

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

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ANÁLOGO DA OCELATINA-P1
ISOLADO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DO ANURO
*Leptodactylus labyrinthicus***

CÉSAR AUGUSTO PRÍAS MÁRQUEZ

2012

CÉSAR AUGUSTO PRÍAS MÁRQUEZ

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ANÁLOGO DA OCELATINA-P1
ISOLADO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DO ANURO
*Leptodactylus labyrinthicus***

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

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

**BRASÍLIA/DF
2012**

Dissertação de Mestrado

César Augusto Prías Márquez

Título:

“Purificação e caracterização de um análogo da ocelatina-P1 isolado da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*”

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Mariana de Souza Castro
Presidente / Orientadora
UnB

Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau
Membro Titular - Interno
Não vinculado ao Programa
UnB/ Ceilândia

Prof. Dr. José Roberto de S. de Almeida Leite
Membro Titular - Externo
Não vinculado ao Programa
UFPI

Profa. Dra. Carolina Madeira Lucci
Membro Suplente - Interno
Vinculado ao Programa
UnB

Brasília, 22 de fevereiro de 2012.

*Dedico este trabalho aos meus pais, por
todo seu amor, apoio e paciência durante
estes anos e por serem exemplo e inspiração
para enfrentar os desafios da vida.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mariana de Souza Castro por toda a confiança, apoio, paciência e orientação recebida durante estes anos.

Ao Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Jr. pelas orientações e a colaboração na coleta dos animais e das secreções.

Ao Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli pela síntese do peptídeo. À Profa. Dra. Sônia Maria de Freitas e à MSc Alice da Cunha Morales Álvares pela colaboração com os ensaios de dicroísmo circular.

À Dra. Isabel de Fátima Correia Batista pela confirmação da estrutura primária do peptídeo sintético.

Ao MSc Fabiano José Queiroz Costa e ao pessoal do Laboratório de Emergência do HUB pela colaboração na realização dos ensaios biológicos.

Ao Nuno Domingues pelo imprescindível apoio técnico e disposição.

Ao meu amigo Jimmy Guerrero por todas as dicas e sugestões nos experimentos, e por sua valiosa amizade.

À minha amiga Sol Rego pelas correções do texto, e também pela amizade.

À Anne e à Elaine pela disposição e colaboração na bancada sempre que foi necessário.

Aos professores do Laboratório de Toxinologia e do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da UnB, sempre dispostos a colaborar.

À Danielle e à Ana Paula, secretárias do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, pela imensa colaboração e eficiência.

A toda minha família pelo apoio recebido desde a distância.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas: Andréa, Rosa, Jéssica, Aline, Jaques, Caroll, Pedro, Humberto, Micaella, Rayner, Adelson, Diana, Siliana, Alessandra e outros igualmente importantes, pela amizade e ajudas recebidas em vários momentos.

Aos amigos do Laboratório de Toxinologia, em especial Harry, Claudia, Natiela, Rafael, Fagner, Talita e Caroll, pela amizade e colaboração.

Aos meus bons amigos da Colômbia: Camila, Jenny, Ketty, Manuel, Víctor, Oneida, Karina, Diana Karina, Astrid, Adriana, Mario e Ever, pela valiosa amizade e preocupação durante estes dois anos de mestrado.

A todos os outros professores, colegas e amigos que deram seu apoio moral ou material, sempre que foi necessário.

*“É justamente a possibilidade de realizar um
sonho que torna a vida interessante”*

Paulo Coelho (O Alquimista)

*“O sucesso consiste em obter o que se deseja.
A felicidade, em desfrutar o que se obtém.”*

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

No presente trabalho foi caracterizado biológica e estruturalmente um peptídeo análogo da ocelatina-P1 isolado a partir da secreção da pele da rã-pimenta *Leptodactylus labyrinthicus*. A secreção cutânea, obtida por estimulação elétrica, foi fracionada por RP-HPLC em coluna C₈ e as frações obtidas testadas contra cepas referenciais das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Um novo peptídeo antimicrobiano, nomeado G16OCP1, foi purificado por RP-HPLC em coluna C₁₈, analisado por MALDI-TOF MS e submetido à degradação de Edman para determinação de sua estrutura primária. Posteriormente, o peptídeo G16OCP1 foi sintetizado quimicamente (com o emprego da química Fmoc) e analisado por dicroísmo circular para avaliação dos seus componentes de estrutura secundária, bem como empregado em ensaios biológicos para avaliação de suas propriedades citolíticas. A atividade antibacteriana deste peptídeo foi avaliada com a determinação da CIM contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa*). Também foram avaliados seus efeitos citotóxicos sobre eritrócitos, leucócitos e plaquetas humanos. O peptídeo G16OCP1 apresenta uma massa molecular de 2,51 kDa, amidação na porção C-terminal e propensão para formar estruturas em α -hélice em ambientes hidrofóbicos. Tal peptídeo mostrou-se ativo contra os bacilos Gram-negativos *E. coli* e *K. pneumoniae* e contra a bactéria Gram-positiva *S. epidermidis*, não tendo demonstrado toxicidade relevante contra células sanguíneas. Essas características tornam o peptídeo G16OCP1 um bom candidato para o tratamento de doenças causadas por bactérias Gram-negativas.

Palavras chave: *Leptodactylus labyrinthicus*, peptídeo antimicrobiano, ocelatina-P1, RP-HPLC, MALDI-TOF MS, degradação de Edman, amidação C-terminal.

ABSTRACT

This study allowed the biological and structural characterization of a peptide analog of ocellatin-P1 isolated from the skin secretion of the pepper-frog *Leptodactylus labyrinthicus*. The skin secretion, obtained by electrical stimulation, was fractionated by RP-HPLC using a C₈ column and the eluted fractions were tested against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterial strains. One new antimicrobial peptide, named G16OCP1, was purified by RP-HPLC using a C₁₈ column, analyzed by MALDI-TOF MS and sequenced by Edman degradation. Subsequently, the peptide was chemically synthesized (using Fmoc chemistry) and analyzed by circular dichroism for assessment of its secondary structure components, as well as employed in biological assays to evaluate its cytolytic properties. Antibacterial activity of this peptide was assessed by determination of its MICs against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria. Cytotoxic effects on human erythrocytes, leucocytes and platelets were also assessed. The G16OCP1 peptide has a molecular mass of 2.51 kDa, amidated C-terminus and a propensity to form α -helix structures at hydrophobic environments. This peptide was active against Gram-negative bacilli *E. coli* and *K. pneumoniae* and against the Gram-positive bacteria *S. epidermidis*, while not relevant toxicity was found in blood cells. Such features make G16OCP1 a good candidate for treatment of diseases caused by Gram-negative bacteria.

Keywords: *Leptodactylus labyrinthicus*, antimicrobial peptide, ocellatin-P1, RP-HPLC, MALDI-TOF MS, Edman degradation, C-terminal amidation.

RESUMEN

Durante el presente trabajo se caracterizó biológica y estructuralmente un péptido análogo de la ocelatina-P1, aislado de la secreción de la piel de la "rana pimienta" *Leptodactylus labyrinthicus*. La secreción cutánea fue obtenida por estimulación eléctrica y fraccionada por RP-HPLC en una columna C₈; las fracciones obtenidas fueron probadas contra cepas de referencia de las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Un nuevo péptido antimicrobiano, nombrado G16OCP1, fue purificado por RP-HPLC en columna C₁₈, analizado por MALDI-TOF MS y sometido a degradación de Edman para determinación de su estructura primaria. Posteriormente el péptido G16OCP1 fue sintetizado químicamente (usando química Fmoc) y analizado por dicroísmo circular para estimación de sus componentes de estructura secundaria, así como empleado en ensayos biológicos para evaluación de sus propiedades citolíticas. La actividad antibacteriana de este péptido fue evaluada por determinación de la CIM contra bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*) y Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* and *Pseudomonas aeruginosa*). También fueron evaluados sus efectos citotóxicos sobre eritrocitos, leucocitos y plaquetas humanos. El péptido G16OCP1 presenta una masa molecular de 2,51 kDa, amidación en el extremo C-terminal y propensión para formar estructuras α -hélice en ambientes hidrofóbicos. Este péptido se mostró activo contra los bacilos Gram-negativos *E. coli* y *K. pneumoniae*, y contra la bacteria Gram-positiva *S. epidermidis*, sin mostrar toxicidad relevante contra células sanguíneas. Dichas características tornan al péptido G16OCP1 un buen candidato para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias Gram-negativas.

Palabras clave: *Leptodactylus labyrinthicus*, péptido antimicrobiano, ocelatina-P1, RP-HPLC, MALDI-TOF MS, degradación de Edman, amidación C-terminal.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 — Principais classes de peptídeos antimicrobianos de acordo com a extensão da cadeia polipeptídica e as estruturas primária e secundária apresentadas	20
FIGURA 2 — Principais mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos	23
FIGURA 3 — Espécime adulto de <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> (Spix, 1824)	30
FIGURA 4 — Perfil cromatográfico obtido por fracionamento da secreção cutânea bruta de <i>L. labyrinthicus</i> empregando-se coluna C ₈	42
FIGURA 5 — Espectro obtido por MALDI-TOF MS da fração de cromatografia semi-preparativa contendo o peptídeo G16OCP1	42
FIGURA 6 — Purificação do peptídeo G16OCP1 por RP-HPLC utilizando-se coluna C ₁₈	43
FIGURA 7 — Espectro obtido por MALDI-TOF do peptídeo G16OCP1 após purificação	44
FIGURA 8 — Espectro do peptídeo G16OCP1 obtidos por MALDI-TOF MS antes e após a derivatização por esterificação de Fischer	45
FIGURA 9 — Espectro dicróico do peptídeo G16OCP1 em água e TFE	47
FIGURA 10 — Efeitos do peptídeo G16OCP1 25,6 µM sobre hemácias e plaquetas humanas após 30, 90 e 180 minutos de incubação	48
FIGURA 11 — Efeitos do peptídeo G16OCP1 sobre leucócitos humanos após 30, 90 e 180 minutos de incubação	49
FIGURA 12 — Projeção em roda helicoidal do peptídeo G16OCP1	57

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 — Predição da estrutura secundária do peptídeo G16OCP1 pelo método SOPMA	46
QUADRO 2 — Alinhamento múltiplo dos peptídeos da família das ocelatinas	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 — PAMs de anuros presentes na base de dados Uniprot	28
TABELA 2 — Principais peptídeos antimicrobianos de <i>Leptodactylus</i> , segundo a nomenclatura proposta por Conlon (2008).....	29
TABELA 3 — Concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo G16OCP1 em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas	47
TABELA 4 — Comparação das atividades antimicrobiana e hemolítica dos peptídeos ocelatina-P1 e G16OCP1	51
TABELA 5 — Propriedades físico-químicas dos peptídeos ocelatina-P1 e G16OCP1	51
TABELA 6 — Composição de aminoácidos do peptídeo G16OCP1	55

LISTA DE ABREVIATURAS

α -AMP: Peptídeo antimicrobiano formador de α -hélice.

ATCC: *American Type Culture Collection.*

Boc: N-tert-butoxicarbonil.

CIM ou MIC: Concentração inibitória mínima.

FDA: United States Food and Drug Administration.

G16OCP1: [Gly¹⁶]ocelatina-P1.

HC₅₀: Concentração que promove uma resposta hemolítica equivalente ao 50 % da máxima resposta possível.

HCCA: Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

MALDI-TOF MS: *Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-flight Mass spectrometry.*

PAM: Peptídeo antimicrobiano.

Pmc: 2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonil.

Rink-amide-MBHA: 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-(4-metilbenzidrilamina).

RP-HPLC: *Reversed-phase High-performance liquid chromatography*

TFA: Ácido trifluoroacético

TFE: 2,2,2-Trifluoroetanol.

UFCs: Unidades Formadoras de Colônia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.....	17
1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS PAMs.....	19
1.3 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PAMs.....	20
1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS PAMs	25
1.4.1 Mecanismos passivos de resistência.....	25
1.4.2 Mecanismos adaptativos de resistência.....	25
1.5 PAMs DE ANUROS.....	26
1.6 OCELATINAS E OUTROS PAMs de <i>Leptodactylus</i>	28
1.7 <i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	29
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 ETAPAS METODOLÓGICAS PREVISTAS PARA ATINGIR O OBJETIVO	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 REAGENTES E MICRORGANISMOS	34
4.2 COLETA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA SECREÇÃO CUTÂNEA	34
4.3 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA SECREÇÃO BRUTA DE <i>L. labyrinthicus</i>	34
4.4 ENSAIO ANTIMICROBIANO PRELIMINAR	35
4.5 ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	35
4.6 PURIFICAÇÃO DO ANÁLOGO G16OCP1.....	36
4.7 ANÁLISE ESTRUTURAL DO ANÁLOGO G16OCP1	36
4.7.1 Determinação da massa molecular.....	36
4.7.2 Determinação da estrutura primária.....	36
4.7.3 Determinação da presença de amidação C-terminal	37
4.7.4 Análises computacionais.....	37
4.8 SÍNTESE QUÍMICA DO ANÁLOGO G16OCP1	37
4.9 DICROÍSMO CIRCULAR.....	38
4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	39

4.11 TOXICIDADE SOBRE CÉLULAS SANGUÍNEAS.....	39
4.11.1 Efeitos sobre eritrócitos humanos.....	39
4.11.2 Efeitos sobre leucócitos e plaquetas humanas	40
5. RESULTADOS	41
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história, o homem teve oportunidade de aproveitar os diversos benefícios e poderes curativos de plantas e animais. O estudo dessas fontes nos tempos mais modernos tem permitido o desenvolvimento de inúmeros produtos industriais e biotecnológicos, incluindo fármacos com atividades biológicas importantes, muitos dos quais são utilizados hoje no tratamento de doenças relevantes, principalmente de natureza infecciosa, além de permitirem um melhor conhecimento acerca da história natural dos seres vivos que produzem tais compostos (CLARKE, 1997; NEWMAN; CRAGG, 2007).

Peptídeos isolados de anuros e de outras espécies animais tem sido alvo de diversos estudos visando o desenvolvimento de novos produtos industriais, biotecnológicos e farmacêuticos. Grande parte dos trabalhos atuais é dirigida principalmente ao desenvolvimento de antibióticos e antitumorais inéditos, tendo em conta que muitas destas moléculas possuem características excepcionais, como ação imediata e baixa toxicidade em mamíferos (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008). Alguns destes peptídeos possuem também propriedades antivirais e liberadoras de insulina que são de interesse no desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças como herpes (ALBIOL MATANIC; CASTILLA, 2004; BELAID *et al.*, 2002), AIDS (LORIN *et al.*, 2005; VANCOMPERNOLLE *et al.*, 2005) e diabetes (ABDEL-WAHAB *et al.*, 2007; ABDEL-WAHAB *et al.*, 2005; CONLON *et al.*, 2008; CONLON *et al.*, 2009; MARENAH *et al.*, 2004a; MARENAH *et al.*, 2004b; MARENAH *et al.*, 2005; MARENAH *et al.*, 2006).

Finalmente, existe grande interesse no uso dessas moléculas em plantas transgênicas, onde podem auxiliar no desenvolvimento de variedades resistentes a fungos, bactérias e protozoários patogênicos (CARDOSO *et al.*, 2010; CHAKRABARTI *et al.*, 2003; COCA *et al.*, 2006; JIA *et al.*, 2010; XING *et al.*, 2006).

1.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Uma ampla variedade de organismos produz peptídeos antimicrobianos (PAMs) ou *Host Defense Peptides* como parte do seu mecanismo de defesa de primeira linha (DENNISON *et al.*, 2005). Estas moléculas estão presentes em praticamente todos os organismos vivos, desde unicelulares até pluricelulares,

passando por bactérias, anuros e mamíferos, incluindo o homem (WANG; WANG, 2004; ZASLOFF, 2002).

Devido a sua relativa importância e aparente implicação nos sistemas de defesa, os PAMs encontram-se abundantemente nos neutrófilos de mamíferos, incluindo o homem, assim como em superfícies mucosas como traqueia e intestino, onde eles podem ser um componente importante do sistema de defesa (DE LUCCA, 2000).

Várias características são compartilhadas pela maioria dos PAMs: são cadeias relativamente curtas, a maioria com 5 a 40 resíduos de aminoácidos; geralmente são catiônicos, apresentando uma carga líquida de +2 a +9 devido à presença de aminoácidos básicos (lisina e arginina); e, além disso, são anfipáticos. Usualmente adquirem configuração tridimensional, com duas regiões bastante distintas: uma hidrofóbica, que inclui as cadeias laterais de aminoácidos apolares (aproximadamente 30 % ou mais dos resíduos presentes na cadeia polipeptídica) e uma hidrofílica com os resíduos polares carregados positivamente. No entanto, a maioria dos PAMs lineares carece de estrutura definida quando em solução aquosa (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008).

PAMs aniônicos, embora menos comuns, também estão presentes em plantas, invertebrados, anfíbios, roedores, ruminantes, e humanos (HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2009). Vários destes peptídeos foram obtidos em secreções cutâneas ou sequências de cDNA de *Xenopus laevis* (BROGDEN; ACKERMANN; HUTTNER, 1997), *Agalychnis annae* e *Agalychnis dacnicolor* (CHRISTIAN, 1998), *Bombina orientalis* (MIELE *et al.*, 1998), *Bombina maxima* (LAI *et al.*, 2002a) e *Rana japonica* (ISAACSON *et al.*, 2002).

