



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



**Identificação, purificação e caracterização de peptídeos
antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro
*Hypsiboas raniceps***

Aluno: Diego Alejandro Falico

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Brasília/DF

2014

Diego Alejandro Falico

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

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

2014



Diego Alejandro Falico

Título:

“Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*”

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Mariana de Souza Castro
Presidente
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília

Dra. Betânia Ferraz Quirino
Membro Titular
Embrapa Agroenergia

Profa. Dra. Aline Lima de Oliveira
Membro Titular
Instituto de Química

Profa. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Membro Suplente
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília

“Creio que a essência da vida consiste em ser fiel ao que acredito que seja meu destino.”

Ernesto Sabato (1911-2011)

“A ignorância gera mais confiança que o próprio conhecimento. São aqueles que pouco sabem, e não aqueles que muito sabem, quem tão positivamente afirmam que este ou aquele problema nunca serão resolvidos pela ciência.”

Charles Darwin (1809-1882)

**Dedico esta tese aos meus pais (Gladys e Osvaldo) e ao meu irmão (Martin), por terem me apoiado sempre, por terem confiado em mim e por me levantarem nos momentos mais difíceis da vida.
Muito obrigado por serem minha família.**

**Dedico esta tesis a mis padres (Gladys y Osvaldo) y a mi hermano (Martin), por haberme apoyado siempre, por haber confiado en mi, y haberme levantado en los momentos mas difíciles de la vida.
Muchas gracias por ser mi familia.**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra Mariana de Souza Castro por ter me dado a oportunidade de trabalhar com ela, pela confiança em mim depositada e pelo apoio durante estes dois anos.

Ao Prof. Osmino Rodrigues Pires Jr. pelas orientações, dicas, conversas e apoio técnico e pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro que garantiu o desenvolvimento desse projeto.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, a sua coordenadora, Profa. Dra Carolina Madeira Lucci, e às secretárias Danielle e Ana Paula pela imensa paciência, colaboração e eficiência.

À minha mãe Gladys, por ter confiado, apoiado e acompanhado sempre, sendo um exemplo a seguir e a luz que ilumina a minha vida.

Ao meu pai Osvaldo, por ter me dado conselhos importantes e por sempre ter me apoiado nas minhas escolhas na vida.

Ao meu irmão, pelo simples fato de ser meu irmão, pelas dicas e porque seu exemplo é fonte de inspiração pra mim.

À minha tia Celia porque suas palavras foram meu incentivo

Aos meus primos e priminhos (Celeste, Ruben, Mariela, Andrea, Ivan, Roxana, Mari, Jose Luis, Paulina, e Faustina).

À minha afiliada Renata.

A minha cunhada Natali.

Aos meus amigos Argentinos da Vida (Flaco, Sebas, Chumpy, Cesar, Coco, Elias, Mariana, Paola, Dariela, Gonzalo, German, Fabri, Pablo.), obrigado por serem meus amigos e fazerem minha vida melhor por ter sua companhia.

Aos meus amigos e colegas de laboratório na Argentina Javier Lopez (ex-orientador e amigo), Blas, Romi, Caro, Negro, Martin, Adolfo, Danilo, obrigado por terem me ajudado com seus conhecimentos técnico-acadêmicos ou simplesmente com conselhos e recomendações

Quero agradecer especialmente aos colegas de laboratório Cesar, Harry, Claudia, Beatriz, Rosa, Andréa, Aline Chagas, Anne, Ana Carolina Martins Magalhães (Aninha), Thalita, Carol, Cleydson, Adolfo, Washington,

Dona Maria, Fabiano, Aline Barbosa Guimarães, Jaques, Leandro, Nuno, e tantos outros por terem me ajudado com seus conhecimentos, na execução de experimentos e por serem meus colegas e companheiros durante estes anos.

À minha super amiga-irmã Karla Montenegro e sua mãe, por tudo o que fizeram por mim nestes dois anos.

A todos os que de alguma ou outra forma fizeram parte de minha vida.

A Deus.

APOIO FINANCEIRO

A dissertação de mestrado intitulada “Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*” desenvolvida por Diego Alejandro Falico sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq (processos no. 563972/2010-6, Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRÓ-CENTRO-OESTE nº 31/2010, no. 302925/2012-0, Produtividade em Pesquisa - PQ – 2012 e no. 407801-2013, Rede Centro-Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação - REDE PRÓ-CENTRO-OESTE), da FAPDF (processo no 193.000.461/2011, Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRÓ-CENTRO-OESTE nº 31/2010), da CAPES por meio da concessão de bolsa de estudos (nível mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

