Nas figuras 21 e 22 é possível observar que a presença de *A. nidulans*, *E. coli* e *S. aureus* promoveu um aumento das taxas de transcrição dos genes quando comparado com aquelas observadas em anfíbios submetidos apenas ao estímulo elétrico. Observa-se que os níveis de expressão que já eram aumentados 24 horas após o estímulo elétrico tornaram-se ainda mais expressivos na presença dos micro-organismos. Além disso, aparentemente, a presença de micro-organismos na pele dos anfíbios promove um estímulo constante o qual se torna cada vez mais significativo com o passar do tempo, como pode ser observado pelo fato de os níveis de transcrição dos genes apresentarem-se mais intensificados 36 horas após o contato com os micro-organismos, momento no qual os níveis

de expressão dos genes começam a diminuir quando os anfíbios são submetidos apenas ao estímulo elétrico.

A utilização das ferramentas para obtenção de imagens moleculares por espectrometria de massa foi indispensável para confirmar os resultados apresentados nos ensaios de quantificação relativa da expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos. Sabe-se que existem várias etapas entre a transcrição de um gene e a sua tradução em proteínas e que nem todos os RNAs transcritos são necessariamente traduzidos. Além disso, no caso dos peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea de anfíbios ainda pode existir uma etapa entre a síntese do peptídeo e o processo de excreção para a estocagem nas glândulas granulares. Como se observa na Figura 23, a concentração de peptídeos identificados nas imagens obtidas por espectrometria de massa foi maior nos tecidos isolados de anfíbios mantidos na presença de micro-organismos, quando comparada com aqueles que sofreram apenas a estimulação elétrica. Dessa forma, a presença dos micro-organismos não afetou apenas os níveis de transcrição dos genes analisados, mas, também, todo o processo de síntese e processamento peptídico, assim como, de estocagem nas glândulas granulares.

Tanto com 12, quanto com 36 horas de exposição aos micro-organismos, os níveis de expressão dos genes analisados apresentaram-se maiores nos anfíbios os quais foram submetidos ao contato com *A. nidulans* e *S. aureus*. Tais níveis de expressão gênica foram relativamente parecidos, e sempre superiores àqueles dos anfíbios em contato com *E. coli*.

Já foi demonstrado que a Raniseptina 1, peptídeo isolado a partir da secreção cutânea de *H. raniceps*, possui ação antimicrobiana quando testada com *E. coli* e *S. aureus*, a qual apresentou valores de MICs (concentração mínima inibitória) iguais a 5 e 20 μM , respectivamente (MAGALHÃES *et al.*, 2008). Extrapolando esses resultados para um sistema *in vivo*, *H. raniceps* necessitaria de produzir quatro vezes mais peptídeos para controlar o

crescimento de *S. aureus* do que o necessário para inibir o crescimento de *E. coli*. Dessa forma, isso explicaria o fato de os níveis de expressão dos genes se apresentarem sempre maiores nos anfíbios que ficaram em contato com *S. aureus* do que aqueles que ficaram em contato com *E. coli*. Além disso, de um modo geral, os testes biológicos *in vitro* realizados com peptídeos antimicrobianos isolados a partir da secreção de anfíbios apontam para uma maior atividade destes na inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas.

No que se diz respeito às altas taxas de expressão gênica observadas em anfíbios que ficaram em contato com *A. nidulans*, ensaios *in vitro* sugerem que os anfíbios sejam mais susceptíveis a infecções causadas por fungos do que por bactérias (CONLON et al, 2004; ROLLINS-SMITH e CONLON, 2005; DASZAC et al., 1999). Uma evidencia disto é relacionada ao fato de haver um menor número de peptídeos antimicrobianos, isolados de anfíbios, com atividade antifúngica depositados em bancos de dados, quando comparado com o número daqueles que possuem atividade antibacteriana (The Antimicrobial Peptides DataBase - <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> - acessado em 07 de Janeiro de 2010). Além disso, a infecção causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* tem afetado populações de anfíbios em todo o mundo. Tal infecção tem sido apontada como a principal causadora do declínio acelerado de populações de anfíbios no planeta (KRIGER e HERO, 2009; ROLLINS-SMITH e CONLON, 2005; DASZAC et al., 2003). Dessa maneira, o anfíbio necessitaria de uma concentração maior de peptídeos na secreção cutânea para conseguir inibir o crescimento de fungos, o que explicaria as altas taxas de transcrição gênica e a grande quantidade de peptídeos na pele observados.