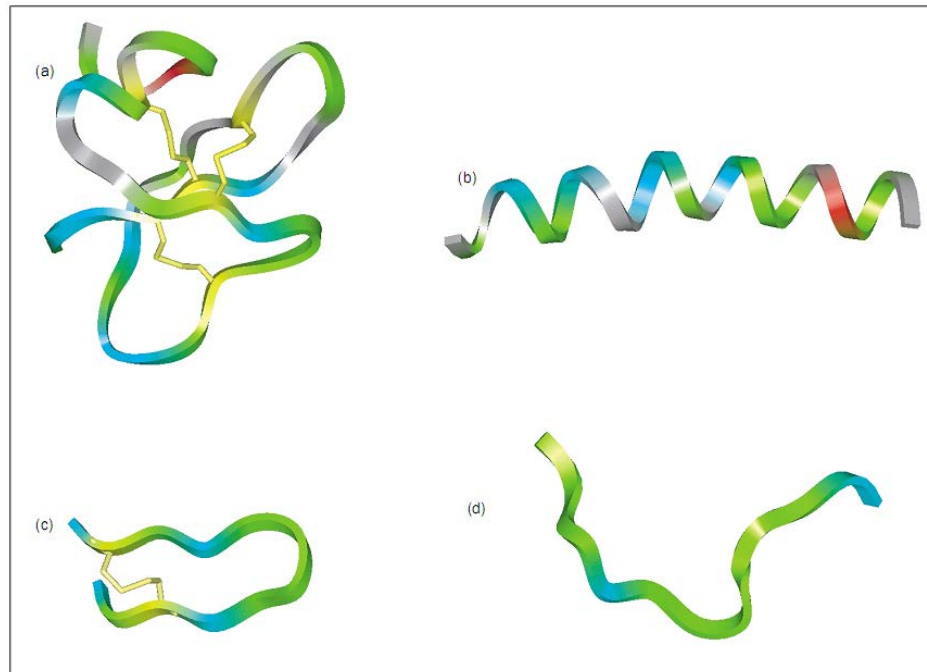
A expressão dos peptídeos antimicrobianos pode ser constitutiva ou induzida por estímulos infecciosos ou inflamatórios, tais como citocinas pró-inflamatórias, bactérias, fungos ou moléculas patogênicas que estimulam a imunidade inata (CUNLIFFE; MAHIDA, 2004; HANCOCK, 2001; LEMAITRE *et al.*, 1996). Em animais multicelulares, eles podem ser expressos sistemicamente (por exemplo, na hemolinfa dos insetos ou células imunes de vertebrados) ou podem ser restritos a um tipo de célula ou tecido específico mais susceptível à infecção como, por exemplo, o epitélio mucoso e a pele (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS PAMs

Várias classificações dos PAMs têm sido propostas de acordo com diferentes critérios. Um primeiro critério, baseado na via de síntese, agrupa os peptídeos antimicrobianos em duas classes: 1) peptídeos não sintetizados por ribossomos, tais como as gramicidinas, polimixinas, bacitracinas e glicopeptídeos, os quais com frequência são drasticamente modificados e produzidos abundantemente por bactérias; e 2) peptídeos sintetizados por ribossomos produzidos por todos os organismos como principais componentes da imunidade inata (HANCOCK; CHAPPLE, 1999).

Apesar da sua similaridade, os peptídeos antimicrobianos variam consideravelmente quanto à extensão da cadeia polipeptídica e quanto às estruturas primária e secundária apresentadas. Levando tais características em consideração, Hancock (HANCOCK, 2001) classificou os PAMs em quatro classes principais: 1) peptídeos que apresentam estruturas em folha β estabilizadas por duas ou três pontes dissulfeto; 2) peptídeos com estrutura em α -hélice; 3) peptídeos com estrutura estendida e 4) peptídeos com estrutura em alça (*loop*) com a presença de apenas uma ponte dissulfeto (Figura 1). Em concordância com esse mesmo critério, Brogden (2005) os agrupou em: 1) peptídeos aniônicos, 2) α -hélices catiônicas lineares, 3) peptídeos catiônicos ricos em aminoácidos específicos, 4) peptídeos aniônicos e catiônicos que contém cisteína e formam pontes dissulfeto e 5) fragmentos de peptídeos aniônicos e catiônicos procedentes de proteínas maiores.

Figura 1 — Principais classes de peptídeos antimicrobianos de acordo com a extensão da cadeia polipeptídica e as estruturas primária e secundária apresentadas.



(a) Peptídeos que apresentam estruturas em folha β estabilizadas por duas ou três pontes dissulfeto; **(b)** peptídeos com estrutura em α -hélices; **(c)** peptídeos com estrutura em alça (loop) com a presença de apenas uma ponte dissulfeto e **(d)** peptídeos com estrutura estendida. Retirado de Hancock (2001).

1.3 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PAMs

Os mecanismos de ação apresentados pelos PAMs são quase totalmente dependentes de sua interação com a membrana celular das bactérias (HANCOCK; ROZEK, 2002).

O acoplamento inicial é produzido pela atração entre o peptídeo e a célula bacteriana, por meio de interações eletrostáticas que podem ocorrer ao nível de fosfolipídios (ligando-se preferencialmente aos mais carregados, por exemplo, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e cardiolipina nas membranas bacterianas) (BIGGIN; SANSOM, 1999; BLONDELLE; LOHNER; AGUILAR, 1999), lipopolisacarídeos (LPS), presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas; ou grupos carboxila de aminoácidos, ácidos teicóicos e ácidos teicurônicos presentes na camada de peptidoglicano de bactérias Gram-positivas (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000). Igualmente se ligam a moléculas de ácido siálico na superfície das hemácias (BLONDELLE; LOHNER; AGUILAR, 1999).

Em qualquer um dos casos, a interação é facilitada por mecanismos que permeabilizam a membrana externa de modo a promover a entrada do peptídeo (autopromoção), podendo ocorrer um dobramento da molécula em estruturas associadas à membrana (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

O mecanismo de autopromoção é mediado pela alta afinidade dos peptídeos catiônicos pelos LPS. Estes substituem os cátions nativos Ca^{+2} e Mg^{+2} , interferindo no funcionamento normal da membrana externa como barreira que então forma fendas transitórias, permitindo assim a passagem de uma grande variedade de moléculas, entre as quais podem estar pequenas proteínas e compostos antimicrobianos, inclusive moléculas do peptídeo antimicrobiano (HANCOCK; CHAPPLE, 1999).

Os eventos que ocorrem logo depois na superfície da membrana são objetivo de consideráveis debates, sendo que vários modelos procuram explicar a ação dos peptídeos formadores de α -hélice, uma vez que os mecanismos utilizados pelos peptídeos com estruturas em folhas β ainda não foram estudados em profundidade.

Um mecanismo conhecido como modelo do “poro toroidal” (*toroidal pore model*) ou de “buraco de verme” (*wormhole model*) sugere que agregados de peptídeos antimicrobianos se inserem perpendicularmente na membrana para formar um poro, sendo que a membrana curva-se em direção ao centro e forma um buraco com as cabeças dos fosfolipídios apontando nessa direção, enquanto o poro é delimitado pelas moléculas do peptídeo (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006) (Figura 2, B).

Um segundo mecanismo, que envolve também a formação de poros, é conhecido como mecanismo de “ripas de barril” (*barrel-stave model*) e consiste na reorientação dos peptídeos para formar um aglomerado em forma de barril, perpendicular ao plano da membrana. As regiões hidrofóbicas de cada peptídeo associam-se com o núcleo lipídico, enquanto as regiões hidrofílicas apontam para o centro do poro, que aumenta seu diâmetro pelo recrutamento de mais monômeros (HANCOCK; CHAPPLE, 1999; JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006) (Figura 2, C).

Em contraste com esses dois mecanismos, o modelo de tapete (*carpet-like model*) (POUNY *et al.*, 1992) propõe que agregados do peptídeo se orientam sobre a membrana plasmática cobrindo sua superfície, organizando-se de forma paralela sobre a mesma e, em seguida, giram redirecionando os resíduos hidrofóbicos em direção às regiões hidrofóbicas da membrana. Isso causaria a desestabilização da

membrana, o que poderia levar à desintegração do empacotamento lipídico (GAZIT *et al.*, 1995). A partir de concentrações elevadas, a disposição dos peptídeos poderia mudar, levando a um efeito detergente, com a micelização de porções da membrana e a possível formação de poros (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006) (Figura 2, D).

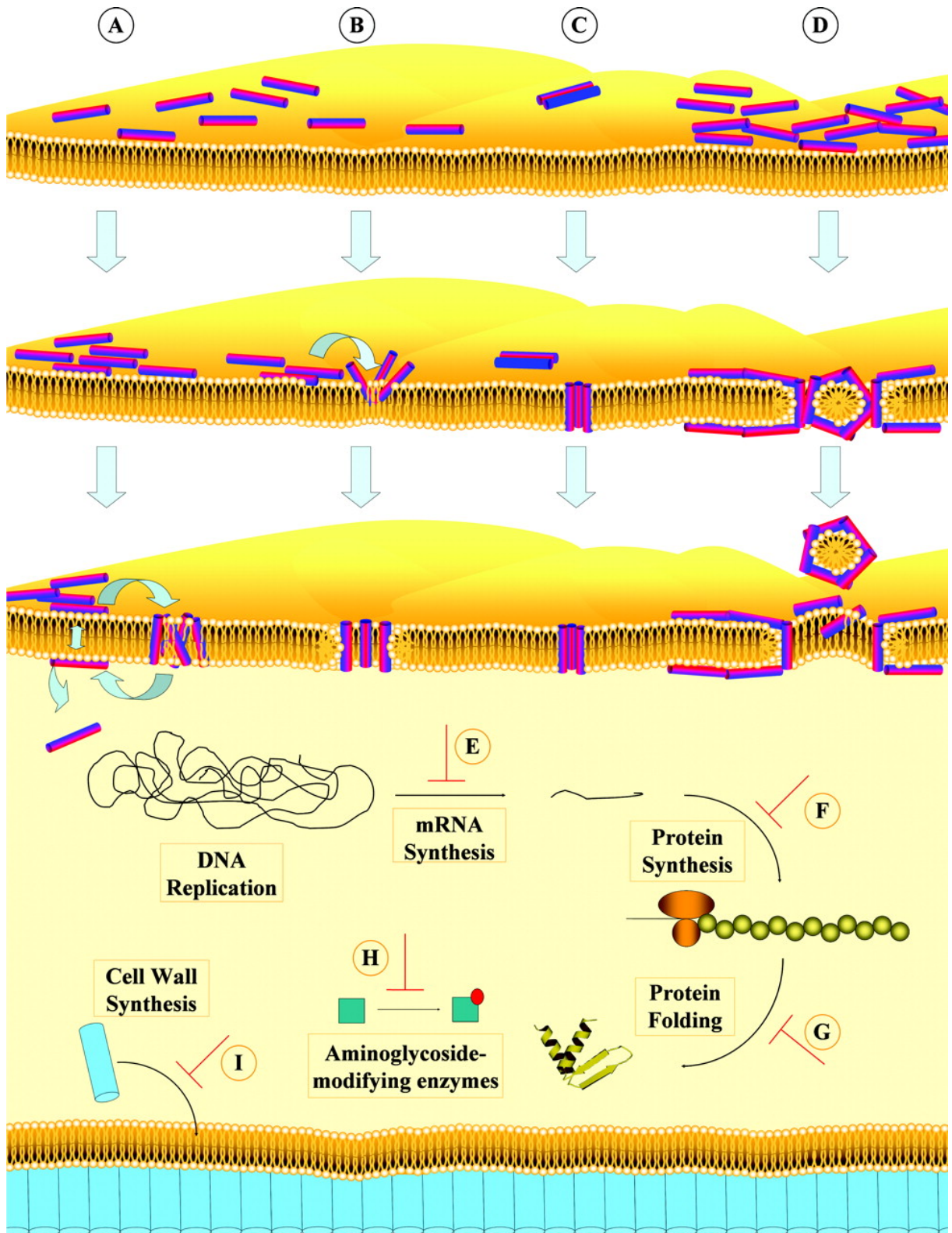
Num modelo adicional, nomeado “modelo de agregado” (*aggregate model*) (WU *et al.*, 1999), os peptídeos se reorientam para atingir a membrana como um agregado com complexos de peptídeos e lipídios similares a micelas, de modo parecido ao modelo de poro toroidal, mas sem que os peptídeos adotem uma orientação particular (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006) (Figura 2, A).

No modelo unificador de Shai-Matsuzaki-Huang, os peptídeos interagem com a superfície da membrana através de interações eletrostáticas, revestindo-a. Em seguida, se incorporam a ela causando seu estreitamento e produzindo tensão por aumento da superfície. Isto leva à formação de poros transitórios, através dos quais polipeptídeos e lipídios podem migrar para o interior da célula e atingir alvos intracelulares. Em função das mudanças na estrutura da bicamada, a membrana colapsa em fragmentos, levando à lise (ZASLOFF, 2002).

No mecanismo tipo detergente proposto por Bechinger e Lohner (2006), os peptídeos revestem a superfície da bicamada lipídica, de jeito similar às etapas iniciais do modelo do poro toroidal. Em seguida, a agregação do peptídeo leva a uma concentração local elevada o suficiente, de modo que a natureza anfipática do peptídeo permita-lhe comportar-se como detergente e quebrar a membrana lipídica em fragmentos pequenos com forma de bicelas ou micelas (BECHINGER; LOHNER, 2006; DÜRR; SUDHEENDRA; RAMAMOORTHY, 2006).

No modelo da “balsa naufragando” (*sinking raft model*), os PAMs agregam-se lado a lado sobre a membrana, produzindo um desequilíbrio de massas ao longo desta, o que leva a sua curvatura; os peptídeos associados afundam gerando poros transitórios, nos quais os resíduos hidrofóbicos permanecem em contato com as cadeias alifáticas dos lipídios, enquanto as porções hidrofílicas delimitam o poro. Quando a translocação do peptídeo é completada, o equilíbrio de massas se restabelece (POKORNY; ALMEIDA, 2004).

Figura 2 — Principais mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos.



A. Modelo de agregado. **B.** Modelo do poro toroidal. **C.** Modelo de ripas de barril. **D.** Modelo de tapete. **E–I.** Ação sobre alvos intracelulares. Retirado de (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

Um modelo interessante e que difere bastante dos já descritos é o modelo de “eletroporação molecular” (MITEVA *et al.*, 1999). Segundo esse modelo, os PAMs têm a capacidade de criar uma diferença no potencial elétrico entre as faces da membrana plasmática, causando a formação de poros (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008). Este processo, que comumente é induzido de forma artificial, é conhecido como eletroporação.

As membranas bacterianas contêm enzimas respiratórias, de modo que o dano causado na membrana poderia levar a alterações na respiração celular, sendo aceitável que a morte não seja causada estritamente pela permeabilização da membrana (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

Um grande número de peptídeos se translocam de um lado ao outro da membrana onde se acumulam intracelularmente interferindo com uma grande variedade de processos biológicos podendo mediar a morte celular (Figura 2, E-I). Tais peptídeos podem agir inibindo a síntese de ácidos nucleicos e proteínas, alterando a atividade enzimática, ou interferindo na formação de componentes estruturais, como a parede celular (BROGDEN, 2005).

A atividade fungicida de muitos peptídeos, isolados majoritariamente de plantas, é também objeto de debates. Os peptídeos antimicóticos variam substancialmente em termos de similaridade estrutural, embora alguns deles tenham tendência a serem ricos em aminoácidos polares e neutros. Sua atividade poderia estar correlacionada com sua habilidade para formar complexos com lipídios (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; LÓPEZ-GARCÍA *et al.*, 2004). Entre os principais mecanismos propostos encontram-se: a quebra da estrutura da membrana celular (JANG *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2003; PARK; LEE; HAHM, 2004), a danificação da parede celular (LEE *et al.*, 2003), a interação com mitocôndrias (KAVANAGH; DOWD, 2004), e a despolarização do citoesqueleto por despolimerização das fibras de actina (KOO *et al.*, 2004).

Embora sejam pouco conhecidos os mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos atuam como antiparasitários, acredita-se que sua atividade inibitória esteja mediada por mecanismos semelhantes aos observados em bactérias e fungos. Contudo, a atividade de um mesmo peptídeo com múltiplos organismos distintos poderia ser decorrente de modos de ação distintos (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006). Os PAMs podem perturbar a membrana celular do parasita por dissipação do seu potencial de membrana, sem provocar a lise da célula hospedeira

(DAGAN *et al.*, 2002; EFRON *et al.*, 2002). Estruturas subcelulares como mitocôndrias e endomembranas também podem ser alvo dos PAMs nesses organismos (MCGWIRE; KULKARNI, 2010).

Finalmente, acredita-se que muitos peptídeos antimicrobianos podem atuar por meio de diversos alvos celulares, seja ao nível da membrana plasmática ou ao nível intracelular (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS PAMs

Microrganismos patogênicos tem desenvolvido coevolutiveamente com os PAMs diversos mecanismos que limitam seus efeitos. Esses mecanismos podem ser de tipo constitutivo (passivo), sendo expressos, tanto na presença, quanto na ausência de estímulo, ou induzível (adaptativo), manifestando-se em resposta à presença do peptídeo ou às reações que ele provoca na célula-alvo (YOUNT; YEAMAN, 2005).

1.4.1 Mecanismos passivos de resistência.

Algumas bactérias possuem modificações no nível de fosfolipídios ou componentes do glicocálix que reduzem a eletronegatividade da membrana, com a consequente perda de afinidade eletrostática (BAYER *et al.*, 2000; GUO *et al.*, 1998; NAHAIE *et al.*, 1984). A resistência do patógeno pode ser decorrente do estado energético deste ou da sua capacidade para se adaptar a um modo energético quiescente (LEHRER; GANZ, 1996; YEAMAN *et al.*, 1998). O glicocálix de algumas bactérias contém complexos aniônicos de carboidratos e fosfatos que protegem a célula bacteriana pela sua capacidade em sequestrar os PAMs antes deles terem acesso à membrana (FRIEDRICH *et al.*, 1999); patógenos presentes nos tecidos mucosos podem também formar biofilmes, mostrando mecanismos de resistência similares (YOUNT; YEAMAN, 2005). A resistência pode, aliás, ser dependente do nicho específico onde ocorre a infecção, tendo em conta que determinadas características do ambiente determinam o sucesso ou fracasso do mecanismo de defesa do hospedeiro (YOUNT; YEAMAN, 2005).