RESUMO

O estudo de novas fontes de compostos bioativos permitiu o desenvolvimento de muitos produtos biotecnológicos, incluindo drogas com importantes atividades biológicas, muitas das quais são usadas atualmente no tratamento de doenças relevantes, especialmente de natureza infecciosa. No presente trabalho, foi realizada uma varredura por peptídeos com atividade antifúngica a partir da secreção cutânea da rã brasileira *Hypsiboas raniceps*. Indivíduos adultos de *H. raniceps* foram coletados no estado de Goiás, Brasil. As secreções cutâneas foram obtidas por meio de estimulação elétrica moderada, congeladas, secas e fracionadas por HPLC empregando-se coluna de fase reversa C₁₈. Todas as frações cromatográficas foram testadas quanto à capacidade de inibir a proliferação do fungo *Candida albicans* e as frações ativas foram analisadas por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS). O perfil cromatográfico resultou em cerca de 30 frações, oito das quais promoveram redução na proliferação do fungo *C. albicans* acima de 25%. As frações com atividade antifúngica apresentaram componentes de massa molecular variando entre 1000 e 3000 Da. As frações 27 e 28 foram as mais ativas, mas a análise por MS revelou a presença de vários componentes nessas frações. A fração 28 foi selecionada e submetida a um passo cromatográfico adicional, levando à obtenção do peptídeo bioativo presente nessa fração. O peptídeo HR 36 puro foi acumulado e testado contra o fungo *C. albicans*. Este novo peptídeo apresenta massa molecular igual a 3 kDa e é capaz de inibir a proliferação de *C. albicans* na concentração de 128 µM em 50%. No presente estudo, foi constatada que a secreção cutânea de *H. raniceps* é uma fonte de peptídeos antifúngicos e um novo peptídeo antifúngico de 3 kDa foi obtido em alto grau de pureza de modo a permitir a sua caracterização biológica e química.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, FINEP, FAPDF e FUB-UnB.

ABSTRACT

The study of new sources of bioactive compounds allowed the development of many biotechnological products, including drugs with important biological activities, many of which are used today for the treatment of relevant diseases, especially those of infectious nature. In the present study we performed a screening for peptides with antifungal activity from the skin secretion of the Brazilian frog *Hypsiboas raniceps*. Adult specimens of *H. raniceps* were collected in Goiás, Brazil. Skin secretions were obtained by mild electric stimulation, freeze-dried and fractionated by HPLC using a C₁₈ reversed-phase column. All fractions were tested for inhibitory activity against the fungus *Candida albicans*, and the bioactive fractions were submitted to mass spectrometric analysis (MALDI-TOF MS). The typical chromatographic profile showed approximately 30 fractions, eight of which promoted reduction in yeast cell proliferation above 25%. The antifungal fractions showed molecular mass components ranging from 1000 to 3000 Da. Fractions 27 and 28 were the most active but the MS analysis revealed multiple components present in these fractions. Fraction 28 was selected and submitted to an additional chromatographic step in order to obtain the major bioactive peptide present in this sample. Peptide HR 36 was accumulated and tested against *C. albicans*. This new peptide has a molecular mass of 3 kDa and is able to inhibit the proliferation of *C. albicans* at 128 μ M in 50%. It was observed that *H. raniceps* skin secretion is a source of antifungal peptides and one new 3 kDa antifungal peptide was obtained in high-purity which will allow in its biological and chemical characterization

Financial Support: CNPq, CAPES, FINEP, FAPDF and FUB-UnB.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs – Absorvância.

ACN – Acetonitrila.