Já foi demonstrado que, em moscas, existem duas rotas de sinalização diferentes que levam à síntese de peptídeos antimicrobianos por meio da ação de dois tipos de fatores nucleares de transcrição distintos: DIF é ativado principalmente em resposta a infecções promovidas por fungos e bactérias Gram-positivas, enquanto Relish àquelas promovidas por

bactérias Gram-negativas (LEMAITRE et al., 1996). De maneira semelhante, os resultados apresentados aqui permitem especular que os anfíbios também podem possuir dois mecanismos de sinalização distintos capazes de promover ativação do sistema imune inato de defesa, dos quais um seria ativo na presença de bactérias Gram-negativas (estímulo mais fraco) e outro de Gram-positivas e/ou fungos (estímulo mais forte). Tal especulação iria contra o que foi proposto por MANGONI e colaboradores (2001), os quais propuseram que a síntese de peptídeos antimicrobianos em *Pelophylax esculentu* aconteceria de forma indiferente à espécie de micro-organismos que estariam expostos a ele.

Após 12 horas de exposição dos anfíbios aos micro-organismos, os genes que codificam para a Figainina 1 e 2 foram mais expressos em todos os tratamentos. Quanto aos anfíbios que ficaram em contato com os micro-organismos por 36 horas, o gene da Figainina 2 foi mais expresso nos tratamentos com *A. nidulans* e *E. coli*, enquanto, a presença de *S. aureus* promoveu um aumento da expressão nos genes da Figainina 1, 2 e 3 e Dissulfina 2. Dessa forma, os resultados apresentados apontam esses peptídeos como bons candidatos para análises visando a determinação da atividade biológica, já que estes ainda não foram testados quanto sua capacidade antimicrobiana. Apenas depois de determinar se esses peptídeos possuem ação antimicrobiana, testando-os com os mesmo micro-organismos utilizados aqui, outras suposições poderão ser inferidas a respeito das variações dos níveis de transcrição de seus respectivos genes na presença de microorganismo específicos.

MANGONI e colaboradores (2001) observaram que a intensidade das frações cromatográficas resultantes da purificação dos componentes moleculares presentes na secreção cutânea de *Pelophylax esculentus* submetida a banhos com *Aeromonas hydrophila* foi maior do que aquela observada em anfíbios que foram banhados com solução contendo tetraciclina e eritromicina. Sendo assim, como controle negativo para o experimento de determinação dos níveis de expressão dos genes quando *H. raniceps* foi submetida ao contato

com micro-organismos, os anfíbios foram banhados com solução contendo gentamicina, oxacilina e ampicilina, de forma a garantir a ausência de micro-organismos em tal solução.

De maneira interessante, os resultados dos experimentos apresentados aqui demonstram que houve um aumento dos níveis de transcrição dos genes analisados quando *H. raniceps* foi submetida a banhos com solução contendo os antibióticos, de forma que tais níveis de expressão foram mais elevados do que aqueles apresentados por anfíbios submetidos aos micro-organismos. Algumas proposições podem ser levantadas a respeito de tais resultados:

i) LOTZ e colaboradores (2006) demonstraram que a presença de antibióticos β -lactâmicos estimulam a liberação de ácido lipoteicoico em *S. aureus* o qual ativa diretamente o sistema imune inato de defesa. Dessa maneira, os antibióticos utilizados no experimento estariam estimulando a liberação de tais ácidos por bactérias presentes na micro-biota normal da pele de *H. raniceps*, ativando o sistema imune inato;

ii) uma das causas apontadas para tentar explicar o declínio de populações de anfíbios é a interferência causada por fatores químicos externos, como pesticidas ou outros compostos (BLAUSTEIN et al, 2003; COLLINS e STORFER, 2003). Dessa forma, os antibióticos poderiam produzir algum dano físico, ou alguma irritação na pele desses animais, gerando estresse suficiente para promover o aumento da síntese de peptídeos;