1.4.2 Mecanismos adaptativos de resistência.

Respostas rápidas e coordenadas têm evoluído em microrganismos ante o estresse produzido pelos PAMs. Segundo Yount e Yeaman (YOUNT; YEAMAN, 2005), essas respostas podem incluir um ou vários dos mecanismos a seguir.

A resistência pode ser atingida ao modificar componentes que normalmente seriam alvos extracelulares dos PAMs, como constituintes da parede celular ou da membrana externa (lipídios, polissacarídeos e proteínas induzíveis), de modo a diminuir a carga líquida negativa da superfície, ou reduzir o acesso à membrana citoplasmática (COLLINS *et al.*, 2002; ERNST *et al.*, 1999; ERNST; GUINA; MILLER, 1999; GUO *et al.*, 1998; YOUNT; YEAMAN, 2005; ZHOU *et al.*, 1999). A modificação de fosfolipídios da membrana citoplasmática, assim como da relação aniônicos/catiônicos pode contribuir para a resistência (DORRER; TEUBER, 1977; PESCHEL *et al.*, 2001). Da mesma forma, a modificação de proteínas-alvo intracelulares pode ter um papel importante no mecanismo de resistência do patógeno (DEL CASTILLO; DEL CASTILLO; MORENO, 2001).

As modificações podem ser induzidas através de sistemas do tipo sensor-transdutor que ativam reguladores, ou através da transcrição de genes que codificam proteínas estruturais e enzimas que catalisam esses processos. Alvos estruturais ou funcionais vulneráveis podem não apenas serem modificados, mas também suprimidos (YOUNT; YEAMAN, 2005). Alguns patógenos, aliás, podem afetar os sistemas de defesa induzíveis ao interferirem com cascatas de sinalização indutivas (ISLAM *et al.*, 2001).

Os PAMs podem também ser degradados de maneira induzida mediante a secreção de proteases e expressão de endopeptidases na membrana externa (SCHMIDTCHEN *et al.*, 2002; SUGIMURA; NISHIHARA, 1988; ULVATNE *et al.*, 2002).

Algumas bactérias e fungos teriam a capacidade de expulsar os PAMs do interior celular (de maneira dependente de energia) por meio da indução de genes que codificam proteínas formadoras de canais (BENGOECHEA; SKURNIK, 2000; SHAFER *et al.*, 1998).

Finalmente, moléculas produzidas no hospedeiro podem ainda serem aproveitadas por microrganismos para a geração de produtos proteolíticos que interferem com o funcionamento dos PAMs, por exemplo, mediante o sequestro de moléculas do peptídeo (SCHMIDTCHEN; FRICK; BJORCK, 2001).

1.5 PAMs DE ANUROS

Uma grande quantidade de PAMs pertencentes a diversas famílias já foram isolados a partir de secreções cutâneas de anuros. Esses peptídeos apresentam de

10–48 resíduos de aminoácidos e geralmente adotam estruturas em α -hélice em ambientes similares a membranas biológicas (CONLON *et al.*, 2007).

Uma busca efetivada na base de dados Uniprot (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2012) em 14/03/2012 mostrou um total de 849 peptídeos antimicrobianos isolados da pele de mais de 100 espécies de anuros de 9 famílias (Tabela 1).

A família Ranidae possui o maior número de PAMs reportados, com aproximadamente 45 % das entradas. Nesse táxon já foram descritos quase 400 peptídeos agrupados em várias famílias bem estabelecidas que incluem: brevininas (MORIKAWA; HAGIWARA; NAKAJIMA, 1992), esculentinas (SIMMACO *et al.*, 1993), ranalexinas (CLARK *et al.*, 1994), temporinas (SIMMACO *et al.*, 1996), ranatuerinas (GORAYA; KNOOP; CONLON, 1998), palustrinas (BASIR *et al.*, 2000), nigrocinas (PARK *et al.*, 2001), japonicinas (ISAACSON *et al.*, 2002) e ranaciclinas (MANGONI *et al.*, 2003).

A família Bombinatoridae possui aproximadamente 27 % das entradas, incluindo as bombininas (CSORDÁS; MICHL, 1970) e as maximinas (LAI *et al.*, 2002b).

Hylidae é a terceira família com mais peptídeos reportados (aproximadamente 23 % do total). Nessa família já foram isoladas dermaseptinas (MOR *et al.*, 1991), dermatoxinas (AMICHE *et al.*, 2000), filoxinas (PIERRE *et al.*, 2000), filoseptinas (LEITE *et al.*, 2005), hiposinas (THOMPSON *et al.*, 2007), plasticinas (AMICHE; LADRAM; NICOLAS, 2008), pseudinas (OLSON *et al.*, 2001), aureinas (ROZEK *et al.*, 2000), hilinas (CASTRO *et al.*, 2005) e raniseptinas (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

As outras seis famílias compreendem o 5 % restante, contendo as uperinas, riparinas, signiferinas y deserticolinas de Myobatrachidae (BRADFORD *et al.*, 1996; JACKWAY *et al.*, 2008), as magaininas e peptídeos XT de Pipidae (ALI *et al.*, 2001; ZASLOFF, 1987), as ascafinas de Leiopelmatidae, as ocelatinas de Leptodactylidae (NASCIMENTO *et al.*, 2004), as tigerininas de Dicroglossidae (SAI *et al.*, 2001) a galensina de *Kassina senegalensis* (Hyperoliidae) e a proteína histona H2B isolada da pele de *Rhacophorus schlegelii* (Rhacophoridae).

É importante ressaltar que, embora seja grande o número de registros encontrados para anuros, uma boa parte dos peptídeos descobertos ainda não foi relatada nos bancos de dados, ou não se encontra ainda disponível.

Tabela 1 — PAMs de anuros presentes na base de dados Uniprot.

FAMÍLIA	Nº DE ENTRADAS	% DO TOTAL
Ranidae	379	44,64
Bombinatoridae	228	26,86
Hylidae	196	23,09
Myobatrachidae	13	1,53
Pipidae	11	1,30
Leiopelmatidae	8	0,94
Leptodactylidae	8	0,94
Dicroglossidae	4	0,47
Hyperoliidae	1	0,12
Racophoridae	1	0,12
TOTAL	849	100

Mostram-se as contribuições absolutas e relativas por famílias, tendo em conta o número de registros (entradas).

1.6 OCELATINAS E OUTROS PAMs de *Leptodactylus*

As ocelatinas constituem a família de PAMs melhor conhecida do gênero *Leptodactylus*. Mais de uma dúzia destes peptídeos e seus fragmentos já foram identificados em várias espécies do gênero (Tabela 2). As ocelatinas apresentam, em geral, atividade antimicrobiana. Contudo, algumas delas, como as ocelatinas 1–5 são também hemolíticas (NASCIMENTO *et al.*, 2004; NASCIMENTO, 2007) e outras como a ocelatina-L2 carecem de atividade antibacteriana mas apresentam atividade liberadora de insulina (CONLON *et al.*, 2009).

Outros peptídeos não pertencentes a esta família também foram isolados de *Leptodactylus*, porém em menor número. Estes peptídeos incluem: a plasticina-L1, estruturalmente similar às plasticinas de Phyllomedusinae, que apresenta atividade como indutor da liberação de insulina (CONLON *et al.*, 2009); e o peptídeo denominado LASP (*Leptodactylus aggression-stimulating peptide*) que age como feromônio estimulando comportamentos agressivos em machos de *L. fallax* (KING *et al.*, 2005b).

Tabela 2 — Principais peptídeos antimicrobianos de *Leptodactylus*, segundo a nomenclatura proposta por Conlon (2008).

Organismo*	Nome do Peptídeo [†]	Referência	Número de Acesso Uniprot
<i>L. fallax</i>	Ocellatin-F1 (fallaxin)	Rollins-Smith <i>et al.</i> (2005)	n.r.
<i>L. knudseni</i>	Ocellatin-K1	The Uniprot Consortium (2012)	P86711
<i>L. laticeps</i>	Ocellatin-L1 (laticeptin)	Conlon <i>et al.</i> (2006)	n.r.
	Ocellatin-L2	Conlon <i>et al.</i> (2009)	n.r.
<i>L. latrans</i> (<i>L. ocellatus</i>)	Ocellatin-1	Nascimento <i>et al.</i> (2004)	P83951
	Ocellatin-2	Nascimento <i>et al.</i> (2004)	P83866
	Ocellatin-3	Nascimento <i>et al.</i> (2004)	P83867
	Ocellatin-4	Nascimento <i>et al.</i> (2007)	P85090
	Ocellatin-5	Nascimento (2007)	P85443
	Ocellatin-5	Leite <i>et al.</i> (2010)	n.r.
	Ocellatin-6	Leite <i>et al.</i> (2010)	n.r.
<i>L. pentadactylus</i>	Ocellatin-P1 (pentadactylin)	King <i>et al.</i> (2005a)	n.r.
<i>L. syphax</i>	Ocellatin-S1 (syphaxin)	Dourado <i>et al.</i> (2007)	P85279
<i>L. validus</i>	Ocellatin-V1	King <i>et al.</i> (2008)	n.r.
	Ocellatin-V2	King <i>et al.</i> (2008)	n.r.
	Ocellatin-V3	King <i>et al.</i> (2008)	n.r.

*Entre parênteses tem-se o nome do organismo como consta na publicação original.

[†]Também encontra-se entre parênteses o nome do peptídeo como descrito no momento da publicação. n.r. = não reportado na base de dados Uniprot.

1.7 *Leptodactylus labyrinthicus*

Leptodactylus labyrinthicus (Spix, 1824) (Figura 3), conhecida como rã-pimenta, é uma espécie de grande porte pertencente à família Leptodactylidae e incluída dentro do grupo *pentadactylus* (HEYER, 1979).

Esta espécie ocorre no norte da Venezuela, nos cerrados e caatingas do Brasil, ao leste do Paraguai, Bolívia, norte da Argentina e sul do Brasil; em elevações de até 1.000 metros. Habita áreas abertas e bosques tropicais secos e úmidos, sendo uma espécie plástica que coloniza com facilidade zonas de assentamentos humanos e poças temporárias (HEYER; MIJARES; BALDO, 2004; HEYER, 2005).

Seu estado de conservação, de acordo com a IUCN, é de Preocupação Menor (LC), apesar de ser caçada para consumo humano (HEYER; MIJARES; BALDO, 2004).

Figura 3 — Espécime adulto de *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824).



Foto: Antonio Sebben.

2. JUSTIFICATIVA

Estima-se que, em média, a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos anti-infecciosos leva em torno de 10 a 20 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000). Nas últimas décadas o progresso nessa área tem sido pequeno, sendo que entre 1983 e 2003 emergiram apenas duas classes novas de antibióticos e apenas 9 agentes antibacterianos foram aprovados pela FDA (SPELLBERG *et al.*, 2004). É por isso que a busca de novos medicamentos é uma das ações prioritárias de modo a permitir o controle da resistência a doenças infecciosas.

As pesquisas desenvolvidas até hoje permitiram identificar os anuros (sapos, rãs e pererecas) como uma fonte riquíssima de peptídeos antimicrobianos, tendo sido descritos até mais de uma centena de peptídeos com propriedades antimicrobianas em uma única espécie (LI *et al.*, 2007). Aliás, muitos estudos relacionados com o isolamento e a caracterização destes peptídeos demonstraram a possibilidade de desenvolver drogas sintéticas com propriedades melhoradas a partir das estruturas originais identificadas em tais animais (CASTRO; CILLI; FONTES, 2006; COOTE *et al.*, 1998; PORAT *et al.*, 2006; SHALEV *et al.*, 2006).

Os resultados das diversas pesquisas já realizadas demonstram que os PAMs ou *host defense peptides*, e seus derivados sintéticos, são ativos contra uma grande variedade de microrganismos, sendo efetivos não apenas contra bactérias, mas também contra vírus, como o HIV (LORIN *et al.*, 2005; VANCOMPERNOLLE *et al.*, 2005) e herpes simplex (ALBIOL MATANIC; CASTILLA, 2004; BELAID *et al.*, 2002); protozoários, como os agentes causadores da malária (DAGAN *et al.*, 2002; EFRON *et al.*, 2002; KÜCKELHAUS *et al.*, 2009), da leishmaniose (KÜCKELHAUS *et al.*, 2009; MCGWIRE; KULKARNI, 2010), da doença de Chagas (HUANG; CHEN; ZIERDT, 1990; MCGWIRE; KULKARNI, 2010) e da criptosporidíase (GIACOMETTI *et al.*, 2001); e fungos como *Saccharomyces cerevisiae* (SIMMACO *et al.*, 1994), *Candida albicans* (SIMMACO *et al.*, 1994) e *Batrachochytrium dendrobatidis* (ROLLINS-SMITH; CONLON, 2005; WOODHAMS *et al.*, 2006a; WOODHAMS *et al.*, 2006b). De outra parte, vários peptídeos isolados de secreções de anuros promovem a liberação de insulina, sendo de interesse para o tratamento da diabetes (ABDEL-WAHAB *et al.*, 2007; ABDEL-WAHAB *et al.*, 2005; CONLON *et al.*, 2008; CONLON *et al.*, 2009; MARENAH *et al.*, 2004a; MARENAH *et al.*, 2004b; MARENAH *et al.*, 2005; MARENAH *et al.*, 2006).

Além disso, os PAMs têm despertado grande interesse nos últimos anos visando a produção de plantas transgênicas de interesse comercial com resistência melhorada a patógenos (CARDOSO *et al.*, 2010; CHAKRABARTI *et al.*, 2003; COCA *et al.*, 2006; JIA *et al.*, 2010; XING *et al.*, 2006).

Um número relativamente pequeno de peptídeos tem sido identificado em secreções de rãs do gênero *Leptodactylus* (como foi mostrado na seção anterior). Apesar da maioria desses peptídeos ter sido pouco estudada quanto à sua atividade biológica, as características estruturais desses peptídeos estão em boa concordância com as da maioria dos PAMs conhecidos e são interessantes para o desenvolvimento de fármacos a partir do aprimoramento da sua estrutura.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Isolamento e caracterização estrutural e biológica de um análogo da ocelatina-P1 (pentadactilina) presente na secreção cutânea da rã *Leptodactylus labyrinthicus*.

3.2 ETAPAS METODOLÓGICAS PREVISTAS PARA ATINGIR O OBJETIVO

- Fracionamento por RP-HPLC da secreção cutânea de *L. labyrinthicus*;
- Avaliação biológica (atividade antibacteriana) das frações cromatográficas obtidas;
- Análise por espectrometria de massas das frações cromatográficas com atividade antimicrobiana;
- Purificação por RP-HPLC do análogo G16OCP1;
- Determinação da estrutura primária do análogo G16OCP1 por sequenciamento químico (degradação de Edman);
- Síntese química do análogo G16OCP1;
- Avaliação dos componentes de estrutura secundária presentes no análogo G16OCP1 por dicroísmo circular;
- Avaliação dos efeitos antiproliferativos do peptídeo sintético G16OCP1 sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
- Avaliação dos efeitos citolíticos do peptídeo sintético G16OCP1 sobre eritrócitos, leucócitos e plaquetas humanas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E MICRORGANISMOS

Todos os experimentos foram realizados com reagentes comerciais de grau analítico, utilizando apenas água Milli-Q[®] (Millipore Reagent Water System, EMD Millipore, USA) para o preparo das soluções. Os solventes empregados nas etapas cromatográficas foram todos grau HPLC, de diversos fornecedores.

As cepas bacterianas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram adquiridas no Banco de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas/SP).

4.2 COLETA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA SECREÇÃO CUTÂNEA

Machos adultos de *Leptodactylus labyrinthicus* foram capturados por reconhecimento visual e acústico no município de Luziânia/GO; em seguida, foram transportados em caixas úmidas e mantidos em cativeiro no Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília, de acordo com autorização ambiental Nº 17682-1 (SISBio/ICMBio/MMA). A secreção cutânea foi obtida por estimulação da pele com uma fonte elétrica de corrente alternada de aproximadamente 110 V e 60 Hz, lavando em seguida com água Milli-Q em abundância. Após a coleta, as amostras foram congeladas em tubos Falcon, liofilizadas e armazenadas a -20 °C para posterior uso.

4.3 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA SECREÇÃO BRUTA DE *L. labyrinthicus*

Alíquotas de 5,0 mg de secreção bruta de *L. labyrinthicus* foram dissolvidas em 220 µL de TFA 0,1 % (v/v) em água Milli-Q, centrifugadas por 5 min a 14.000 rpm e o sobrenadante submetido a RP-HPLC em uma coluna C₈ (Shim-pack[®] CLC-C8(M) 150 x 4.6 mm, Shimadzu Corporation, Japão) previamente equilibrada com TFA 0,1 % (v/v) em água Milli-Q (solvente A). Após uma lavagem de 5 min com solvente A, a eluição foi realizada com fluxo de 1,0 mL/min utilizando-se gradiente linear de TFA 0,1 % (v/v) em acetonitrila (solvente B): 0–55 % de solvente B em 55 min, 55–100 % de solvente B em 5 min, e 5 min de lavagem com 100 % de

solvente B. As frações foram coletadas manualmente, como absorbância monitorada a 216 nm e, em seguida, secadas a vácuo e armazenadas a -20 °C para análises posteriores.