AFP – Peptídeo antifúngico

AMB – Anfotericina B

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – Trifosfato de adenosina

BHI – *Brain Heart Infusion*

Da – Dalton

FDA – *United States Food and Drug Administration*

HCCA – Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

MALDI-TOF MS – *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*

MIC – Concentração inibitória mínima

PAM – Peptídeo antimicrobiano

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

TFA – Ácido trifluoroacético

UFC – Unidade formadora de colônia

ÍNDICE

Tópico	Página
INTRODUÇÃO	1
Os anfíbios: características gerais	1
Os anfíbios nas diversas culturas	2
A pele dos anfíbios como fonte de compostos biologicamente ativos	3
Antibióticos e a resistência bacteriana	4
Peptídeos antimicrobianos (PAMs)	5
Especificidade celular dos PAMs	6
Estrutura e modo de ação dos PAMs	6
Infecções causadas por fungos: candidíases	10
A terapêutica antifúngica – um breve histórico	13
Estrutura e modo de ação dos peptídeos antifúngicos	15
Descrição da espécie em estudo	17
JUSTIFICATIVA	19
OBJETIVO GERAL	21
METAS ESTABELECIDAS	21
MATERIAIS E MÉTODOS	22
Reagentes Químicos	22
Coleta dos espécimes e extração da secreção cutânea de <i>H. raniceps</i>	22
Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de <i>H. raniceps</i>	22
Ensaio de varredura para identificar frações cromatográficas capazes de inibir a proliferação do fungo patogênico <i>Candida albicans</i>	23
Análises por espectrometria de massas	24
Purificação do peptídeo bioativo de interesse	24
Determinação da atividade inibitória mínima (MIC) para o fungo <i>Candida albicans</i>	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
CONCLUSÃO	39
PERSPECTIVAS	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Tipos de glândulas presentes na pele dos anfíbios.	2
Figura 2. Modelo <i>carpet-like</i>.	7
Figura 3A. Modelo <i>barrel-stave</i>. Figura 3B. Modelo do poro toroidal	9
Figura 4. Modelo <i>Shai-Matsuzaki-Huang</i>.	10
Figura 5. Indivíduo adulto de <i>Hypsiboas raniceps</i>.	17
Figura 6. Distribuição geográfica (zona amarela) da espécie <i>Hypsiboas raniceps</i>.	18
Figura 7. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea bruta de <i>H. raniceps</i> ressaltando com as setas as frações com atividade antiproliferativa sobre <i>Candida albicans</i>.	27
Figura 8. Avaliação dos efeitos inibitórios sobre a proliferação da levedura <i>C. albicans</i> (ensaio de varredura) da incubação com as frações cromatográficas obtidas com o fracionamento por RP-HPLC da secreção cutânea de <i>H. raniceps</i>.	28
Figura 9. Espectro de massas da fração 27 obtida com o fracionamento da secreção cutânea de <i>H. raniceps</i> em coluna C₁₈ (matriz: HCCA; MALDI-TOF MS).	29
Figura 10. Espectro de massas da fração 28 obtida com o fracionamento da secreção cutânea de <i>H. raniceps</i> em coluna C₁₈ (matriz: HCCA; MALDI-TOF MS).	30
Figura 11. Perfil cromatográfico resultante da recromatografia da fração 28 em coluna C₁₈ da Phenomenex.	32
Figura 12. Espectro de massas da fração com tempo de retenção de 36,5 min obtida com recromatografia da fração 28 em coluna C₁₈ (matriz: HCCA; MALDI-TOF MS).	33
Figura 13. Efeito da incubação de doses crescentes do peptídeo HR 36 sobre a proliferação do fungo patogênico <i>Candida albicans</i>.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1. Principais drogas antifúngicas utilizadas na terapêutica atual.	15
Tabela 2. Estruturas primárias e massas moleculares das ranaseptinas e dos peptídeos processados.	31

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps***INTRODUÇÃO*****Os anfíbios: características gerais***

O surgimento dos anfíbios aconteceu durante o período Devoniano, entre 300 a 250 milhões de anos atrás quando este grupo de vertebrados adquiriu a capacidade de viver tanto na água quanto na terra (Pough *et. al.*, 2003).

A classe Amphibia contém, segundo dados da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN REDLIST, 2012), cerca de 6.374 espécies vivas descritas, divididas entre as ordens Ápoda (cecílias), Caudata (salamandras) e Anura (sapos e rãs).

O grupo dos Anuros ou Salientia é constituído por animais que apresentam corpo curto e truncado, sendo providos de quatro membros com os membros posteriores mais longos. Os indivíduos adaptados para uma locomoção saltatória são chamados geralmente de “pererecas” (tupi; originado de *pere’reg*, “ir aos saltos”). Estes animais são arborícolas, com ventosas nos dedos. Os indivíduos da família dos hilídeos (alvo do presente estudo) são pererecas; mas existem também outros dois grupos denominados comumente de rãs e sapos (Sokol, 1977, Sebben & Schwartz, 1993).

Segundo dados da Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2012), o território brasileiro abriga a maior diversidade de anfíbios do planeta possuindo cerca de 15% (em torno de 956 espécies) das espécies conhecidas.

É interessante destacar que os anfíbios, como animais de transição entre dois ambientes, apresentam inúmeras características adaptativas, dentre as quais se destaca o seu tegumento. A pele dos anfíbios representa uma de suas maiores adaptações tanto anatômicas como fisiológicas, exercendo diversas funções, tais como: proteção contra abrasão, respiração cutânea, osmorregulação, termorregulação e secreção de substâncias protetoras (Nascimento *et al.*, 2003).

Anatomicamente, os anfíbios possuem dois tipos de glândulas na pele: as glândulas mucosas e as glândulas granulosas (Figura 1). As glândulas

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

mucosas, menores e em maior número, são responsáveis por manter a pele úmida e escorregadia por meio da secreção de mucinas. Enquanto as glândulas granulosas (maiores e em menor número), também chamadas de glândulas de veneno, localizadas principalmente no dorso do animal são responsáveis pela produção, armazenamento e liberação de compostos bioativos, como os peptídeos antimicrobianos, PAMs (Toledo e Jared, 1995).