iii) por último, os antibióticos utilizados no experimento são moléculas derivadas de micro-organismos. A gentamicina é um inibidor da síntese de peptídeos produzida pelo acnomiceto *Micromonospora purpurea*. De maneira semelhante, a ampicilina e a oxacilina são antibióticos semi-sintéticos, β -lactâmicos, sintetizados quimicamente com base na estrutura das penicilinas as quais são antibióticos naturais produzidos por fungos do gênero *Penicillium* e pelo próprio *Aspergillus nidulans*, utilizado em nossos ensaios. Tais microorganismos compõem a micro-biota do solo e de matéria vegetal em fase de decomposição. Sendo assim, a

gentamicina, a oxacilina e a ampicilina poderiam se comportar como moléculas sinalizadoras de infecção em *H. raniceps* e conseqüentemente ativar os mecanismos de defesa já discutidos anteriormente. Como as concentrações molares dos antibióticos utilizados foram relativamente altas, isto explicaria o fato de o estímulo produzido por estes ter sido mais eficiente na indução da expressão dos genes do que a presença de micro-organismos.

Quanto aos experimentos realizados por MANGONI e colaboradores (2001), o anfíbio utilizado como modelo de infecção possui características ecológicas distintas de *H. raniceps*. Aquele possui habitat aquático, enquanto este arborícola. Desta forma, as características fisiológicas e de absorção de moléculas pela pele devem ser diferentes, e, provavelmente, por causa disto, os resultados não foram similares, no que se diz respeito ao tratamento dos anfíbios com antibióticos. Além disso, outra explicação para as discrepâncias dos dois resultados poderia ser ilustrada pelo fato de que as observações descritas no trabalho realizado por MANGONI tiveram como base um modelo experimental diferente do proposto aqui.

8. CONCLUSÃO

A depleção do conteúdo peptídico estocado nas glândulas granulares presentes na pele de *H. raniceps*, promovida pelo estímulo elétrico, induz a um aumento dos níveis de transcrição de genes que codificam peptídeos antimicrobianos. Os níveis de transcrição de tais genes permanecem elevados até o ponto em que as glândulas granulares se tornam novamente carregadas de peptídeos, momento no qual os níveis de transcrição retornam aos valores daqueles observados nos animais controle.

A presença de micro-organismos na pele de *H. raniceps* estimula o aumento dos níveis de transcrição dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos nesses animais, assim como, todo o processo de síntese, processamento e estocagem desses peptídeos nas glândulas granulares. Tais genes são mais transcritos quando *H. raniceps* está em contato com *A. nidulans* e *S. aureus* do que quando há o contato com *E. coli*.

Uma solução contendo ampicilina, oxacilina e gentamicina estimula, por meio de um mecanismo ainda desconhecido, a síntese de peptídeos antimicrobianos enviados para a pele de *H. raniceps*, de maneira mais eficiente que a solução contendo os micro-organismos testados.

Os resultados apresentados nesse trabalho são fruto de uma estratégia ainda inédita na literatura, especialmente no que diz respeito a um modelo de infecção para avaliação da expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos anfíbios, assim como, da estocagem desses peptídeos nas glândulas granulares. O modelo experimental apresentado aqui poderá ser emulado para determinar os níveis de expressão de outros genes, assim como, com a utilização de outras espécies de micro-organismos. Além disso, o modelo experimental proposto apresenta-se como uma alternativa viável para estudos de análise da expressão diferencial de peptídeos em tecidos biológicos.

9. PERSPECTIVAS

O modelo de infecção proposto no presente trabalho deve ser empregado futuramente com a utilização de outros anfíbios e/ou micro-organismos, assim como, antibióticos, para a validação dos perfis de expressão apresentados aqui. Para se obter uma compreensão mais detalhada dos perfis de expressão, seria necessária a construção de uma biblioteca de ESTs e sequenciamento em larga escala, com vistas a caracterizar todos os transcritos que possuem a estrutura típica daqueles que codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios. Dessa forma, mais genes poderiam ser submetidos às análises de expressão, o que daria uma visão mais ampla das variações de expressão gênica causada pela presença dos diferentes tratamentos.