4.4 ENSAIO ANTIMICROBIANO PRELIMINAR

O ensaio antimicrobiano foi baseado no protocolo de Castro e colaboradores (2009). Linhagens referenciais de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), obtidas do Banco de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP), foram utilizadas em ensaios antimicrobianos, a fim de se avaliar a atividade inibitória das diferentes frações cromatográficas eluídas a partir da secreção de *L. labyrinthicus*. As duas linhagens bacterianas foram cultivadas em meio Mueller-Hilton a 37 °C sob agitação, por aproximadamente 18 horas, até a obtenção de uma cultura com densidade óptica igual a 1,0 em 590 nm. As bactérias em fase logarítmica foram diluídas no mesmo meio de cultura nas proporções de 1:50 para *E. coli* e 1:100 para *S. aureus*.

As frações eluídas obtidas com a realização de seis corridas cromatográficas foram reunidas, secadas em SpeedVac e, em seguida, resuspendidas em 200 µL de água Milli-Q. Alíquotas de 50 µL de cada fração foram transferidas para os poços de uma microplaca estéril e incubadas por 22 h a 37°C com 50 µL (contendo de 2 a 7×10^5 UFCs) de cada uma das culturas bacterianas.

A taxa de inibição do crescimento bacteriano foi determinada pela leitura da densidade óptica a 595 nm empregando-se uma leitora de placas Multiskan[®] FC (Thermo Scientific, USA). Como controle da ausência de crescimento foi empregado formaldeído 0,4% (v/v) e como controle de crescimento pleno foi utilizada água Milli-Q estéril.

4.5 ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As frações cromatográficas capazes de inibir o crescimento bacteriano foram analisadas em um espectrômetro de massas Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Alemanha). Cada fração cromatográfica foi resuspendida em TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q e aplicadas em uma placa de aço inoxidável junto com matriz reconstituída de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) na proporção 1:1. O equipamento foi previamente calibrado utilizando-se uma mistura de angiotensina II (Mr = 1047,19), angiotensina I (Mr = 1297,49), substância P (Mr = 1348,64),

bombesina ($M_r = 1620,86$) e fragmento 18–39 de hormônio adrenocorticotrópico ($M_r = 2466,68$). As amostras foram analisadas na faixa de 700–4000 Da no modo refletor de íons positivos.

4.6 PURIFICAÇÃO DO ANÁLOGO G16OCP1

O peptídeo bioativo, aqui denominado G16OCP1, foi acumulado a partir de várias corridas cromatográficas e posteriormente resuspenso em TFA 0,1 % (v/v) em água Milli-Q, centrifugado por 5 min a 14.000 rpm e o sobrenadante submetido a RP-HPLC em uma coluna C_{18} (Shim-pack VP-ODS 150 x 4.6 mm, Shimadzu Corporation, Japão). Após 5 min de lavagem com solvente A, a eluição foi realizada empregando-se solvente B nas seguintes condições: 0–30 % de solvente B em 10 min, 30–50 % de solvente B em 20 min, 50–100 % de solvente B em 5 min e 5 min de lavagem com 100 % de solvente B. As frações cromatográficas eluídas foram coletadas manualmente, com fluxo de 1,0 mL/min, detecção em 216 nm, secadas a vácuo e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.7 ANÁLISE ESTRUTURAL DO ANÁLOGO G16OCP1

4.7.1 Determinação da massa molecular

A fim de se determinar o grau de pureza e a massa molecular do peptídeo obtido após a etapa de recromatografia em coluna C_{18} , o peptídeo de interesse foi novamente analisado por espectrometria de massas em espectrômetro de massas Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Alemanha) de acordo com o protocolo descrito na seção 4.5.

4.7.2 Determinação da estrutura primária

A estrutura primária do análogo G16OCP1 foi determinada por degradação de Edman. O material purificado a partir de seis cromatografias semipreparativas foi dissolvido em 60 μL de TFA 20 % (v/v) em acetonitrila e injetados na câmara de reação de um sequenciador automático 477A (Applied Biosystems, USA) modificado como descrito por Fontes e colaboradores (1998). Os PTH-aminoácidos foram identificados em 269 nm após separação numa coluna de fase reversa PTH- C_{18} acoplada a um equipamento de HPLC 120A (Applied Biosystems, USA). Antes da análise, o sistema cromatográfico foi calibrado com os respectivos padrões de PTH-aminoácidos.

4.7.3 Determinação da presença de amidação C-terminal

A presença de amidação C-terminal foi avaliada por análise em espectrômetro de massas do peptídeo G16OCP1, nativo e após metilação por esterificação de Fischer, com base no método descrito por Powell e colaboradores (1995). O peptídeo purificado foi dissolvido em HCl metanólico (10 μ L de cloreto de acetila em 250 μ L de metanol anidro) e incubado por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, o solvente foi removido por evaporação em um concentrador tipo SpeedVac e a amostra foi então ressuspensa em TFA 0,1 % (v/v) em água Milli-Q para ser analisada por MALDI-TOF como descrito anteriormente.

4.7.4 Análises computacionais

Foi utilizado o algoritmo PSI-Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1997) para realizar uma busca usando a base de dados de sequências proteicas não-redundantes do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). O Clustal W2 (LARKIN *et al.*, 2007) foi usado para o alinhamento múltiplo de sequências (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). A massa monoisotópica teórica foi calculada a partir da sequência com a ferramenta Compute pI/Mw (GASTEIGER *et al.*, 2005) disponível em http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html. A ferramenta HydroMCalc (<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html#Hiscale>) foi empregada para calcular a hidrofobicidade média e o momento hidrofóbico médio dos peptídeos analisados, com base na escala de Eisenberg (EISENBERG; WEISS; TERWILLIGER, 1982). A predição de estrutura secundária foi feita pelo método SOPMA (GEOURJON; DELEAGE, 1995) disponível em http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html. Finalmente, foi utilizado um aplicativo JAVA disponível em <http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.htm>, para simular conformação em α -hélice, de acordo com o método de Schiffer e Edmundson (1967).

4.8 SÍNTESE QUÍMICA DO ANÁLOGO G16OCP1

O peptídeo com amidação C-terminal G16OCP1 foi sintetizado manualmente de acordo com o método padrão do grupo protetor Na-Fmoc (CASALLANOVO *et al.*, 2006). Foram utilizados os grupos protetores Boc (N-tert-butoxicarbonil) para proteger as cadeias laterais de K, tBut (t-butil) para D, T e E, e Pmc (2,2,5,7,8-pentametilchromane-6-sulfonil) para N. Após o acoplamento do C-terminal à resina

(Rink-amide-MBHA) foram efetivados sucessivamente vários ciclos de síntese, consistindo na desproteção de Na-Fmoc com piperidina/dimetilformamida 20 % (V/V) durante 20 min, seguido por lavagem com diclorometano/dimetilformamida e acoplamento ao próximo resíduo. Ao final da síntese, a clivagem do peptídeo e remoção do grupo protetor de cadeia lateral foi realizada simultaneamente com TFA 90 %, p-cresol 5 % e água Milli-Q durante 2 h. O peptídeo foi então precipitado com etoxietano anidro e separado do material não-peptídico por centrifugação. Depois foi extraído em TFA 0,045 % (v/v) e purificado por RP-HPLC numa coluna semi-preparativa (C₁₈ 250 x 10 mm, Beckman Coulter, USA) com gradiente linear de 10–40 % de TFA/acetonitrila 0,036 % (v/v) (solvente B) durante 90 min, com fluxo de 5 mL/min, detecção em 220 nm e liofilização ao final do processo. Após a purificação, a identidade do peptídeo sintético foi confirmada por espectrometria de massa seguindo o método descrito anteriormente.

4.9 DICROÍSMO CIRCULAR

Foram obtidos espectros dicróicos do peptídeo G16OCP1 utilizando um espectropolarímetro J-815 (Jasco, Japão) equipado com um suporte térmico de cuvetas tipo Peltier. Foram registrados os espectros no UV-distante do peptídeo em água Milli-Q, em TFE 20 % (v/v) e em TFE 50 % (v/v), na faixa de 190–250 nm a 25 °C usando cuvetas de quartzo de 0,1 cm. Os espectros foram coletados como a média de 3 leituras obtidas em *millidegree* (1/1000°) e convertidas a elipticidade molar $[\theta]$ (° cm² dmol⁻¹) considerando uma massa molecular por resíduo de 100,5 Da, com base na fórmula (CORRÊA; RAMOS, 2009):

$$[\theta] = \frac{\theta * 100 * M}{C * l * n}$$

Onde θ é a elipticidade em *millidegrees*, l é o caminho óptico em cm, C é a concentração em mg/mL, M é a massa molecular e n o número de resíduos.

O conteúdo de estrutura α -hélice secundária foi estimado por meio da seguinte equação (CAMARGOS *et al.*, 2011):

$$f_H = \frac{[\theta]_{208} - 4000}{33\,000 - 4000}$$

4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Cepas das bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*) foram descongeladas do estoque e incubadas em Meio Mueller–Hilton estéril a temperatura ambiente durante aproximadamente 18 h até a obtenção de culturas com densidade óptica igual a 1,0 em 590 nm. As bactérias em fase logarítmica foram diluídas no mesmo meio de cultura nas proporções de 1:50 para as bactérias Gram-negativas e 1:100 para as bactérias Gram-positivas.

Foram preparadas diluições seriadas em triplicata do peptídeo sintético G16OCP1, a partir de uma solução estoque de 256 μM esterilizada por filtração em filtro Millex GV 0,22 μm . Alíquotas de 50 μL de cada diluição foram incubadas em microplacas de 96 poços de fundo chato com 50 μL de suspensão bacteriana (contendo de 2 a 7×10^5 UFCs) durante 20–24 h a 37 °C. Após esse período, as placas foram analisadas a 595 nm numa leitora de placas Multiskan[®] FC (Thermo Scientific, USA) utilizando formaldeído 0,4 % (v/v) como controle da ausência de crescimento e água Milli-Q estéril como referência de 100 % de crescimento.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do peptídeo na qual não se observa crescimento detectável pela leitura espectrofotométrica.

4.11 TOXICIDADE SOBRE CÉLULAS SANGUÍNEAS

4.11.1 Efeitos sobre eritrócitos humanos

Hemácias humanas de doador saudável O⁺ foram separadas do plasma por sedimentação e lavadas três vezes com tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M e CaCl₂ 0,01 M. Esse mesmo tampão foi empregado para preparar uma suspensão 1% (v/v) de hemácias e na solubilização do peptídeo. Em microtubos de 1,5 mL, 100 μL da suspensão de hemácias foram incubados com 100 μL do peptídeo G16OCP1 (diluído serialmente a partir de uma solução estoque de 256 μM) por 60 min, a temperatura ambiente. Como controles foram empregados 100 μL da suspensão de hemácias na presença de 100 μL de Triton X-100 1% (v/v), como referência para 100% de hemólise e 100 μL da suspensão de hemácias na presença de 100 μL de tampão-salino como referência para 0%. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 2 min e alíquotas de 100 μL dos sobrenadantes

foram transferidas para placas de microtitulação de 96 poços e analisadas em 405 nm, em leitora Multiskan® FC (Thermo Scientific, USA). A quantidade de hemólise foi avaliada utilizando-se a seguinte fórmula (OGUIURA *et al.*, 2011):

$$\frac{A_{405 \text{ peptídeo}} - A_{405 \text{ tampão}}}{A_{405 \text{ Tritón}} - A_{405 \text{ tampão}}} * 100$$

4.11.2 Efeitos sobre leucócitos e plaquetas humanas

Para a determinação de efeitos citotóxicos sobre as diferentes células sanguíneas, foram realizadas contagens de células utilizando um hemocítômetro Cell-Dyn 3700SL (Abbott Laboratories, USA).

O peptídeo G16OCP1 foi diluído em sangue fresco de doador saudável O⁺ na concentração final de 25,6 µM e incubado durante 3 horas. Paralelamente foram incubados: sangue total com adição de Triton X-100 a uma concentração final de 1 % (v/v), como controle de lise completa e sangue total com adição de solução salina, como controle negativo (ausência de citólise).

As contagens de células foram realizadas em triplicata após 30, 90 e 180 min, utilizando-se 220 µL da suspensão de células em cada leitura. Os efeitos citotóxicos foram avaliados por comparação entre o controle negativo e o tratamento com o peptídeo G16OCP1, nos diferentes períodos de tempo empregados. A avaliação estatística foi feita através de testes *t* para grupos independentes, utilizando-se o software Prism 5.03 (Graphpad Software, USA) e considerando um nível de significância de 0,05.

5. RESULTADOS

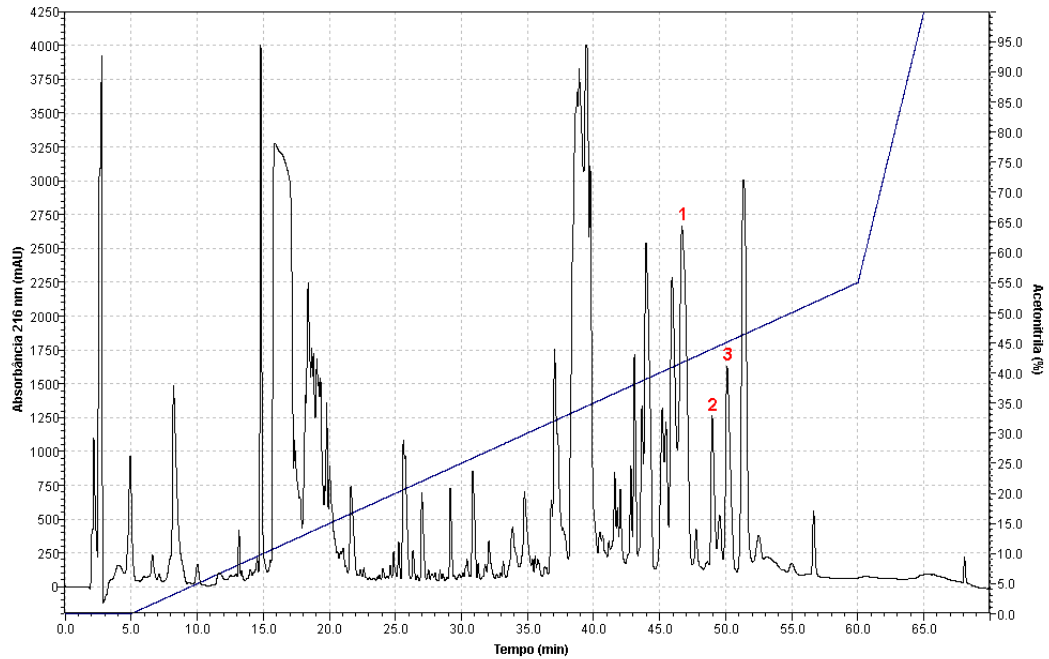
A secreção cutânea de *Leptodactylus labyrinthicus* mostrou-se, em geral, uma secreção rica e complexa, resultando na eluição de aproximadamente 47 frações durante o fracionamento cromatográfico realizado em coluna de fase reversa C₈, como pode ser comprovado pela análise da Figura 4. As frações cromatográficas eluídas foram manualmente coletadas e avaliadas quanto à sua capacidade em inibir o crescimento das bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Algumas frações apresentaram significativa atividade inibitória sobre o crescimento das bactérias testadas. Tais frações bioativas foram analisadas por MALDI-TOF MS, determinando-se as massas moleculares dos componentes presentes nas frações ativas biologicamente. Dois peptídeos, com massas moleculares monoisotópicas de 2.540,9 e 2.546,6 Da foram detectados nessa secreção e identificados como os peptídeos ocelatina-P1 (pentadactilina) e ocelatina-F1 (falaxina), respectivamente. Tais peptídeos já haviam sido isolados e caracterizados previamente nas secreções de *L. pentadactylus*, *L. fallax* e *L. labyrinthicus* (KING *et al.*, 2005a; LIBÉRIO, 2008; LIBÉRIO *et al.*, 2011; ROLLINS-SMITH *et al.*, 2005).

Um terceiro peptídeo com atividade antibacteriana foi encontrado na fração que eluiu em aproximadamente 49 min de corrida (45 % de solvente B, Figura 4). Tal peptídeo apresentou massa molecular monoisotópica de 2510,5 Da (Figura 5) por análise em espectrômetro de massas tipo MALDI-TOF.

Uma vez que se tratava de um peptídeo antimicrobiano inédito identificado em tal secreção, esse peptídeo foi então acumulado por fracionamento de 30 mg da secreção bruta de *L. labyrinthicus* em coluna de fase reversa C₈. Posteriormente foi submetido a várias cromatografias e purificado em coluna C₁₈ a fim de se obtê-lo em alto grau de pureza para fins de caracterização por degradação de Edman (Figura 6).