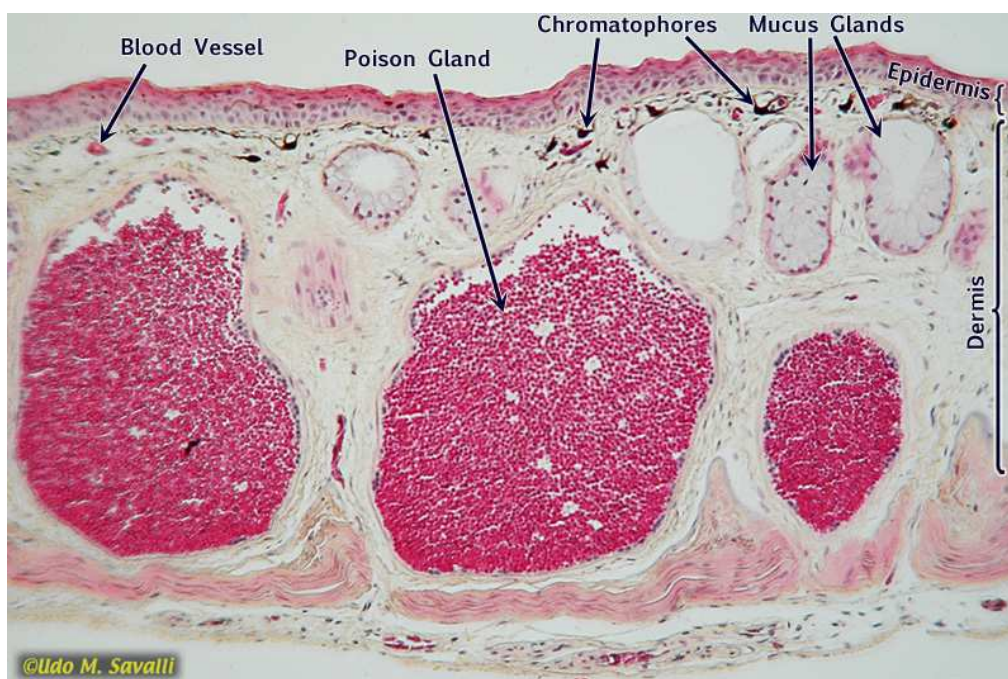


Figura 1. Tipos de glândulas presentes na pele dos anfíbios. Glândulas mucosas, responsáveis por manter a pele úmida e pela secreção de mucinas e as glândulas granulosas, responsáveis pela produção, armazenamento e liberação de compostos bioativos. Blood vessel: vaso sanguíneo; poison gland: glândula de veneno (glândula granulosa); chromatophores: cromatóforos; mucus gland: glândula mucosa; epidermis: epiderme; dermis: derme. Imagem retirada de <http://www.savalli.us/BIO370/Anatomy/4.FrogSkinLabel.html>.

Os anfíbios nas diversas culturas

Muitas culturas vêem os anfíbios como entidades com poderes divinos de regeneração, renovação, renascimento e fertilidade. No antigo Egito, os anfíbios eram considerados um sinal de abundância de água e, ao mesmo tempo, de fertilidade. Os Astecas chamavam o sapo de *Tlaltecuhiti* (deusa

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

mãe-terra), responsável por governar o ciclo de vida e morte e também o renascimento.

Há muito tempo que os anuros habitam o imaginário popular, povoando fábulas e crendices, principalmente no que se refere às propriedades farmacológicas de sua secreção. Em muitos casos, estes mitos têm algum fundo de verdade, uma vez que algumas espécies contêm compostos tanto tóxicos como alucinógenos.

Muitas tribos das Américas do Sul e Central usavam a secreção da pele de rãs e sapos como alucinógenos em seus rituais religiosos e de caça, como é o caso dos índios da Amazônia colombiana que utilizam as secreções de um anuro endêmico da espécie *Phyllobates terribilis* para envenenar seus dardos e usá-los na imobilização de presas como macacos durante a caça. Índios da Amazônia brasileira utilizam as secreções de diferentes espécies de *Phyllomedusa* em um ritual conhecido como “Kambô” ou “Vacina de sapo” (Wade & Weil, 1994).

A pele dos anfíbios como fonte de compostos biologicamente ativos

O homem, ao longo da história, teve a oportunidade de aproveitar os diversos e múltiplos benefícios de produtos produzidos por plantas e animais. Mais recentemente, essas fontes naturais têm sido empregadas no desenvolvimento de inúmeros produtos industriais e biotecnológicos, dentre os quais podem ser incluídos fármacos empregados no controle e tratamento de diversas doenças relevantes, principalmente aquelas de natureza infecciosa. Merece destaque que o estudo mais aprofundado dessas fontes biológicas permitiu um melhor conhecimento acerca da história natural dos organismos que produzem tais compostos (Clarke, 1997; Newman *et al.*, 2007).