Devem ser realizados novos ensaios visando análises dos níveis de expressão gênica, em conjunto com a obtenção de imagens moleculares por espectrometria de massa, para observar o efeito da presença dos antibióticos individualmente na pele de *H. raniceps*. Este seria o primeiro passo para buscar evidências acerca dos mecanismos envolvidos no estímulo da expressão de peptídeos promovida pelos antibióticos.

Ensaio biológico devem ser realizados para determinar a atividade/função das Figaininas, tornando possível, assim, inferir a respeito dos níveis expressão apresentados pelos genes que codificam tais peptídeos quando os anfíbios foram colocados em contato com diferentes micro-organismos.

10. ANEXO I. Sequências nucleotídicas dos cDNAs que codificam pré-pró-peptídeos antimicrobianos caracterizados em *H. raniceps*.

>Rsp-01

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATAGTTTCCCTATCCATCTGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGGAGAAGAAGAGGAGAAGCAAGAGGAAGAAAATGAAGAGTTGAGTGAAGAAGAACT
TAGAGAAAAGAGAGCATGGCTTGATAAACTAAAGAGCCTTGGTAAAGTAGTTGGCAAAGTTGCTCTTGGG
GTTGCTCAAATTTACTTGAATCCACAGCAATGATTCATAATGCATAATTATTAATTACGCCAGATATATA
ATAAAACATATTACCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Rsp-02

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATAGTTTCCCTATCCATCTGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGGAGAAGAAGAGGAGAAGCAAGAGGAAGAAAATGAAGAGTTGAGTGAAGAAGAACT
TAGAGAAAAGAGAGCATGGCTTGATAAACTAAAGAGCCTTGGTAAAGTAGTTGGCAAAGTTGCTCTTGGG
GTTGCTCAAATTTACTTGAATCCACAGCAATGATTCATAATGCATAATTATTAATTACGCCAGATATATA
ATAAAACATATTACCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Rsp-03

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATAGTTTCCCTGTCCATCTGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGGAGAAGAAGAGGAGAAGCAAGAGGAAGAAAATGAAGAGTTGAGTGAAGAAGAACT
TAGAGAAAAGGAGAGCATGGCTTGATAAACTAAAGAGCATTGGTAAAGTAGTTGGCAAAGTTGCTATTGGT
GTCGCTAAAAATCTCTTGAATCCACAATGATTCATCACTACGCAGCATAATTATTAATTATGCCAGACAT
ATAATAAAGCATATTACCTGAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Rsp-04

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATAGTTTCCCTATCCATCTGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGGAGAAGAAGAGGAGAAGCAAGAGGAAGAAAATGAAGAGTTGAGTGAAGAAGAACT
TAGAGAAAAGAGAGCATGGCTTGATAAACTAAAGAGCCTTGGTAAAGTAGTTGGCAAAGTTGCTTTTGGG
GTTGCTCAAATTTACTTGAATCCACGGCAATGATTCATAATGCATAATTATTAATTACGCCCA

>Rsp-05

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATAGTTTCCCTATCCATCTGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGGAGAAGAAGAGGAGAAGCAAGAGGAAGAAAATGAAGAGTTGAGTGAAGAAGAACT
TAGAGAAAAGAGAGCATGGCTTGATAAACTAAAGAACCCTTGGTAAAGTAGTTGGCAAAGTTGCTCTTGGG
GTTGTTCAAATTTACTTGAATCCACGGCAATGATTCATAATGCATAATTATTAATTACGCCAGACATATA
ATAAAGCATATTACCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Rsp-06

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATAGTTTCCCTATCCATCTGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGGAGAAGAAGAGGAGAAGCAAGAGGAAGAAAATGAAGAGTTGAGTGAAGAAGAACT
TAGAGAAAAGGAGAGCATTGCTTGATAAACTAAAGAGCCTTGGTAAAGTAGTTGGCAAAGTTGCTCTTGGG
GTTGTTCAAATTTACTTGAATCCACGGCAATGATTCATAATGCATAATTATTAATTACGCCAGATATATA
ATAAAGCATATTACCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Rsp-07