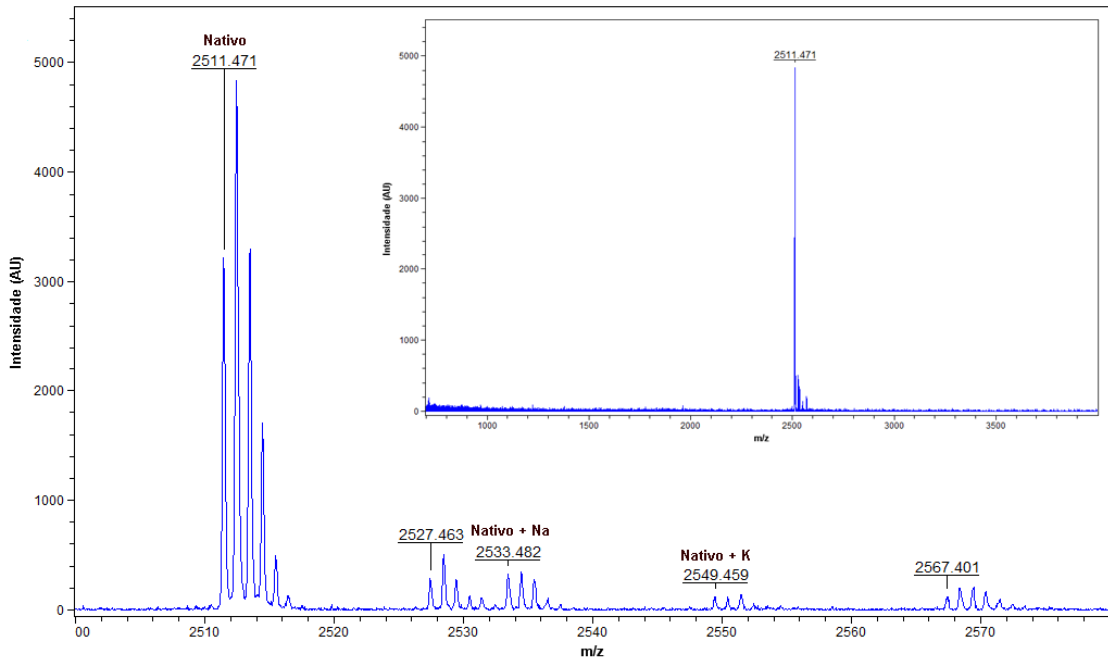
O sequenciamento N-terminal do peptídeo nativo permitiu a determinação inequívoca de sua estrutura primária, como sendo: ¹GLLDTLKGAAKNVVGLASKVMEKL²⁵, a qual resultou ser acentuadamente similar àquela determinada para a ocelatina-P1 (pentadactilina), também presente nessa secreção, ao conter apenas uma substituição, conservada, de serina por glicina na posição 16. Como se tratava de um novo análogo da ocelatina-P1, tal peptídeo foi denominado G16OCP1.

Figura 4 — Perfil cromatográfico obtido por fracionamento da secreção cutânea bruta de *L. labyrinthicus* empregando-se coluna C₈.



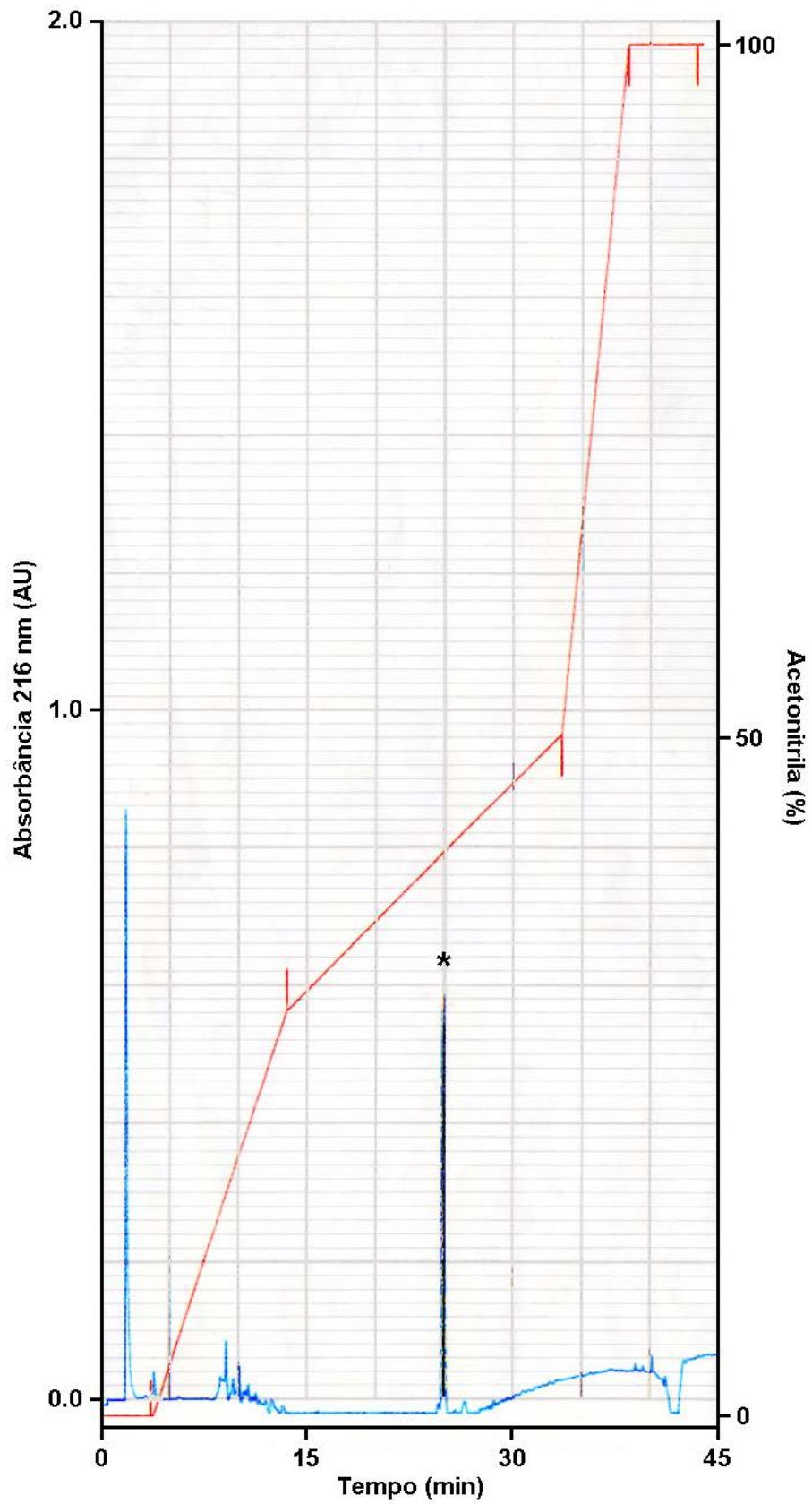
Em destaque, as frações cromatográficas com atividade antibacteriana identificadas no presente estudo: **1** = Ocelatina-F1, **2** = G16OCP1, **3** = Ocelatina-P1. Fluxo: 1 mL/min.

Figura 5 — Espectro obtido por MALDI-TOF MS da fração de cromatografia semi-preparativa contendo o peptídeo G16OCP1.



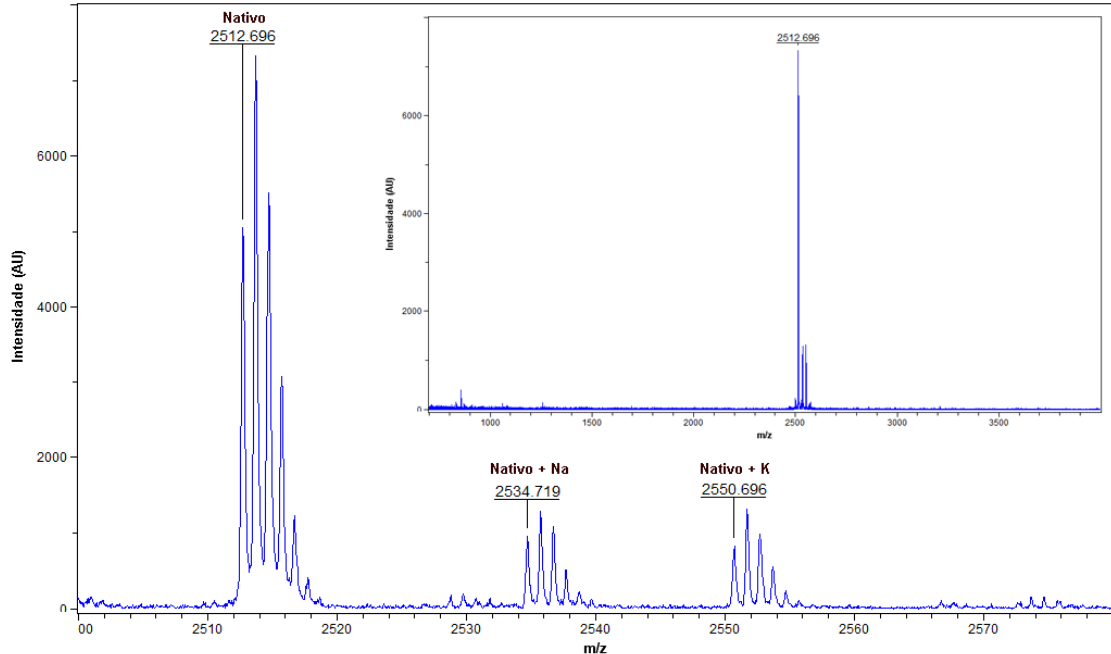
Pode-se observar o peptídeo G16OCP1 nativo (2511,5 Da, $[M+H]^+$) na companhia de adutos formados com os íons sódio (2533,5) e potássio (2549,5), além de outros componentes peptídicos presentes na amostra. O inserto na figura mostra a faixa de 700–4000 Da (m/z).

Figura 6 — Purificação do peptídeo G16OCP1 por RP-HPLC utilizando-se coluna C₁₈.



Denota-se com (*) a fração que contém o peptídeo G16OCP1. Fluxo: 1 mL/min.

Figura 7 — Espectro obtido por MALDI-TOF do peptídeo G16OCP1 após purificação.



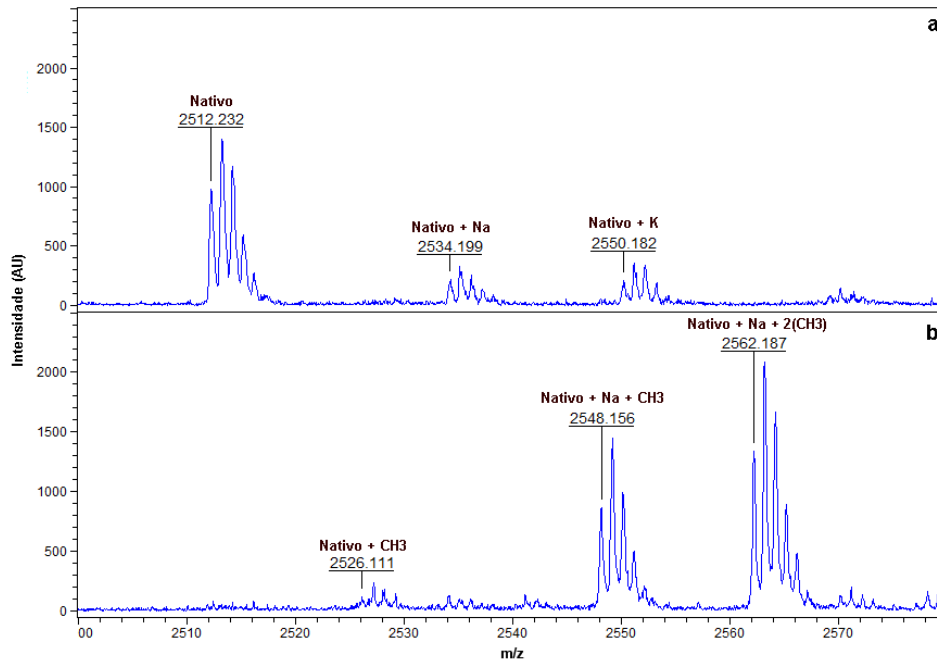
Pode-se observar o peptídeo G16OCP1 nativo (2511,5 Da, $[M+H]^+$)* na companhia de adutos formados com os íons sódio (2533,5) e potássio (2549,5), O inserto na figura mostra a faixa de 700–4000 Da (m/z).

A diferença entre a massa molecular calculada do peptídeo G16OCP1 (2511,45 Da) e a experimental (2510,47 Da) sugeriu a presença de uma possível amidação na porção C-terminal da cadeia polipeptídica, uma característica comum em muitos peptídeos antimicrobianos, principalmente de anuros. Essa hipótese foi comprovada mediante a derivatização do peptídeo por esterificação de Fischer, reação, que levaria à formação de ésteres de metilo nos grupos carboxila livres produzindo mudanças em múltiplos de +14 Da. A análise de massas do peptídeo derivatizado mostrou apenas incrementos de +14 Da (uma metilação) ou +28 Da (duas metilações), sendo atribuídas à esterificação das cadeias laterais dos dois resíduos de aminoácidos ácidos (Asp⁴ e Glu²³) presentes na estrutura do peptídeo G16OCP1 (Figura 8). A ausência de mudanças da ordem de +42 Da (três metilações) indicou a ausência de qualquer outro grupo carboxila livre na cadeia polipeptídica.

De posse da estrutura primária do análogo G16OCP1, tal peptídeo foi sintetizado com o emprego de síntese química manual (Fmoc) e posteriormente submetido a sequenciamento químico, de modo a se confirmar a correção do produto sintético produzido. Após confirmação, a versão sintética do peptídeo

G16OCP1 foi empregada nos experimentos de dicroísmo circular e de caracterização biológica.

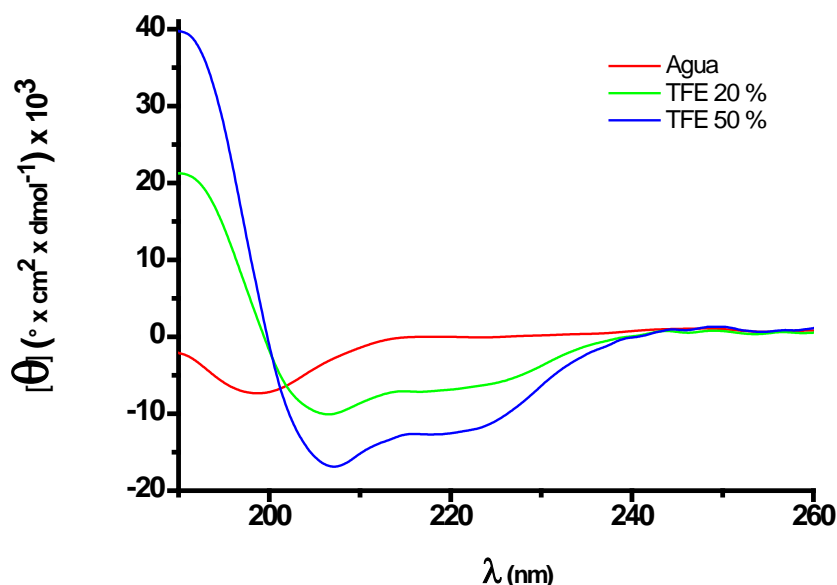
Figura 8 — Espectro do peptídeo G16OCP1 obtidos por MALDI-TOF MS antes e após a derivatização por esterificação de Fischer.



a) Controle: peptídeo G16OCP1 nativo (2512,2 Da, $[M+H^+]$)* com adutos formados com os íons sódio (2534,2 Da) e potássio (2550,2 Da). **b)** Peptídeo G16OCP1 após derivatização de Fischer: peptídeo G16OCP1 com uma metilação e formando aduto com o íon sódio (2548,156 Da, $[M+H^+]$) e peptídeo G16OCP1 com duas metilações e formando aduto com o íon sódio (2562,187 Da, $[M+H^+]$). * Embora a massa molecular determinada para o peptídeo nativo fosse 1 Da superior àquela observada anteriormente, em virtude de problemas na calibração do espectrômetro de massas, as diferenças com relação aos peptídeos metilados foram suficientes para se determinar a existência de dois sítios de metilação neste peptídeo.

A propensão do peptídeo G16OCP1 em formar elementos de estrutura secundária foi avaliada com o emprego do algoritmo SOPMA (GEOURJON; DELEAGE, 1995). A análise da sua estrutura por este método sugeriu 100 % de estrutura em α -hélice (Quadro 1). Essa predição foi avaliada mediante experimentos de dicroísmo circular, analisando o comportamento do peptídeo sintético em água e na presença de trifluoroetanol (TFE), um conhecido indutor de α -hélice (BUCK, 1998). Em água, o peptídeo apresentou um espectro dicróico típico de estrutura desordenada com valor mínimo em 197 nm. Entretanto, na presença de TFE 20 % (v/v) a curva do sinal dicróico começou a adotar um padrão diferenciado com valores mínimos em 208 e 222 nm, que tornaram-se mais acentuados na presença de TFE

Figura 9 — Espectro dicróico do peptídeo G16OCP1 em água e TFE.



Elipticidade molar $[\theta]$ em função do comprimento de onda do peptídeo G16OCP1 quando dissolvido em água, TFE 20 % (v/v) e TFE 50 % (v/v).

O peptídeo G16OCP1 exibiu atividade inibitória contra as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *K. pneumoniae* em concentrações baixas (CIM = 32 μM) e também contra a bactéria Gram-positiva *S. epidermidis* na maior concentração testada (CIM = 128 μM). Contudo, não se mostrou ativo, mesmo na maior concentração empregada (128 μM), contra as demais bactérias testadas: *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *S. aureus* e *E. faecalis* (Tabela 3).

Tabela 3 — Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) do peptídeo G16OCP1 em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

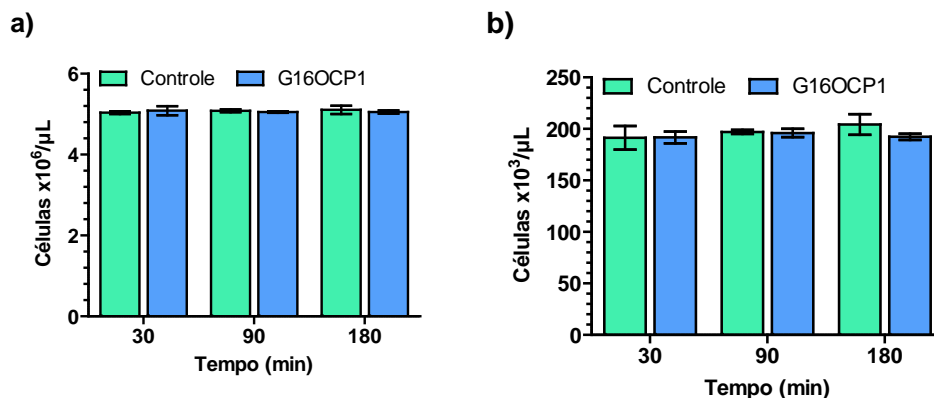
BACTÉRIA	CIM (μM)*
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	32
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 35030	> 128 (12)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	s.a.
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	> 128 (11)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	s.a.