Alguns desses compostos biologicamente ativos, os peptídeos antimicrobianos, foram isolados de anuros e de diversos outros organismos, sendo alvo de estudos visando o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, como pode-se observar pelo número crescente de publicações

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

na área relacionadas com isolamento e caracterização química e biológica dessas moléculas, assim como estudos voltados para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas e antitumorais. Assim, os PAMs representam uma alternativa interessante às práticas terapêuticas atuais em virtude de suas características excepcionais, como ação imediata e baixa toxicidade sobre células de mamíferos (Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

Antibióticos e a resistência bacteriana

A penicilina G foi descoberta em 1929 por Alexander Fleming e introduzida como agente terapêutico a partir de 1940 logo após o começo da Segunda Guerra Mundial. A partir da descoberta da penicilina, um grande número de novos antibióticos foram isolados e produzidos em escala industrial. Segundo dados da base de dados “The Antimicrobial Peptide Database” (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php> acessado em 6 de janeiro de 2014), os peptídeos antimicrobianos conhecidos até o momento são 2.353 dos quais 215 foram isolados de bactérias, 305 de plantas, 12 de fungos e 1.773 de animais, dentre outros. Os peptídeos antifúngicos conhecidos até o momento perfazem um total de 859 isolados de diferentes grupos de organismos.

O acesso aos antibióticos aliado ao seu uso indiscriminado acelerou o surgimento de cepas resistentes aos antibióticos empregados, representando um sério problema de saúde pública (Park *et al.*, 2011). Um exemplo que evidencia tal problemática é o caso da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), cujo primeiro registro de sua ocorrência data de 1961, apenas dois anos após a introdução da meticilina no tratamento de pacientes infectados com cepas de *S.aureus* resistentes à penicilina (Enright *et al.*, 2002).

O surgimento de cepas bacterianas das espécies *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* produtoras de enzimas capazes de hidrolizar antibióticos carbapenêmicos conferiu resistência a uma grande variedade de antibióticos comercialmente disponíveis (Queenan & Bush, 2007; Villegas *et al.*, 2007; Hirsch & Tam, 2010).

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps****Peptídeos antimicrobianos (PAMs)***

Ao longo dos últimos 25 anos, os anuros se consolidaram como uma fonte riquíssima de peptídeos antimicrobianos (PAMs), tendo sido descritas até uma centena de peptídeos com esta atividade em uma única espécie (Li, 2007).

Historicamente, o primeiro peptídeo citolítico identificado em anuros foi a bombinina isolada por Csordás e Michl (1969) da espécie *Bombina variegata*. No entanto foi somente com o trabalho de Zasloff publicado em 1987 relatando a descoberta das magaininas presentes na secreção da pele da rã africana *Xenopus laevis* que essas moléculas levantaram o interesse da comunidade acadêmica como uma alternativa terapêutica viável frente à crise dos antibióticos.

Até o momento foram identificados e caracterizados centenas de peptídeos antimicrobianos de anuros ("The Antimicrobial Peptide Database" - <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Esse grupo de peptídeos biologicamente ativos faz parte do sistema imune inato, constituindo-se em um arsenal imediatamente disponível de modo a afetar negativamente a proliferação de bactérias, fungos filamentosos, leveduras e, algumas vezes, vírus, protozoários e células tumorais (Ganz & Lehrer, 1998; Bulet *et al.*, 2004, Brown & Hancock, 2006; Conlon, 2011).

Os PAMs apresentam estruturas primárias bastante diversificadas. No entanto, a maioria deles compartilha características físico-químicas comuns como, por exemplo, carga positiva líquida, cadeia peptídica formada por 10 a 46 resíduos de aminoácidos) e estrutura tridimensional em forma de α -hélice anfipática assumida em meios apolares (Nicholas *et al.*, 2003). Acredita-se que tais características comuns podem ser essenciais para sua ação inibitória sobre o crescimento de microorganismos (Brand *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 2008).

Também existem algumas características que tornam o uso dos PAMs como agentes anti-infecciosos limitado, como sua pequena meia-vida na circulação. A síntese de peptídeos contendo D-aminoácidos, cuja degradação

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

por enzimas plasmáticas é menor, é sugerida como uma alternativa ao seu uso sistêmico (Mangoni *et al.*, 2006).

Em geral, os PAMs agem produzindo perturbações na membrana bacteriana por interações eletrostáticas e hidrofóbicas, levando a formação de poros (Kim & Cha, 2010) e desestabilizando as membranas biológicas (Meincken *et al.*, 2005; Mecke *et al.*, 2005; Sahl *et al.*, 2005). A atração eletrostática entre os PAMs e as membranas bacterianas é favorecida pela presença de fosfatidilglicerol, fosfatidilserina e cardiolipina, os quais conferem uma carga global negativa às membranas bacterianas. Além desses fosfolipídeos, bactérias Gram-negativas apresentam lipopolissacarídeos (LPSs) e as Gram-positivas, ácidos teicóicos e teicurônicos, conferindo carga negativa adicional (Matsuzaki *et al.*, 1991).

Especificidade celular dos PAMs

Entende-se por especificidade celular, a capacidade dos PAMs de permeabilizar seletivamente as membranas de microrganismos, principalmente procariontes. Tal efeito é devido às diferenças na composição lipídica entre as membranas das células eucarióticas e procarióticas, sendo que as membranas de eucariontes tem carga neutra ou “zwitteriônica” e as membranas bacterianas são negativamente carregadas (Devaux, 1991; Zasloff, 2002).