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATAGTTTCCCTGTCCATCTGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGGAGAAGAAGAGGAGAAGCAAGAGGAAGAAAATGAAGAGTTGAGTGAAGAAGAACT
TAGAGAAAAGGAGAGCATTGCTTGATAAACTAAAGAGCCTTGGTAAAGTAGTTGGCAAAGTTGCTCTTGGG
GTTGCTCAACATTTACTTGAATCCACAGCAATGATTCATAATGCATAATTATTAATTACGCCAGACATATA
ATAAAGCATATTACCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Rsp-09

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATAGTTTCCCTGTCCATCTGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGGAGAAGAAGAGGAGAAGCAAGAGGAAGAAAATGAAGAGTTGAGTGAAGAAGAACT
TAGAGAAAAGGAGAGCATGGCTTGATAAACTAAAGAGCATTGGTAAAGTAGTTGGCAAAGTTGCTATTGGT
GTCGCTAAAAATTTCTTGAATCCACAATGATTCATCACTACGCAGCATAATTATTAATTATGCCAGACAT
ATAATAAAGCATATTACCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Rsp-10

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATAGTTTCCCTGTCCATCTGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGGAGAAGAAGAGGAGAAGCAAGAGGAAGAAAATGAAGAGTTGAGTGAAGAAGAACT
TAGAGAAAAGGAGAGCATGGCTTGATAAACTAAAGAGCCTTGGTAAAGTAGTTGGCAAAGTTGCTCTTGGG
GTTGTTCAAAATTACTTGAATCCACGGCAATGATTCATAATGCATAATTATTAATTACGCCAGACATATA
ATAAAGCATATTACCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Rsp-11

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATAGTTTCCCTATCCATCTGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGGAGAAGAAGAGGAGAAGCAAGAGGAAGAAAATGAAGAATTGAGTGAAGAAGAACT
TAGAGAAAAGGAGAGCATTTGCTTGATAAACTAAAGAGCCTTGGTAAAAAGTAGGGGAAAAGTTGCTATTG
GAGTTGCTCAACATTACTTGAATCCACAGCAATGATTCATAATGCATAATTATTAATTACGCCAGACATA
TAATAAAGCATATTACCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Rsp-12

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATAGTTTCCCTATCCATCTGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGGAGAAGAAGAGGAGAAGCAAGAGGAAGAAAATGAAGAGTTGAGTGAAGAAGAACT
TAGAGAAAAGGAGAGCATTTGCTTGATAAACTAAAGAACCCTCGGTAAAGTAGTTGGCAAAGTTTTTTTTTGGG
GTTGCTCAACATTACTTGAATCCACAGCAATGATTCATAATGCATAATTATTAATTACGCCAGACATATA
ATAAAGCATATTACCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Rsp-13

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATAGTTTCCCTGTCCATCTGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGGAGAAGAAGAGGAGAAGCAAGAGGAAGAAAATGAAGAGTTGAGTGAAGAAGAACT
TAGAGAAAAGGAGAGCATTTGCTTGATAAACTAAAGAGCCTTGGTAAAGTAGTTGGCAAAGTTGCTCTTGGG
GTTGTTCAACATTACTTGAATCCACGGCAATGATTCATAATGCATAATTATTAATTACGCCAGACATATA
ATAAAGCATATTACCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Fgn-01

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATAGTTTCCCTGTCCATCGGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGAAGAGGAGAAGAATGAAGAGGGTGCAAACCAGGAGGAAAATGCAGAAAAGTAAAGA
AAAGAGATTTATCGGAACCTTTAATTCCTCTGGCTTTAGGAGCTTTGACAAAACCTTTTAAAGGGTTGATAA
AATGTAATGTTTTATCACTAAGAAGCACGATTATCATTAGTTGTGCCAGACATATAATAAAGCTTATGAA
CTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Fgn-02