Controles: água Milli-Q estéril (0 % de inibição), formaldeído 0,4 % (100 % de inibição). *O valor entre parêntesis representa a porcentagem de inibição na maior concentração testada (128 μM). s.a.: sem atividade (inibição em 128 μM = 0 %).

Ao se avaliar os efeitos citolíticos sobre eritrócitos humanos, o peptídeo G16OCP1 não apresentou indícios de atividade hemolítica, mesmo na maior concentração testada (128 μM).

As contagens de células sanguíneas por citometria de fluxo não mostraram diferenças significativas no número de hemácias ou plaquetas presentes, ao comparar o controle negativo (sangue puro) e o sangue incubado com o peptídeo G16OCP1 na concentração de 25,6 μM após 30, 60 ou 90 minutos de incubação (Figura 10).

Figura 10 — Efeitos do peptídeo G16OCP1 25,6 μM sobre hemácias e plaquetas humanas após 30, 90 e 180 minutos de incubação.

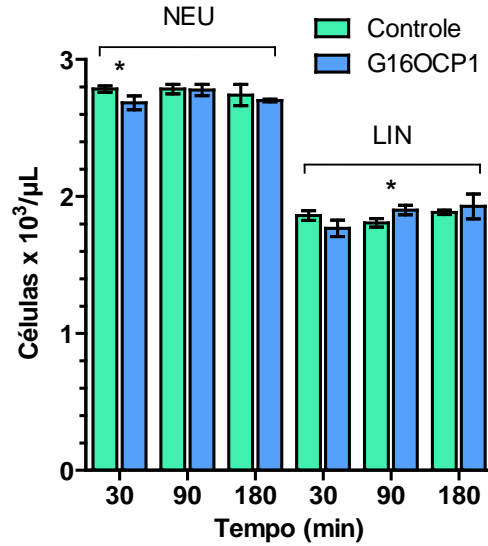


a) Hemácias. b) Plaquetas. As barras representam a média de três leituras com o respectivo desvio padrão. As diferenças observadas não foram significativas ($p > 0,05$, teste t para amostras não pareadas). Controle: Solução salina (NaCl 0,9 %).

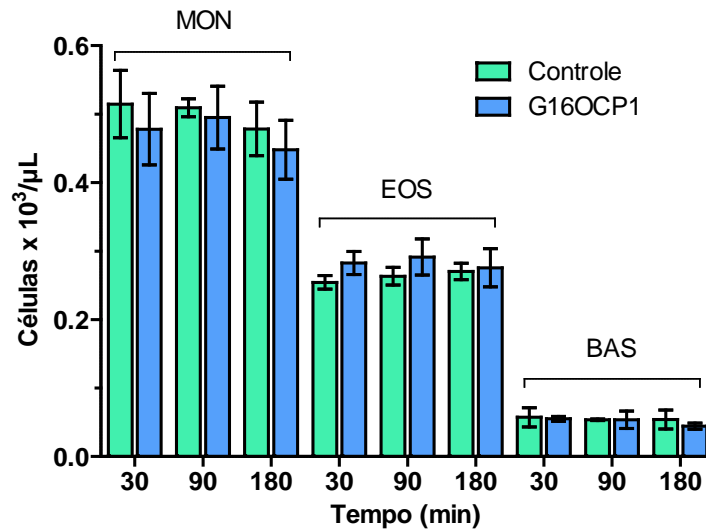
A quantidade de células brancas também foi avaliada a través da citometria de fluxo, observando-se diferenças significativas ao se comparar o número de neutrófilos e de linfócitos após 30 e 90 min, respectivamente (teste t para amostras independentes, $p < 0,05$). No entanto, tais mudanças foram pequenas, sendo que o número de neutrófilos após 30 min de incubação com o peptídeo G16OCP1 diminuiu em 3 % e o número de linfócitos aumentou em 1 %. Contrariamente, o número de células não se mostrou significativamente alterado nas contagens de neutrófilos em 90 e 180 min, nem nas contagens de linfócitos em 30 e 180 min (Figura 11, A). Finalmente, o número de monócitos, eosinófilos e basófilos não apresentou mudanças significativas em nenhum dos tempos analisados, após a incubação com o peptídeo G16OCP1 na concentração de 25,6 μM (teste t para amostras independentes, $p > 0,05$) (Figura 11, B).

Figura 11 — Efeitos do peptídeo G16OCP1 sobre leucócitos humanos após 30, 90 e 180 minutos de incubação.

a)



b)



a) Neutrófilos (NEU) e linfócitos (LIN). **b)** Monócitos (MON), eosinófilos (EOS) e basófilos (BAS). Controle: Solução salina (NaCl 0,9 %). As barras representam a média de três leituras com o respectivo desvio padrão. * = $p < 0,05$, teste t para amostras não pareadas. Controle: Solução salina (NaCl 0,9 %).

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi possível o isolamento e caracterização química e biológica de um novo peptídeo antimicrobiano, denominado G16OCP1.

O peptídeo G16OCP1 exibiu atividade seletiva contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* em concentrações consideradas baixas (32 μ M) e mostrou-se praticamente inativo contra bactérias Gram-positivas, sendo que apenas a bactéria *Staphylococcus epidermidis* apresentou uma leve susceptibilidade ao tratamento com o peptídeo. Embora ainda não exista certeza sobre os mecanismos específicos de ação dos peptídeos antimicrobianos, é, geralmente, aceito que sua eficácia depende em grande parte da sua interação com a membrana da célula-alvo (HANCOCK; ROZEK, 2002). Na medida em que os PAMs catiônicos atacam bactérias Gram-negativas, eles provocam perda de estabilidade na membrana externa ao interagir com lipopolissacarídeos ou fosfolipídios negativamente carregados presentes na sua superfície. Em bactérias Gram-positivas, esse ataque ocorre ao nível dos ácidos teicóicos e teicurônicos e em grupos carboxílicos de aminoácidos presentes na parede de peptidoglicano (DEVINE, 2003; JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000). Embora a interação peptídeo–bactéria seja um processo complexo e possivelmente específico para cada dupla, a seletividade da G16OCP1 pelas duas bactérias Gram-negativas, *E. coli* e *K. pneumoniae*, poderia ser produto da interação mais eficiente do peptídeo com os componentes da membrana destes organismos (SHAI, 2002).

Os resultados encontrados para as CIMs foram comparados com os encontrados previamente para o peptídeo análogo ocelatina-P1 (KING *et al.*, 2005a; LIBÉRIO, 2008) (Tabela 4). A comparação de algumas propriedades dos dois peptídeos, calculadas a partir das suas estruturas primárias, indicam que as diferenças físico-químicas entre eles são bastante sutis (Tabela 5); além disso, nesse estudo Libério (2008) encontrou valores de CIM para a ocelatina-P1 que são idênticos aos encontrados no presente estudo com o peptídeo G16OCP1. No caso de *Klebsiella pneumoniae*, a cepa utilizada neste trabalho mostrou-se menos resistente que a utilizada por King e colaboradores (KING *et al.*, 2005a). Estudos realizados com esta bactéria sugerem que a resistência aos PAMs é conferida por polissacarídeos da cápsula bacteriana (CAMPOS *et al.*, 2004), por proteínas da

membrana externa envolvidas com sistemas adaptativos de resistência (LLOBET *et al.*, 2009), ou por sistemas de efluxo (PADILLA *et al.*, 2010); portanto, a grande diferença encontrada na susceptibilidade de *K. pneumoniae* poderia ser resultado de mudanças estruturais produzidas pela substituição desse único resíduo de aminoácido, ou ser produto de diferenças fenotípicas existentes na superfície externa das bactérias de diferentes cepas.

Tabela 4 — Comparação das atividades antimicrobiana e hemolítica dos peptídeos ocelatina-P1 e G16OCP1.

CÉLULAS	OCELATINA-P1		G16OCP1
	King <i>et al.</i> (2005a)	Libério (2008)	Este trabalho
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25	32	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KK3 9904	100	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	-	-	32
<i>Enterobacter cloacae</i> HNTCC 53001	50	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 35030	-	-	> 128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	100	> 128	s.a.
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325	200	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	> 128	> 128
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A	100	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	128
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	200	-	s.a.
Eritrócitos (HC_{50})*	> 400 (29)	s.a.	s.a.

(-): não avaliado. *O valor entre parênteses representa a porcentagem de hemólise na máxima concentração avaliada.

Tabela 5 — Propriedades físico-químicas dos peptídeos ocelatina-P1 e G16OCP1.

	MM (Da)	Q	pI	⟨H⟩	⟨μH⟩
G16OCP1	2542	+3	10,55	-0,05	0,15
Ocelatina-P1	2512	+3	10,55	-0,03	0,12

MM = Massa molecular; Q = carga; pI = ponto isoelétrico; ⟨H⟩ = hidrofobicidade média; ⟨μH⟩ = momento hidrofóbico médio.

Alguns PAMs podem adotar estruturas em α -hélice anfifílicas ao ligar-se à membrana citoplasmática ou interagir com a superfície externa de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas (DEVINE, 2003; TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000). Os α -AMPs encontram-se entre os PAMs mais abundantes e melhor distribuídos na natureza (TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000) e as concentrações efetivas de vários deles estão situadas, em geral, na faixa micromolar (DENNISON *et al.*, 2005), como as encontradas para o peptídeo G16OCP1 (Tabela 3).

A maioria desses peptídeos apresentam estrutura randômica em solução aquosa, mas adquirem conformação α -hélice durante a inserção na membrana mediante interações hidrofóbicas com ela (DENNISON *et al.*, 2005). As predições pelo método SOPMA e os resultados das análises por dicroísmo circular indicam que o peptídeo G16OCP1 adota uma conformação em α -hélice ao entrar em contato com a membrana das bactérias. Foi observado que o peptídeo adota 56 % de conformação em α -hélice na presença de TFE 50 % (v/v). Esses resultados complementam as escassas observações realizadas nesta família de peptídeos quanto ao seu enovelamento. Além disso, Nielsen e colaboradores (2007) encontraram que o peptídeo da mesma família, ocelatina-F1, também presente na secreção de *L. labyrinthicus*, adota 53 % de conformação em α -hélice na presença de TFE 50 %. A ocelatina-F1 apresenta 68 % de similaridade com o peptídeo G16OCP1, sendo a maioria das substituições, conservativas (Quadro 2, a).

Uma série de características, tais como carga líquida, hidrofobicidade, anfifilicidade e composição da membrana são importantes tanto para a atividade citolítica, quanto para a seletividade dos PAMs (YEAMAN; YOUNT, 2003). A eficácia de um determinado peptídeo depende em grande parte de como esse conjunto de fatores conferem vantagens únicas à molécula frente a um determinado organismo.

A amidação C-terminal presente no peptídeo G16OCP1 é uma modificação pós-traducional importante em muitos PAMs, já que incrementa a carga líquida da molécula e favorece a formação de α -hélice ao promover uma ponte de hidrogênio adicional que permite estabilizar a hélice (WHITE; WIMLEY, 1999). Essa característica é importante também para o incremento da carga líquida e a redução da susceptibilidade a carboxipeptidases (SHALEV; MOR; KUSTANOVICH, 2002). Um estudo de Mor e Nicolas (1994) demonstrou que a amidação de

fragmentos da dermaseptina-S1 produz melhorias no potencial antimicrobiano desses polipeptídeos.

Quadro 2 — Alinhamento múltiplo dos peptídeos da família das ocelatinas.

a)	
	10 20
G16OCP1	GLLDTLKGAAKNVVGLASKVMEKL 25
Ocellatin-F1	GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL 25
	:: *****:.* *****:*
b)	
	10 20
Ocellatin-2	GVLDIFKDAAKQILAHAAEQI----- 21
Ocellatin-3	GVLDILKNAAKNILAHAAEQI----- 21
Ocellatin-F1	GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL 25
Ocellatin-K1	GVVDILKGAAKDLAGHLASKVMNKI 25
Ocellatin-L1	GVVDILKGAAKDLAGHLATKVMNKL 25
Ocellatin-L2	GVVDILKGAAKDLAGHLATKVMDKL 25
Ocellatin-S1	GVLDILKGAAKDLAGHVATKVINKI 25
G16OCP1	GLLDTLKGAAKNVVGLASKVMEKL 25
Ocellatin-P1	GLLDTLKGAAKNVVGLASKVMEKL 25
Ocellatin-5*	GLLDFLKAAGKGLVTNL----- 17
Ocellatin-6	AVLDFIKAAGKGLVTNIMEKVG--- 22
Ocellatin-5**	AVLDILKDVGKGLLSHFMEKV---- 21
Ocellatin-V1	GVVDILKGAAGKDLLAHALS KLSEKV 25
Ocellatin-V3	GVLDILTGAAGKDLLAHALS KLSEKV 25
Ocellatin-V2	GVLDILKGAAGKDLLAHALS KLSEKV 25
Ocellatin-1	GVVDILKGAAGKDLLAHLVGI SEKV 25
Ocellatin-4	GLLDFVTGVGKDIFAQLIKQI---- 21
	.::* .. .* :
Consenso	GVLDILKGAAKDLL+HLASKVMEKL

a) Alinhamento entre os peptídeos G16OCP1 e ocelatina-F1. **b)** Alinhamento múltiplo do peptídeo G16OCP1 com as outras ocelatinas reportadas na literatura e na base de dados Uniprot. As cores dos resíduos de aminoácidos representam suas propriedades físico-químicas: **laranja** = apolar; **verde** = polar sem carga; **rosa** = básico; **azul** = ácido. Substituições conservativas e semi-conservativas estão assinaladas com (:) e (.) respectivamente. *The Uniprot Consortium (2012). **Leite *et al.* (2010).

O alinhamento de sequências de peptídeos da família das ocelatinas permite observar que o peptídeo G16OCP1 possui bastante similaridade com as outras ocelatinas previamente isoladas de anuros do gênero *Leptodactylus* e que, em sua maioria, possuem atividade antimicrobiana. Pela análise do multialinhamento é possível observar uma região amino-terminal bastante conservada, com resíduos idênticos nas posições 4 (Asp) e 11 (Lys), além de três substituições conservativas nas posições 2, 3 e 13, e cinco substituições semiconservativas nas posições 1, 6, 7, 9 e 10 (Quadro 2, b). A conservação das características desses resíduos parece

então ter sido favorecida evolutivamente nas espécies do gênero *Leptodactylus*, em virtude das vantagens que esses peptídeos trazem à sobrevivência desses animais.

O peptídeo G16OCP1 apresenta várias propriedades em sua estrutura primária que podem favorecer a atividade antimicrobiana. A presença e abundância relativa de determinados aminoácidos é decisiva para a carga líquida, a hidrofobicidade e a estrutura tridimensional do peptídeo. Ao analisar-se a composição da G16OCP1 (Tabela 6) é possível observar a presença de vários resíduos que poderiam favorecer sua interação com membranas bacterianas. Análises deste tipo indicam que os α -AMPs possuem aproximadamente 50 % de resíduos polares e 50 % de resíduos apolares (TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000). A composição do peptídeo G16OCP1 mostra distribuição semelhante, com 48 % de resíduos hidrofóbicos e 52 % de resíduos polares. Tal peptídeo apresenta também quatro resíduos de lisina que favorecem o caráter catiônico da molécula. Resíduos aniônicos costumam ser escassos nos PAMs formadores de α -hélice, mas, quando presentes, encontram-se a três ou quatro posições com relação aos resíduos catiônicos (DENNISON *et al.*, 2005; DENNISON, 2004; PARK *et al.*, 1997). Na estrutura do análogo G16OCP1 essa característica pode ser evidenciada nas posições Asp⁴-Lys⁷ e Lys²⁰-Glu²³. Apesar de reduzir a carga líquida da molécula, a presença desses dois resíduos ácidos (Asp⁴ e Glu²³), poderia ajudar a estabilizar a hélice pela formação de pontes salinas, ao permitir a interação com os resíduos de lisina positivamente carregados, como sugerem Betts e Russell (2003). Por outro lado, é conhecido que resíduos como lisina, leucina e alanina (também abundantes em G16OCP1) estabilizam ou promovem a formação da α -hélice (DENNISON, 2004; ROLLINS-SMITH *et al.*, 2005). Finalmente, o aminoácido glicina, que também é abundante em muitos PAMs formadores de α -hélice, apresenta-se em alta frequência no peptídeo G16OCP1 (com a presença de quatro resíduos ou 16 %). Este resíduo é bastante comum na posição 1 e aparentemente confere resistência às aminopeptidases. Além disso, a glicina parece ter importância na terminação da hélice ou em regiões de dobradiça (TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000). Um estudo realizado com o peptídeo ranatuerin-1 demonstrou que a substituição de glicina na região central da molécula promoveu a formação de α -hélice, mas suprimiu a atividade antimicrobiana (SONNEVEND *et al.*, 2004). No entanto, a substituição de Ser¹⁶ \rightarrow Gly, que diferencia a G16OCP1 da ocelatina-P1, parece não afetar a atividade dessa molécula, visto que as CIMs para iguais cepas bacterianas,

assim como, a atividade hemolítica foram muito similares, quando comparados os dados deste trabalho com os dados de Libério (2008) (Tabela 4).

Tabela 6 — Composição de aminoácidos do peptídeo G16OCP1.

AMINOÁCIDOS	FREQUÊNCIA ABSOLUTA	FREQUÊNCIA RELATIVA (%)
Ala	3	12
Asn	1	4
Asp	1	4
Glu	1	4
Gly	4	16
Leu	5	20
Lys	4	16
Met	1	4
Ser	1	4
Thr	1	4
Val	3	12

Laranja = apolar; verde = polar sem carga; rosa = básico; azul = ácido.