Estrutura e modo de ação dos PAMs

Estruturalmente, os peptídeos antimicrobianos dos anuros pertencem a duas classes distintas, os lineares com estrutura α -helicoidal, sem cisteínas, e os peptídeos com um ponte dissulfeto formando um *loop* C-terminal. Em qualquer um dos casos, os PAMs de anuros tendem a adotar uma estrutura α -helicoidal em ambientes hidrofóbicos (Bulet *et al.*, 2004).

Os peptídeos lineares são citolíticos e anfipáticos, podendo atuar de diferentes formas:

1– Interagindo somente na superfície da membrana plasmática promovendo sua desestabilização como o modelo *carpet-like* sugere (Brogden,

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

2005). Segundo este modelo, as moléculas de peptídeo saturam a superfície da membrana ligando-se às cabeças dos fosfolipídios. Após o alinhamento dos monômeros, de modo que as suas superfícies hidrofílicas estejam em contato com as cabeças fosfolipídicas ou com as moléculas de água, ocorre a reorientação dos resíduos hidrofílicos em direção ao centro hidrofóbico da membrana sem perderem o contato com as cabeças dos fosfolipídios. De acordo com vários autores, o modelo *carpet-like* explica a desagregação da membrana através da quebra da integridade da sua curvatura (Brogden, 2005) (Figura 2).

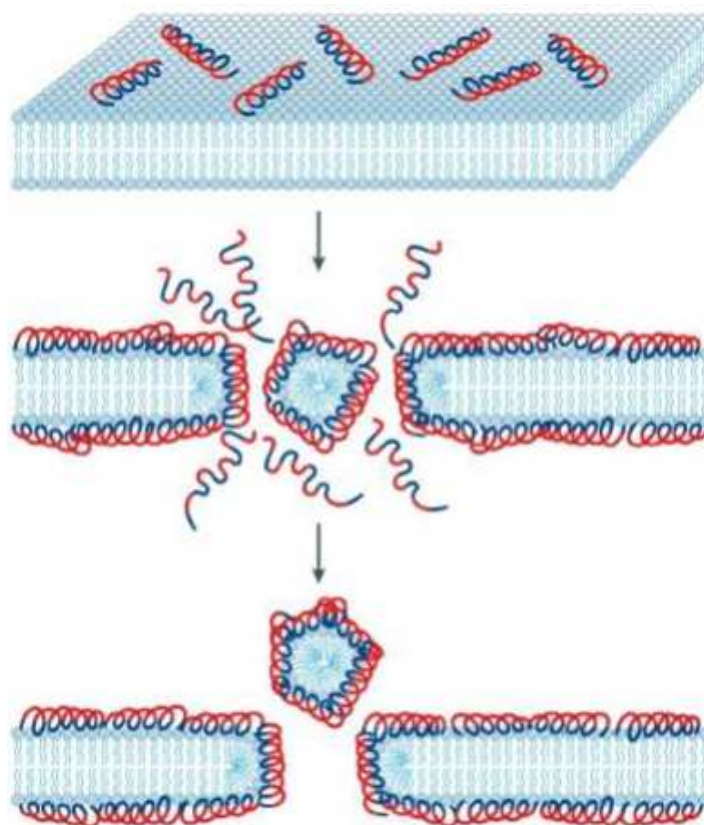


Figura 2. Modelo *carpet-like*. Ligação dos peptídeos aos fosfolipídios da membrana; alinhamento dos monômeros de peptídeo ficando os resíduos hidrofílicos em contato com as cabeças dos fosfolipídios; reorientação dos peptídeos para o centro hidrofóbico da membrana; desintegração da membrana devido a quebra da sua curvatura (Retirado de Brogden, 2005).

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

2- Também podem atuar formando poros, permitindo a passagem de íons e outros solutos (Hancock & Sahl, 2006). Esse mecanismo é mais comumente conhecido como *barrel-stave* e envolve a ligação e inserção perpendicular de monômeros de peptídeos com estrutura em α -hélice anfipática na membrana formando poros, ou seja, sua superfície hidrofóbica interage com o núcleo lipídico da membrana e a sua face hidrofílica reveste o centro do barril, formando um poro aquoso (Figura 3). Esse é o modelo de modo de ação sobre células bacterianas e de mamíferos mais aceito para peptídeos citolíticos (Conlon *et al.*, 2007).

Para que o tamanho do poro possa aumentar é necessário o recrutamento de novos monômeros. A formação do poro leva ao vazamento do conteúdo celular e, conseqüentemente, à morte da célula. Visto que não é energeticamente favorável a inserção de uma única α -hélice anfipática, o recrutamento de monômeros é crucial para a estabilização do poro (Hancock & Chapple, 1999; Shai, 1999; Nascimento *et al.* 2003; Reddy *et al.*, 2004).