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATCGTTTCCCTGTCCGTCTGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGGAGAAGAAAAAGAGGAGAAGAGAGAAGAGGAAGAGGGGAAGGAAGAAAATGAAGA
CGGAAATGAGGAACACAAAGAAAAGAGATTTCCTCGGCGCTATTTTAAAAATTGGACATGCACTTGCTAAA
ACAGTTCTTCTATGGTGACCAATGCCTTTAAACCAAAGCAATAATTCCTCTCTAAGGAGCATAATAATT
ATTAGTTATGCCTGACATATAATAAAGCATAATAATTATTAGTTCTGCCTGACATATAATAAAGCATAAT
AATTATTAGTTCTGGCAGACATATAATAAAGCATAATAATTATTAGTTCTGACAGACATATAATAAAGCA
TAATAATTATTAGTTATGCCTGACATATAATAAAGCATAATAATTATTAGTTCTGCCTGACATATAATAA
AGCATATTAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Fgn-03

ATGGCTTTCCTGAAAAAGTCCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGAAATAGTTTCCCTGTCCATCGGTGAAG
AAGAGAAAAGAGAAGAAGAGGAGAGAAGAATGAAGAGGAAGAAAATGAAGAGGATAATGTGAAAAATAGAGA
AAAAAGATTTTTTGGAGCTATTGTACCTTGGCTTATATCACTTGTTAGTAGTTGGGTTAAAAAAGGTTGA
TAAAATGTAATGTTTTATCTCTAAGGAGCATGATTAGTTGTGGCAGACATATAATAAAGCATATTAGTAA
AATAATCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Dsf-01

ATGGCTTTCCTGAAAAAGTCGCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGATTAGTTTCCCTGTCCATCTGTGAAG
AAGAGAACAGAGAGGAAGAAAGGGAGGAGAACGAGCCGGATAACAGCGAGGAGGGAAATGAAGAGGAAGC
GGAGGATACTAAAGAAAAGAGAGATAAGGAGCGTCCCATTTGTTCAAATACTTTCAGAGGACGTAAATGT
GGATAAAATCTTTACTTTGGTCCCTAAGCAGCACAATTGTTTTTAGCTGCGGCAGACATATAATAAAGCA
GATGTAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>Dsf-02

ATGGCTTTCCTGAAGAAATCTCTTTTCCTTGTACTATTCCTTGGATTAGTTTCCCTGTCCATCTGTGAAG
AAGAGAACAGAGAGGAAGAAAGGGAGGAGAACGAGGGGAATGACAGCAAGGAGGAAGAGGAGGGAAATGA
AGAGGAAAATGAGGAGAGTAAAGAAAAGGAAAAGCGTGCATGTTTTCTCACTCGTCTTGGAACATATGTT
TGTGGATAAAATCTTCACTTTGGTCCCTAAGCCGCACAATTGTCTTAGCTGTGGCAGACATATAATAAA
GCAGATGTAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, K. V. **Toll signalling pathways in the innate immune response.** *Curr. Opin Immunol.* v. 12, p. 13–19, 2000.
- ANDRADE, A. C.; DEL SORBO, G.; VAN NISTELROOY, J. G.; WAARD, M. A. **The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds.** *Microbiology.* v. 146 (8), p. 1987-97, 2000.
- BLAUSTEIN, A. R.; ROMANSIC, J. M.; KIESECKER, J. M.; HATCH, A. C. **Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines.** *Diversity and Distributions.* v. 9, p. 123 – 140, 2003.
- BRAND, G. D.; LEITE, J. R., DE SÁ MANDEL, S. M.; MESQUITA, D. A.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; BARBOSA, E. A.; VINECKY, F.; MARTINS, G. R.; GALASSO, J. H.; KUCKELHAUS, S. A.; SAMPAIO, R. N.; FURTADO, J. R. JR.; ANDRADE, A. C.; BLOCH, C. Jr. **Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia).** *Biochem Biophys Res Commun.*, Sep 1;347(3), p. 739-46, 2006.
- BROWN, K.L.; HANCOCK R.E. **Cationic host defense (antimicrobial) peptides.** *Curr. Opin. Immunol.* v. 18 (1), p. 24–30, 2006.
- CHEN, T.; GAGLIARDO, R.; WALKER, B.; ZHOU, M.; SHAW, C. **Partial structure of the phylloxin gene from the giant monkey frog, *Phyllomedusa bicolor*: parallel cloning of precursor cDNA and genomic DNA from lyophilized skin secretion.** *Peptides.* v. 26 (12), p. 2624-2628. , 2005.
- COLLINS, J. P. e STORFER, A. **Global amphibian declines: sorting the hypotheses.** *Diversity and Distributions.* v. 9, p. 89 -98, 2003.

- CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. **Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents.** *Biochim Biophys Acta.* v. 14 (1), p. 1-14, 2004.
- CSORDÁS, A.; MICHL, H. **Primary structure of two oligopeptides of the toxin of *Bombina variegata* L.** *Toxicon.* v. 07 (2), p. 103-108, 1969.
- DASZAK, P.; BERGER, L.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. **Infectious disease and amphibian population declines.** *Diversity and Distributions.* v. 9, p. 141–150, 2003.
- DASZAK, P.; BERGER, L.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D.; GREEN, D. E.; SPEARE, R. **Emerging infectious diseases and amphibian population declines.** *Emerg Infect Dis.* v. 05 (6), p. 735-48, 1999.
- DOCKRAY, G. J.; HOPKINS, C. R. Caerulein Secretion by Dermal Glands in *Xenopus laevis*. *The Journal of cell Biology* . v. 64, p. 724-733, 1975.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians.** The Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, USA, 1994.
- GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. **Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides.** *Eur J Biochem.* v . 268 (21), p. 5589-5600, 2001.
- HOFFMANN; J. A.; KAFATOS, F. C.; JANEWAY, C. A.; EZEKOWITZ, R. A. **Phylogenetic perspectives in innate immunity.** *Science.* v. 21 (284), p. 1313–1318, 1999.
- JANEWAY, C. A. JR.; MEDZHITOV, R. **Innate immune recognition.** *Annu. Rev. Immunol.* v. 20, p. 197–216, 2002.

- JIANG, H. E KANOST, M.R. **The clip-domain family of serine proteinases in arthropods.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* v. 30, p. 95-105, 2000.
- KRIGER, K. M. e HERO, J. M. **Chytridiomycosis, amphibian extinctions, and lessons for the prevention of future panzootics.** *Ecohealth.* v. 6(1), p. 6-10, 2009.
- LEITE, J.R.S.A. ; SILVA, L.P. ; RODRIGUES, M.I.S. ; PRATES, M.V. ; BRAND, G.D. ; LACAVAL, B.M.; AZEVEDO, R.B. ; BOCCA, A.L. ; ALBUQUERQUE, S. ; BLOCH Jr., C. . **Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus.** *Peptides, USA,* v. 26 (4), p. 565-573, 2005.
- LEMAITRE, B. e HOFFMANN, J. **The host defense of *Drosophila melanogaster*.** *Annu Rev. Immunol.* v. 25, p. 697–743, 2007.
- LEMAITRE, B.; NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J. A. **The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.** *Cell.* v. 86, p. 973–983, 1996.
- LOTZ, S.; STARKE, A.; ZIEMANN, C.; MORATH, S.; HARTUNG, T.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. **Beta-lactam antibiotic-induced release of lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* leads to activation of neutrophil granulocytes.** *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* n. 27, p. 5 -15, 2006.
- MAGALHÃES, B. S.; MELO, J. A.; LEITE, J. R.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; VINECKY, F.; BARBOSA, E. A.; VERLY, R. M.; MEHTA, A.; NICOLI, J. R.; BEMQUERER, M. P.; ANDRADE, A. C.; BLOCH, C. Jr. **Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*.** *Biochem Biophys Res Commun.* v. 26;377(4), p. 1057-61, 2008.

- MANGONI, M. L.; MIELE, R.; RENDA, T. G.; BARRA, D.; SIMMACO, M. **The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms.** FASEB J. v. 15 (8), p. 1431-442, 2001.
- MECKE, A.; LEE, D. K.; RAMAMOORTHY, A.; BRADFORD, G. Orr.; BANASZAK, M. M. H. Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding - **An atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers.** Biophys J BioFAST. v. 23, 2005.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. JR. **Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system.** Science. v. 296, p. 298–300, 2002.
- MEINCKEN, M.; HOLROYD, D. L.; RAUTENBACH, M. **Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of *Escherichia coli*.** ANTIMICROBIAL Agents and chemotherapy. v. 49 (10), p. 4085–4092, 2005.
- MIELE, R.; PONTI, D.; BOMAN, H. G.; BARRA, D.; SIMMACO, M. **Molecular cloning of a bombinin gene from *Bombina orientalis*: detection of NF-kappaB and NF-IL6 binding sites in its promoter.** FEBS Lett. v. 10, n. 431(1), p. 23-28, 1998.
- NICOLAS, P.; VANHOYE, D.; AMICHE, M. **Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides.** Peptides. v. 24, p. 1669–1680, 2003.
- PRATES, M. V. e BLOCH, C. Jr. **Peptídeos Antimicrobianos: Uma alternativa no combate a micro-organismos resistentes.** Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento (Revista on-line), 2000.
- 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. v. 23 (3), p. 368-393, 2006.