Duas características importantes na atividade dos PAMs formadores de α -hélice são a hidrofobicidade e a anfifilicidade. Estas propriedades costumam ser analisadas através da hidrofobicidade média $\langle H \rangle$ e o momento hidrofóbico médio $\langle \mu H \rangle$ (EISENBERG; WEISS; TERWILLIGER, 1982; PHOENIX *et al.*, 2002). Vários estudos permitiram determinar uma correlação negativa entre essas duas características e sugeriram que deve existir um equilíbrio apropriado para a efetividade e especificidade desses peptídeos ao interagirem com as membranas biológicas (DENNISON, 2004; HARRIS, 2000; WALLACE; HARRIS; PHOENIX, 2003). A anfifilicidade em peptídeos formadores de α -hélice manifesta-se, na estrutura primária, pela presença de grupos de dois ou três resíduos hidrofóbicos, alternados com padrões similares de resíduos polares (DENNISON *et al.*, 2005). Esse modelo pode ser observado, não apenas na G16OCP1, mas também nas outras ocelatinas (Quadro 2, b). A análise detalhada desses peptídeos nos permite inferir que devido às similaridades estruturais, vários desses peptídeos poderiam

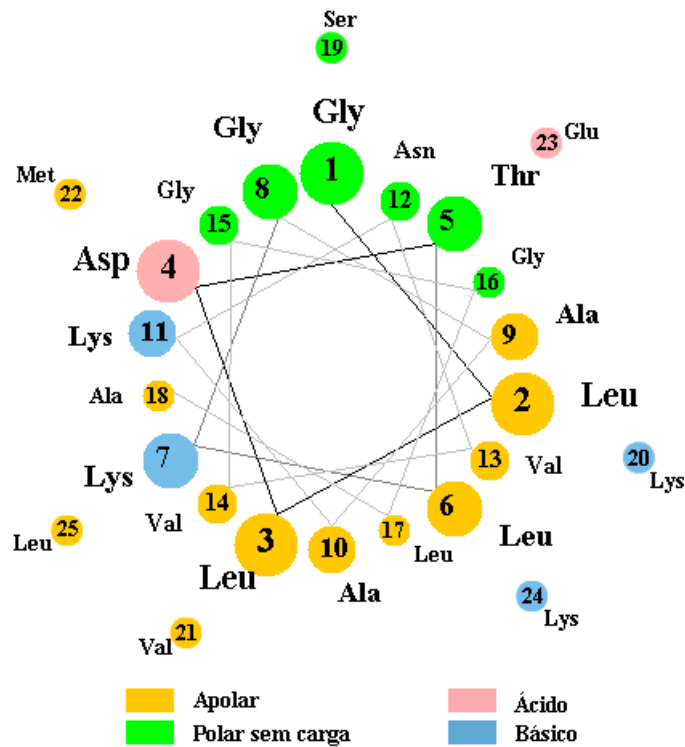
exercer sua atividade através da adoção de estruturas em α -hélice como foi sugerido por outros autores (CONLON *et al.*, 2006; KING *et al.*, 2005a; KING *et al.*, 2008; ROLLINS-SMITH *et al.*, 2005), pois de acordo com French e Robson (1983), as pressões evolutivas favorecem a conservação dos elementos de estrutura secundária.

Foi sugerido que, além das membranas bacterianas, os PAMs podem interagir com a superfície dos eritrócitos ao se ligarem a resíduos de ácido siálico presentes em glicoproteínas ou glicoesfingolipídios que fazem parte do glicocálix (BLONDELLE; LOHNER; AGUILAR, 1999). No entanto, os resultados dos ensaios de toxicidade em células sanguíneas sugerem que o peptídeo G16OCP1 não afeta a integridade dos eritrócitos nas concentrações testadas, visto que não foi detectada hemólise mesmo em 128 μ M (concentração máxima avaliada). A inserção dos PAMs na bicamada lipídica dos eritrócitos parece depender da sua habilidade para ultrapassar a barreira de carboidratos do glicocálix (BLONDELLE; LOHNER; AGUILAR, 1999). Porém, o fato de que a maioria dos PAMs catiônicos possui baixa afinidade pelas membranas “zwitteriônicas” pode dificultar a liberação do peptídeo do glicocálix para a membrana fosfolipídica (PAPO; SHAI, 2003).

Da mesma forma, o peptídeo G16OCP1 parece não afetar a integridade das plaquetas nem das células brancas (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, Figura 11). Embora tenha sido observada uma leve diminuição no número de neutrófilos após a incubação do sangue com o peptídeo G16OCP1, essa diferença foi observada apenas nos primeiros 30 min, sendo que após 90 e 180 min não houve diferenças significativas no número de células contadas. Portanto, tais observações indicam que a população de neutrófilos não foi realmente prejudicada pela presença do peptídeo de interesse.

A conformação em α -hélice e a anfifilicidade são consideradas importantes para a atividade contra bactérias Gram-positivas, bem como para a atividade hemolítica (DATHE *et al.*, 1997; GIANGASPERO; SANDRI; TOSSI, 2001). Uma projeção realizada pelo método de Schiffer e Edmundson (1967) mostra que o peptídeo G16OCP1 possui uma boa distribuição anfifílica nos primeiros 19 resíduos. No entanto, a distribuição de resíduos polares e apolares apresenta-se mais dispersa nos últimos seis resíduos de aminoácidos (Figura 12). Portanto, essa falta de uma estrutura anfifílica bem definida poderia explicar a baixa efetividade contra células Gram-positivas, assim como a falta de atividade hemolítica desse peptídeo.

Figura 12 — Projeção em roda helicoidal do peptídeo G16OCP1.



Em síntese, os resultados do presente estudo demonstram que o peptídeo G16OCP1 é um bom candidato para o desenvolvimento de novos fármacos com aplicação no tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias gram-negativas.

A produção de peptídeos é um processo custoso para a indústria (HANCOCK; SAHL, 2006). Portanto, a modificação sistemática da estrutura deste peptídeo poderia ainda permitir o melhoramento de sua atividade antimicrobiana, sem alteração de seus efeitos sobre as células de mamíferos. No entanto, essas hipóteses precisam ser comprovadas a fim de se avançar no conhecimento do potencial farmacêutico deste peptídeo.

7. CONCLUSÕES

O estudo da secreção cutânea de *Leptodactylus labyrinthicus* permitiu a identificação e purificação do peptídeo inédito G16OCP1. Tal peptídeo mostrou-se ser um análogo da ocelatina-P1, previamente isolado das secreções cutâneas dos anuros *L. pentadactylus* e *L. labyrinthicus*.

Os resultados demonstram que este peptídeo tem função antimicrobiana e que aparentemente é mais efetivo contra bactérias Gram-negativas, possuindo atividade considerável contra cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*; embora apresente atividade, porém fraca, contra uma cepa da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis*.

Análises estruturais do peptídeo G16OCP1 permitem sugerir que as características físico-químicas decorrentes de sua estrutura primária, como a presença e disposição de determinados resíduos de aminoácidos e a existência de amidação na porção C-terminal favorecem a formação de uma estrutura em α -hélice parcialmente anfifílica ao interagir com membranas biológicas.

Finalmente o peptídeo G16OCP1 demonstrou baixa toxicidade sobre células sanguíneas humanas, indicando sua possível aplicação no tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias Gram-negativas.

REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, Y. H. *et al.* Insulin releasing properties of the temporin family of antimicrobial peptides. **Protein Pept.Lett** v. 14, n. 7, p. 702–707, 2007.

ABDEL-WAHAB, Yasser H. A. *et al.* Isolation and structural characterisation of a novel 13-amino acid insulin–releasing peptide from the skin secretion of *Agalychnis calcarifer*. **Biological Chemistry** v. 386, n. 6, p. 581–587, 2005.

ALBIOL MATANIC, Vanesa C.; CASTILLA, Viviana. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and *herpes simplex* virus. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 23, n. 4, p. 382–389, 2004.

ALI, Mohamed F. *et al.* Antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the diploid frog, *Xenopus tropicalis* (Pipidae). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Protein Structure and Molecular Enzymology** v. 1550, n. 1, p. 81–89, 2001.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research** v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.

AMICHE, Mohamed; LADRAM, Ali; NICOLAS, Pierre. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. **Peptides** v. 29, n. 11, p. 2074–2082, 2008.

AMICHE, Mohamed *et al.* Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family. **European Journal of Biochemistry** v. 267, n. 14, p. 4583–4592, 2000.

BASIR, Yousef J. *et al.* Multiple antimicrobial peptides and peptides related to bradykinin and neuromedin N isolated from skin secretions of the pickerel frog, *Rana palustris*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Protein Structure and Molecular Enzymology** v. 1543, n. 1, p. 95–105, 2000.

BAYER, Arnold S. *et al.* *In vitro* resistance of *Staphylococcus aureus* to thrombin–induced platelet microbicidal protein is associated with alterations in cytoplasmic membrane fluidity. **Infection and Immunity** v. 68, n. 6, p. 3548–3553, 2000.

BECHINGER, Burkhard; LOHNER, Karl. Detergent–like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes** v. 1758, n. 9, p. 1529–1539, 2006.

BELAID, A. *et al.* *In vitro* antiviral activity of dermaseptins against *herpes simplex* virus type 1. **J Med Virol.** v. 66, n. 2, p. 229–234, 2002.

BENGOECHEA, J. A.; SKURNIK, M. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. **Mol Microbiol** v. 37, n. 1, p. 67–80, 2000.

BETTS, Matthew J.; RUSSELL, Robert B. Amino acid properties and consequences of substitutions. **Bioinformatics for Geneticists**. John Wiley & Sons, Ltd. 2003. cap. 14, p.289–316. ISBN 9780470867303.

BIGGIN, Phil C.; SANSOM, Mark S. P. Interactions of α -helices with lipid bilayers: a review of simulation studies. **Biophysical Chemistry** v. 76, n. 3, p. 161–183, 1999.

BLONDELLE, S. E.; LOHNER, K.; AGUILAR, M. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. **Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology** v. 1462, n. 1–2, p. 89–108, 1999.

BRADFORD, A. M. *et al.* Novel upeirin peptides from the dorsal glands of the Australian floodplain toadlet *Uperoleia inundata*. **Australian Journal of Chemistry** v. 49, n. 4, p. 475–484, 1996.

BROGDEN, K. A.; ACKERMANN, M.; HUTTNER, K. M. Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 41, n. 7, p. 1615–1617, 1997.

BROGDEN, Kim A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology** v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.

BUCK, M. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. **Q.Rev Biophys** v. 31, n. 3, p. 297–355, 1998.

CAMARGOS, Thalita Soares *et al.* The new kappa-KTx 2.5 from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. **Peptides** v. 32, n. 7, p. 1509–1517, 2011.

CAMPOS, Miguel A. *et al.* Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infection and Immunity** v. 72, n. 12, p. 7107–7114, 2004.

CARDOSO, Suane *et al.* Transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) expressing the attacin A gene for resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plant Molecular Biology Reporter** v. 28, n. 2, p. 185–192, 2010.

CASALLANOVO, F. *et al.* Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin sticholysin II. **Biopolymers** v. 84, n. 2, p. 169–180, 2006.

CASTRO, M. S.; CILLI, E. M.; FONTES, W. Combinatorial synthesis and directed evolution applied to the production of alpha-helix forming antimicrobial peptides analogues. **Curr. Protein Pept.Sci.** v. 7, n. 6, p. 473–478, 2006.

CASTRO, M. S. *et al.* Hylinins: bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the Brazilian tree-frog *Hyla biobeba*. **Protein and Peptide Letters** v. 12, n. 1, p. 89–93, 2005.

CASTRO, Mariana S. *et al.* Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides** v. 30, n. 2, p. 291–296, 2009.

CHAKRABARTI, A. *et al.* MSI-99, a magainin analogue, imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana. **Planta** v. 216, n. 4, p. 587–596, 2003.

CHRISTIAN, Wechselberger. Cloning of cDNAs encoding new peptides of the dermaseptin-family. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Protein Structure and Molecular Enzymology** v. 1388, n. 1, p. 279–283, 1998.

CLARK, D. P. *et al.* Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. **Journal of Biological Chemistry** v. 269, n. 14, p. 10849–10855, 1994.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biol Rev Camb.Philos.Soc.** v. 72, n. 3, p. 365–379, 1997.

COCA, María *et al.* Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a cecropin A gene in transgenic rice. **Planta** v. 223, n. 3, p. 392–406, 2006.

COLLINS, L. Vincent *et al.* *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. **Journal of Infectious Diseases** v. 186, n. 2, p. 214–219, 2002.

CONLON, J. M. A proposed nomenclature for antimicrobial peptides from frogs of the genus *Leptodactylus*. **Peptides** v. 29, n. 9, p. 1631–1632, 2008.

CONLON, J. M. *et al.* Purification and properties of laticeptin, an antimicrobial peptide from skin secretions of the South American frog *Leptodactylus laticeps*. **Protein and Peptide Letters** v. 13, n. 4, p. 411–415, 2006.

CONLON, J. Michael *et al.* A glycine-leucine-rich peptide structurally related to the plasticins from skin secretions of the frog *Leptodactylus laticeps* (Leptodactylidae). **Peptides** v. 30, n. 5, p. 888–892, 2009.

CONLON, J. Michael *et al.* Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. **Methods** v. 42, n. 4, p. 349–357, 2007.

CONLON, J. Michael *et al.* A potent, non-toxic insulin-releasing peptide isolated from an extract of the skin of the Asian frog, *Hylarana guntheri* (Anura:Ranidae). **Regulatory Peptides** v. 151, n. 1–3, p. 153–159, 2008.

COOTE, Peter J. *et al.* Inhibitory action of a truncated derivative of the amphibian skin peptide dermaseptin S3 on *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 42, n. 9, p. 2160–2170, 1998.

CORRÊA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African J Biochem Res** v. 3, n. 5, p. 164–173, 2009.

CSORDÁS, A.; MICHL, H. Isolierung und Strukturaufklärung eines hämolytisch wirkenden Polypeptides aus dem Abwehrsekret europäischer Unken. **Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly** v. 101, n. 1, p. 182–189, 1970.

CUNLIFFE, R. N.; MAHIDA, Y. R. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. **Journal of Leukocyte Biology** v. 75, n. 1, p. 49–58, 2004.

DAGAN, Arie *et al.* In Vitro Antiplasmodium effects of dermaseptin S4 derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 46, n. 4, p. 1059–1066, 2002.

DATHE, M. *et al.* Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. **FEBS Lett** v. 403, n. 2, p. 208–212, 1997.

DE LUCCA, A. J. Antifungal peptides: potential candidates for the treatment of fungal infections. **Expert.Opin.Investig.Drugs** v. 9, n. 2, p. 273–299, 2000.

DEL CASTILLO, Francisco J.; DEL CASTILLO, Ignacio; MORENO, Felipe. Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli* gyrB gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin B17 and alter the activity of DNA gyrase. **The Journal of Bacteriology** v. 183, n. 6, p. 2137–2140, 2001.

DENNISON, S. R. *et al.* Amphiphilic α -helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. **Protein & Peptide Letters** v. 12, n. 1, p. 31–39, 2005.

DENNISON, Sarah Rachel. **Investigation into the structure function relationship of the membrane interaction of amphiphilic alpha helical antimicrobial peptides**. 2004. Thesis (PhD). University of Central Lancashire, Preston, Lancashire, UK.

DEVINE, D. A. Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. **Mol Immunol** v. 40, n. 7, p. 431–443, 2003.

DORRER, Elisabeth; TEUBER, Michael. Induction of polymyxin resistance in *Pseudomonas fluorescens* by phosphate limitation. **Archives of Microbiology** v. 114, n. 1, p. 87–89, 1977.

DOURADO, F. S. *et al.* Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus siphax*. **Toxicon** v. 50, n. 4, p. 572–580, 2007.

DÜRR, Ulrich H. N.; SUDHEENDRA, U. S.; RAMAMOORTHY, Ayyalusamy. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes** v. 1758, n. 9, p. 1408–1425, 2006.

EFRON, Leah *et al.* Direct interaction of dermaseptin S4 aminoheptanoyl derivative with intraerythrocytic malaria parasite leading to increased specific antiparasitic Activity in culture. **Journal of Biological Chemistry** v. 277, n. 27, p. 24067–24072, 2002.

EISENBERG, D.; WEISS, R. M.; TERWILLIGER, T. C. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. **Nature** v. 299, n. 5881, p. 371–374, 1982.

ERNST, Robert K.; GUINA, Tina; MILLER, Samuel I. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. **Journal of Infectious Diseases** v. 179, n. Supplement 2, p. S326–S330, 1999.

ERNST, Robert K. *et al.* Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. **Science** v. 286, n. 5444, p. 1561–1565, 1999.

FRIEDRICH, Carol *et al.* Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 43, n. 7, p. 1542–1548, 1999.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In WALKER, J. M. (Ed.) **The Proteomics Protocols Handbook**. Humana Press. 2005. p.571–607. ISBN 978-1-58829-343-5.

GAZIT, Ehud *et al.* Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. **Biochemistry** v. 34, n. 36, p. 11479–11488, 1995.

GEOURJON, C.; DELEAGE, G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. **Bioinformatics** v. 11, n. 6, p. 681–684, 1995.

GIACOMETTI, Andrea *et al.* Activity of buforin II alone and in combination with azithromycin and minocycline against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 47, n. 1, p. 97–99, 2001.

GIANGASPERO, Anna; SANDRI, Luca; TOSSI, Alessandro. Amphipathic α -helical antimicrobial peptides. A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. **European Journal of Biochemistry** v. 268, n. 21, p. 5589–5600, 2001.

GORAYA, Jadvinder; KNOOP, Floyd C.; CONLON, J. Michael. Ranatuerins: Antimicrobial Peptides Isolated from the Skin of the American Bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 250, n. 3, p. 589–592, 1998.