O modelo chamado de poro toroidal é um tipo particular do modelo mencionado acima (modelo *barrel-stave*). Nesse modelo, as interações entre os peptídeos com os grupos lipídicos da membrana plasmática são mais fortes. Os peptídeos em α -hélice orientam-se paralelamente à membrana e, após atingirem um limiar de concentração, inserem-se perpendicularmente na camada lipídica. Todavia a ligação entre os monômeros e os lipídios não são quebradas durante a reorganização da camada lipídica (Figura 4) (Nascimento *et al.* 2003; Brogden, 2005). Um exemplo de peptídeo antimicrobiano que utiliza esse mecanismo de ação é a magainina isolada da rã africana *Xenopus laevis*.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

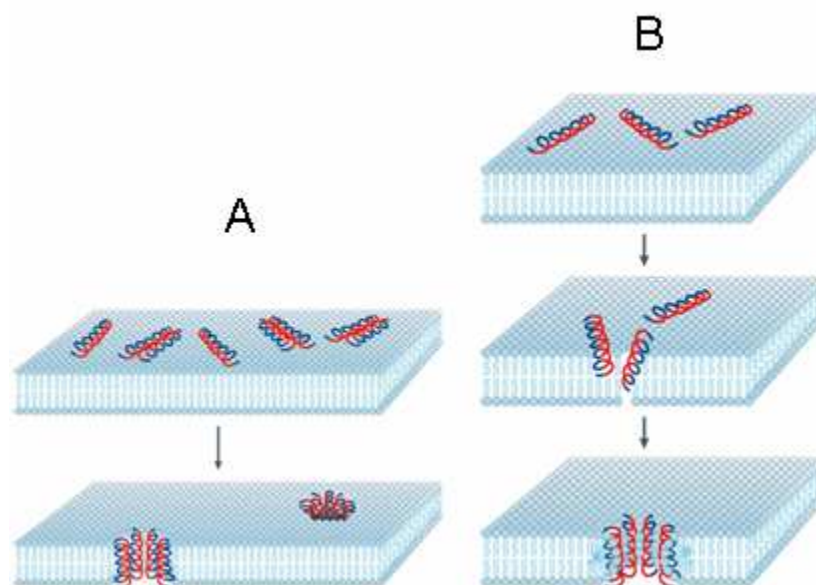


Figura 3A. Modelo barrel-stave. Peptídeos ligados à membrana com conformação em α -hélice; ligação de mais peptídeos à membrana; as hélices são inseridas na bicamada lipídica com formação do poro por onde ocorre o vazamento do material citoplasmático, seguida da morte celular. **Figura 3B. Modelo do poro toroidal.** Os peptídeos interagem fortemente com os componentes hidrofóbicos da membrana plasmática durante a formação do poro. O vermelho das hélices (peptídeos) representa a face hidrofílica e o azul, a hidrofóbica (Retirado de Brogden, 2005).

3– Interagindo com moléculas intracelulares como DNA ou enzimas e alterando o funcionamento normal da célula (Hancock & Chapple, 1999; Zasloff, 2002). Um último mecanismo denominado modelo de Shai-Matsuzaki-Huang envolve a formação de carpete e de poro pela adesão de moléculas de peptídeos à membrana externa dos microorganismos, causando o seu adelgaçamento. A bicamada é esticada causando a formação de poros, os quais permitem a passagem dos peptídeos que podem se difundir para o citoplasma celular, atingindo possíveis alvos intracelulares. Por último, a membrana tem a sua integridade perdida (Figura 4) (Zasloff, 2002; Nascimento *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2004).

Os peptídeos translocados, uma vez no citoplasma, podem alterar a formação do *septum* da membrana citoplasmática, inibir a atividade enzimática inibir a síntese da parede celular, promover perda de ATP, alterar a renaturação de proteínas, dentre outros mecanismos (Brogden, 2005)

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

(Figura 4). Portanto, os PAMs podem matar a mesma espécie de patógeno por mais de um mecanismo de ação, dependendo de fatores individuais como fase de crescimento, localização tecidual, e a presença ou ausência de outros mecanismos imunes ou agentes antimicrobianos exógenos sinérgicos (Yeaman & Yount, 2003).