- ROLLINS-SMITH, L. A.; CONLON, J. M. **Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations.** Dev Comp Immunol. v. 29 (7), p. 589-98, 2005.
- SAHL, H. G.; PAG, U.; BONNESS, S.; WAGNER, S.; ANTCHEVA, N.; TOSSI, A. **Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity.** J. Leukoc. Biol. v. 77, p. 466–475, 2005.
- SCHEINMAN, R. I., COGSWELL, P. C., LOFQUIST, A. K., BALDWIN, A. S. JR. **Role of Transcriptional Activation of IkappaBalpha in Mediation of Immunosuppression by Glucocorticoids.** Science. v. 270, p. 283-286, 1995.
- SEBEN, A.; SCHWARTZ, C. A.; CRUZ, J. S. **A Defesa Química dos Anfíbios.** Ciência Hoje. v. 15, p. 25-33, 1993.
- SIMMACO, M.; BOMAN, A.; MANGONI, M. L.; MIGNOGNA, G.; MIELE, R.; BARRA, D.; BOMAN, H. G. **Effect of glucocorticoids on the synthesis of antimicrobial peptides in amphibian skin.** FEBS Lett. v. 27, n. 416 (3), p. 273-275, 1997.
- SIMMACO, M.; MANGONI, M. L.; BOMAN, A.; BARRA, D.; BOMAN, H. G. **Experimental infections of Rana esculenta with Aeromonas hydrophila: a molecular mechanism for the control of the normal flora.** Scand J Immunol. v. 48 (4), p. 357-363, 1998.
- SHAI, Y. **Mode of action of membrane active antimicrobial peptides.** Biopolymers. v. 66, p. 236–248, 2002.
- SHAI, Y. **Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides.** Biochim. Biophys. Acta.; v. 1462, p. 55–70, 1999.

- TERRY, A. S.; POULTER, L.; WILLIAMS, D. H.; NUTKINS, J. C.; GIOVANNINI, M. G.; MOORE, C. H.; GIBSON, B. W. **The cDNA sequence coding for prepro-PGS (prepro-magainins) and aspects of the processing of this prepro-polypeptide.** J. Biol. Chem. v. 263, p. 5745–5751, 1988.
- THOMPSON AH, BJORSON AJ, SHAW C, MCCLEAN S. **Bradykinin-related peptides from Phyllomedusa hypochondrialis azurea: Mass spectrometric structural characterisation and cloning of precursor cDNAs.** Rapid Commun Mass Spectrom. v. 20 (24), p. 3780 – 788, 2006.
- TOLEDO, R. C.; JARED, C. **Cutaneous granular glands and amphibian venoms.** Camp. Biochem. Physiol. v. 111 (1), p. 1-29, 1995.
- 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. v. 270, p. 2068–2081, 2003.
- VOUILLE, V.; AMICHE, M.; NICOLAS, P. **Structure of genes for dermaseptins B, antimicrobial peptides from frog skin. Exon 1-encoded prepropeptide is conserved in genes for peptides of highly different structures and activities.** FEBS Lett. v. 1, n. 414 (1), p. 27-32, 1997.
- WIEPRECHT, T.; DATHE, M.; KRAUSE, E.; BEYERMANN, M.; MALOY, W. L.; MACDONALD, D. L.; BIENERT, M. **Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment.** FEBS Lett. v. 3, n. 417 (1), p. 135-140, 1997.

ZASLOFF, M. **Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: Isolation, characterization of two active forms, and partialcDNA sequence of a precursor.** Microbiology. v. 84, p. 5449-5453, 1987.

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](#)