GUO, Lin *et al.* Lipid A Acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. **Cell** v. 95, n. 2, p. 189–198, 1998.

HANCOCK, R. E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **Lancet Infectious Diseases** v. 1, n. 3, p. 156–164, 2001.

HANCOCK, R. E.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents & Chemotherapy** v. 43, n. 6, p. 1317–1323, 1999.

HANCOCK, R. E.; ROZEK, A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. **FEMS Microbiology Letters** v. 206, n. 2, p. 143–149, 2002.

HANCOCK, R. E.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host–defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat Biotechnol.** v. 24, n. 12, p. 1551–1557, 2006.

HARRIS, F. Use of hydrophobic moment plot methodology to aid the identification of oblique orientated α -helices. **Molecular Membrane Biology** v. 17, n. 4, p. 201–207, 2000.

HARRIS, Frederick; DENNISON, Sarah R.; PHOENIX, David A. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. **Current Protein and Peptide Science** v. 10, n. 6, p. 585–606, 2009.

HEYER, Ronald; MIJARES, Abraham; BALDO, Diego. **IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2.** Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 29-1-2012.

HEYER, W. Ronald. Systematics of the pentadactylus species group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia: Leptodactylidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, n. 301, 43 p., 1979.

_____. Variation and taxonomic clarification of the large species of the *Leptodactylus pentadactylus* species group (Amphibia: Leptodactylidae) from Middle America, Northern South America, and Amazonia. **Arquivos de Zoologia** v. 37, p. 269–348, 2005.

HOSKIN, David W.; RAMAMOORTHY, Ayyalusamy. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes** v. 1778, n. 2, p. 357–375, 2008.

HUANG, C. M.; CHEN, H. C.; ZIERDT, C. H. Magainin analogs effective against pathogenic protozoa. **Antimicrobial Agents & Chemotherapy** v. 34, n. 9, p. 1824–1826, 1990.

ISAACSON, Todd *et al.* Antimicrobial peptides with atypical structural features from the skin of the Japanese brown frog *Rana japonica*. **Peptides** v. 23, n. 3, p. 419–425, 2002.

ISLAM, Dilara *et al.* Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. **Nat Med** v. 7, n. 2, p. 180–185, 2001.

JACKWAY, Rebecca J. *et al.* Disulfide-containing peptides from the glandular skin secretions of froglets of the genus *Crinia*: Structure, activity and evolutionary trends. **Regulatory Peptides** v. 151, n. 1–3, p. 80–87, 2008.

JANG, Woong Sik *et al.* Antifungal activity of synthetic peptide derived from halocidin, antimicrobial peptide from the tunicate, *Halocynthia aurantium*. **FEBS Letters** v. 580, n. 5, p. 1490–1496, 2006.

JENSSEN, Havard; HAMILL, Pamela; HANCOCK, Robert E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews** v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.

JIA, Zhichun *et al.* Enhanced resistance to fungal pathogens in transgenic *Populus tomentosa* Carr. by overexpression of an nsLTP-like antimicrobial protein gene from motherwort (*Leonurus japonicus*). **Tree Physiology** v. 30, n. 12, p. 1599–1605, 2010.

KAVANAGH, K.; DOWD, S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 56, p. 285–289, 2004.

KING, Jay D. *et al.* Pentadactylin: An antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** v. 141, n. 4, p. 393–397, 2005a.

KING, Jay D. *et al.* Purification and characterization of antimicrobial peptides from the Caribbean frog, *Leptodactylus validus* (Anura: Leptodactylidae). **Peptides** v. 29, n. 8, p. 1287–1292, Aug 2008.

KING, Jay D. *et al.* Characterization of a peptide from skin secretions of male specimens of the frog, *Leptodactylus fallax* that stimulates aggression in male frogs. **Peptides** v. 26, n. 4, p. 597–601, 2005b.

KOO, Ja Choon *et al.* Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts. **Plant and Cell Physiology** v. 45, n. 11, p. 1669–1680, 2004.

KÜCKELHAUS, Selma A. S. *et al.* Antiplasmodial and antileishmanial activities of phylloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa azurea* (Amphibia). **Experimental Parasitology** v. 123, n. 1, p. 11–16, 2009.

LAI, Ren *et al.* An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 295, n. 4, p. 796–799, 2002a.

LAI, Ren *et al.* Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*. **Peptides** v. 23, n. 3, p. 427–435, 2002b.

LARKIN, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics** v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007.

LEE, Dong Gun *et al.* Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 305, n. 2, p. 305–310, 2003.

LEHRER, Robert I.; GANZ, Tomas. Endogenous vertebrate antibiotics. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 797, n. 1, p. 228–239, 1996.

LEITE, João Manoel Almeida Jr. *et al.* *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia): mechanism of defense in the skin and molecular phylogenetic relationships. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology** v. 313A, n. 1, p. 1–8, 2010.

LEITE, José Roberto *et al.* Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides** v. 26, n. 4, p. 565–573, 2005.

LEMAITRE, Bruno *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell** v. 86, n. 6, p. 973–983, 1996.

LI, Jianxu *et al.* Anti-infection peptidomics of amphibian skin. **Molecular Cellular Proteomics** v. 6, n. 5, p. 882–894, 2007.

LIBÉRIO, M. S. **Caracterização química e biológica da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*: peptídeos antimicrobianos e anticarcinogênicos, fosfolipases e peptidases.** 2008. 128 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade de Brasília, Brasília.

LIBÉRIO, M. S. *et al.* Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. **Amino Acids** v. 40, n. 1, p. 51–59, 2011.

LLOBET, Enrique *et al.* *Klebsiella pneumoniae* OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 53, n. 1, p. 298–302, 2009.

LÓPEZ-GARCÍA, Belén *et al.* Stabilisation of mixed peptide/lipid complexes in selective antifungal hexapeptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes** v. 1660, n. 1–2, p. 131–137, 2004.

LORIN, C. *et al.* The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. **Virology** v. 334, n. 2, p. 264–275, 2005.

MAGALHÃES, Beatriz S. *et al.* Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 377, n. 4, p. 1057–1061, 2008.

MANGONI, M. Luisa *et al.* Ranacyclins, a new family of short cyclic antimicrobial peptides: biological function, mode of action, and parameters involved in target specificity. **Biochemistry** v. 42, n. 47, p. 14023–14035, 2003.

MARENAH, L. *et al.* Brevinin-1 and multiple insulin–releasing peptides in the skin of the frog *Rana palustris*. **Journal of Endocrinology** v. 181, n. 2, p. 347–354, 2004a.

_____. Skin secretion of the toad *Bombina variegata* contains multiple insulin–releasing peptides including bombesin and entirely novel insulinotropic structures. **Biol Chem.** v. 385, n. 3–4, p. 315–321, 2004b.

MARENAH, L. *et al.* Characterization of naturally occurring peptides in the skin secretion of *Rana pipiens* frog reveal pipinin-1 as the novel insulin–releasing agent. **The Journal of Peptide Research** v. 66, n. 4, p. 204–210, 2005.

MARENAH, L. *et al.* Skin secretions of *Rana saharica* frogs reveal antimicrobial peptides esculentins-1 and -1B and brevinins-1E and -2EC with novel insulin releasing activity. **Journal of Endocrinology** v. 188, n. 1, p. 1–9, 2006.

MCGWIRE, Bradford S.; KULKARNI, Manjusha M. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. **Experimental Parasitology** v. 126, n. 3, p. 397–405, 2010.

MIELE, Rossella *et al.* Molecular cloning of a bombinin gene from *Bombina orientalis*: detection of NF-KB and NF-IL6 binding sites in its promoter. **FEBS Letters** v. 431, n. 1, p. 23–28, 1998.

MITEVA, Maria *et al.* Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. **FEBS Letters** v. 462, n. 1–2, p. 155–158, 1999.

MOR, A. *et al.* Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. **Biochemistry** v. 30, n. 36, p. 8824–8830, 1991.

MOR, A.; NICOLAS, P. The NH₂-terminal alpha-helical domain 1–18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. **Journal of Biological Chemistry** v. 269, n. 3, p. 1934–1939, 1994.

MORIKAWA, Noriyuki; HAGIWARA, Ken'ichi; NAKAJIMA, Terumi. Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipoda porsa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 189, n. 1, p. 184–190, 1992.

NAHAIE, M. R. *et al.* Polar lipid and isoprenoid quinone composition in the classification of Staphylococcus. **Journal of General Microbiology** v. 130, n. 9, p. 2427–2437, 1984.

NASCIMENTO, A. *et al.* Purification, characterization and homology analysis of ocellatin 4, a cytolytic peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus ocellatus*. **Toxicon** v. 50, n. 8, p. 1095–1104, 2007.

NASCIMENTO, A. C. *et al.* Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. **Protein & Peptide Letters** v. 10, n. 3, p. 227–238, 2003.

NASCIMENTO, A. C. *et al.* Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). **Protein Journal** v. 23, n. 8, p. 501–508, 2004.

NASCIMENTO, A. C. C. **Avaliação biológica da secreção cutânea da rã *Leptodactylus ocellatus*: peptídeos citolíticos e proteases**. 2007. 61 p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products** v. 70, n. 3, p. 461–477, 2007.

NIELSEN, S. L. *et al.* Structure–activity study of the antibacterial peptide fallaxin. **Protein Science** v. 16, n. 9, p. 1969–1976, 2007.

OGUIURA, Nancy *et al.* *In vitro* antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. **J Antibiot** v. 64, n. 4, p. 327–331, 2011.

OLSON, Loyd *et al.* Pseudin-2: An Antimicrobial peptide with low hemolytic activity from the skin of the paradoxical frog. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 288, n. 4, p. 1001–1005, 2001.

PADILLA, Emma *et al.* *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 54, n. 1, p. 177–183, 2010.

PAPO, Niv; SHAI, Yechiel. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? **Peptides** v. 24, n. 11, p. 1693–1703, 2003.

PARK, C. B. *et al.* A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. **FEBS Lett** v. 411, n. 2–3, p. 173–178, 1997.

PARK, Sangho *et al.* Structural study of novel antimicrobial peptides, nigrocins, isolated from *Rana nigromaculata*. **FEBS Letters** v. 507, n. 1, p. 95–100, 2001.

PARK, Y.; LEE, D. G.; HAHM, K. S. HP(2–9)-magainin 2(1–12), a synthetic hybrid peptide, exerts its antifungal effect on *Candida albicans* by damaging the plasma membrane. **Journal of Peptide Science** v. 10, n. 4, p. 204–209, 2004.

PESCHEL, Andreas *et al.* *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor Mprf is based on modification of membrane lipids with l-lysine. **The Journal of Experimental Medicine** v. 193, n. 9, p. 1067–1076, 2001.

PHOENIX, D. A. *et al.* The prediction of amphiphilic alpha-helices. **Current Protein and Peptide Science** v. 3, n. 2, p. 201–221, 2002.

PIERRE, Thierry N. *et al.* Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/opioid peptide precursors. **European Journal of Biochemistry** v. 267, n. 2, p. 370–378, 2000.

POKORNY, Antje; ALMEIDA, Paulo F. F. Kinetics of dye efflux and lipid flip–flop induced by δ -lysine in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic, α -helical peptides. **Biochemistry** v. 43, n. 27, p. 8846–8857, 2004.

PORAT, Y. *et al.* Acyl–substituted dermaseptin S4 derivatives with improved bactericidal properties, including on oral microflora. **Antimicrobial Agents & Chemotherapy** v. 50, n. 12, p. 4153–4160, 2006.

POUNY, Yehonathan *et al.* Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. **Biochemistry** v. 31, n. 49, p. 12416–12423, 1992.

POWELL, J. F. F. *et al.* Primary structure of solitary form of gonadotropin–releasing hormone (GnRH) in cichlid pituitary; three forms of GnRH in brain of cichlid and pumpkinseed fish. **Regulatory Peptides** v. 57, n. 1, p. 43–53, 1995.

ROLLINS-SMITH, L. A.; CONLON, J. M. Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. **Dev Comp Immunol** v. 29, n. 7, p. 589–598, 2005.

ROLLINS-SMITH, Louise A. *et al.* An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura:Leptodactylidae). **Regulatory Peptides** v. 124, n. 1–3, p. 173–178, 2005.

ROZEK, Tomas *et al.* The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. **European Journal of Biochemistry** v. 267, n. 17, p. 5330–5341, 2000.

SAI, Korrapati Purna *et al.* Tigerinins: Novel antimicrobial peptides from the Indian frog *Rana tigerina*. **Journal of Biological Chemistry** v. 276, n. 4, p. 2701–2707, 2001.

SCHIFFER, Marianne; EDMUNDSON, Allen B. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. **Biophysical Journal** v. 7, n. 2, p. 121–135, 1967.

SCHMIDTCHEN, A. *et al.* Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. **Mol Microbiol** v. 46, n. 1, p. 157–168, 2002.

SCHMIDTCHEN, A.; FRICK, I. M.; BJORCK, L. Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial alpha-defensin. **Mol Microbiol** v. 39, n. 3, p. 708–713, 2001.

SHAFER, W. M. *et al.* Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. **Proc Natl Acad Sci U.S.A** v. 95, n. 4, p. 1829–1833, 1998.

SHAI, Yechiel. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Peptide Science** v. 66, n. 4, p. 236–248, 2002.

SHALEV, D. E. *et al.* Consequences of N-acylation on structure and membrane binding properties of dermaseptin derivative K4-S4-(1–13). **J Biol Chem.** v. 281, n. 14, p. 9432–9438, 2006.

SHALEV, Deborah E.; MOR, Amram; KUSTANOVICH, Irina. Structural consequences of carboxyamidation of dermaseptin S3. **Biochemistry** v. 41, n. 23, p. 7312–7317, 2002.

- SIMMACO, M. *et al.* Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. **Journal of Biological Chemistry** v. 269, n. 16, p. 11956–11961, 1994.
- SIMMACO, Maurizio *et al.* Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta*. **FEBS Letters** v. 324, n. 2, p. 159–161, 1993.
- SIMMACO, Maurizio *et al.* Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. **European Journal of Biochemistry** v. 242, n. 3, p. 788–792, 1996.
- SONNEVEND, Agnes *et al.* Antimicrobial properties of the frog skin peptide, ranatuerin-1 and its [Lys-8]–substituted analog. **Peptides** v. 25, n. 1, p. 29–36, 2004.
- SPELLBERG, Brad *et al.* Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. **Clinical Infectious Diseases** v. 38, n. 9, p. 1279–1286, 2004.
- SUGIMURA, K.; NISHIHARA, T. Purification, characterization, and primary structure of *Escherichia coli* protease VII with specificity for paired basic residues: identity of protease VII and OmpT. **The Journal of Bacteriology** v. 170, n. 12, p. 5625–5632, 1988.
- THE UNIPROT CONSORTIUM. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Research** v. 40, n. D1, p. D71–D75, 2012.
- THOMPSON, Alan Hunter *et al.* Amphibian skin secretomics: application of parallel Quadrupole Time-of-Flight mass spectrometry and peptide precursor cDNA cloning to rapidly characterize the skin secretory peptidome of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*: discovery of a novel peptide family, the Hyposins. **Journal of Proteome Research** v. 6, n. 9, p. 3604–3613, 2007.
- TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers** v. 55, n. 1, p. 4–30, 2000.
- ULVATNE, Hilde *et al.* Proteases in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 50, n. 4, p. 461–467, 2002.
- VANCOMPERNOLLE, S. E. *et al.* Antimicrobial peptides from amphibian skin potently inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells. **J Virol.** v. 79, n. 18, p. 11598–11606, 2005.
- WALLACE, James; HARRIS, Frederick; PHOENIX, David. A statistical investigation of amphiphilic properties of C-terminally anchored peptidases. **European Biophysics Journal** v. 32, n. 7, p. 589–598, 2003.

WANG, Z.; WANG, G. APD: The Antimicrobial Peptide Database. **Nucleic Acids Research** v. 32, n. Database issue, p. D590–D592, 2004.

WHITE, Stephen H.; WIMLEY, William C. Membrane protein folding and stability: physical principles. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure** v. 28, n. 1, p. 319–365, 1999.

WOODHAMS, D. C. *et al.* Population trends associated with skin peptide defenses against chytridiomycosis in Australian frogs. **Oecologia**. v. 146, n. 4, p. 531–540, 2006a.

WOODHAMS, D. C. *et al.* Predicted disease susceptibility in a Panamanian amphibian assemblage based on skin peptide defenses. **J Wildl.Dis.** v. 42, n. 2, p. 207–218, 2006b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Report on Infectious Diseases. Overcoming Antimicrobial Resistance.** Disponível em: http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/other_versions/index-rpt2000_text.html. Acesso em: 21-10-2009.

WU, Manhong *et al.* Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biochemistry** v. 38, n. 22, p. 7235–7242, 1999.

XING, Hongyan *et al.* Increased pathogen resistance and yield in transgenic plants expressing combinations of the modified antimicrobial peptides based on indolicidin and magainin. **Planta** v. 223, n. 5, p. 1024–1032, 2006.

YEAMAN, M. R. *et al.* Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. **The Journal of Clinical Investigation** v. 101, n. 1, p. 178–187, 1998.

YEAMAN, Michael R.; YOUNT, Nannette Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews** v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. *Immunocontinuum*: perspectives in antimicrobial peptide mechanisms of action and resistance. **Protein Pept.Lett** v. 12, n. 1, p. 49–67, 2005.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **"Proceedings of the National Academy of Sciences, USA"** v. 84, n. 15, p. 5449–5453, 1987.

ZASLOFF, Michael. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature** v. 415, n. 6870, p. 389–395, 2002.

ZHOU, Zhimin *et al.* Lipid A Modifications characteristic of *Salmonella typhimurium* are induced by NH_4VO_3 in *Escherichia coli* K12. **Journal of Biological Chemistry** v. 274, n. 26, p. 18503–18514, 1999.