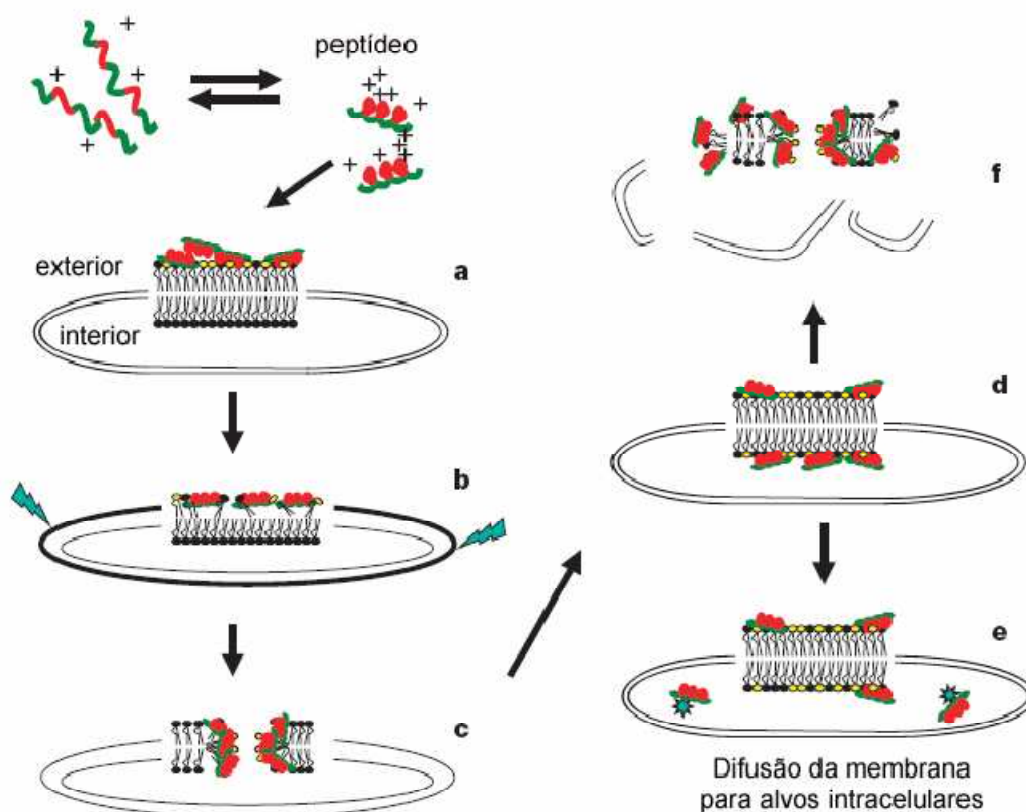


Figura 4. Modelo Shai-Matsuzaki-Huang. a) Formação de um carpete de peptídeos na camada externa da membrana. b) Integração do peptídeo à membrana e afinamento da camada externa. c) Formação de poros transitórios. d) Transporte de lipídios e peptídeos para a camada interna. e) Difusão dos peptídeos para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

Infecções causadas por fungos: candidíases

Segundo Arendrup *et al.* (2005) e Espinel-Ingroff *et al.* (2009), a incidência e prevalência de infecções por fungos invasivos tem sido incrementada desde a década de 80, especialmente na população de pacientes imunocomprometidos ou hospitalizados. Pfaller & Dickema (2010)

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

afirmam que a frequência de invasões por fungos infecciosos (candidemia) e a resistência a terapia antifúngica atualmente disponível continuam em crescimento.

A resistência antifúngica pode ser definida como uma resistência biológica (alteração na sensibilidade aos antifúngicos que pode ser determinada *in vitro* mediante técnicas de laboratório adequadas) ou uma resistência clínica (infecção persistente apesar da administração de um antifúngico em doses máximas) (Rex *et al.*, 1997), ou como uma composição dos dois (Turnidge & Paterson, 2007). O reconhecimento da resistência antifúngica é um importante problema de saúde pública (Johnson, 2008; Pappas *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, o número de relatos envolvendo infecções causadas por fungos sofreu um considerável aumento, isto, em parte, está relacionado com o crescimento da população de pacientes imunocomprometidos como consequência de diversas doenças ou transtornos como, por exemplo, AIDS, transplante de órgãos e terapia contra o câncer (Hong *et al.*, 1999; Fontenelle *et al.*, 2008; Ajesh & Sreejith, 2009).

Das cerca de 1,5 milhões de espécies fúngicas conhecidas, apenas algumas centenas estão associadas a infecções humanas, sendo 90% das infecções causadas por algumas cepas patogênicas, oportunistas e ainda alguns dermatófitos (Ajesh & Sreejith, 2009).

Espécies como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e algumas espécies de *Aspergillus* são os microorganismos mais relatados associados a infecções invasivas fúngicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006).

As infecções conhecidas como candidíases são causadas por fungos do gênero *Candida*, embora várias espécies de *Candida* sejam encontradas normalmente na microbiota oral, gastrointestinal e vaginal (Shao *et al.*, 2007). Estes microorganismos podem também ser responsáveis por manifestações de interesse clínico (Eggimann *et al.*, 2003).

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

A espécie *Candida albicans* é o fungo predominante nas infecções fúngicas em humanos (Horn *et al.*, 2009), representando um sério problema de saúde pública, como reflexos negativos na economia, incrementando os custos nos cuidados e na duração do período de hospitalização de pacientes (Almirante *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2012).

Segundo Tortorano *et al.* (2006), nos países europeus mais da metade dos casos de infecções fúngicas (candidemia) são causados por *C. albicans*. Nos Estados Unidos é a quarta causa de infecções da corrente sanguínea, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 50% (Zaoutis *et al.*, 2005; Pfaller & Dieckema, 2007).

No Brasil, dos casos de candidemia registrados, 40,9% foram causados por *C. albicans* (Colombo *et al.*, 2006; Nucci *et al.*, 2010).

Além disso, sabe-se que outras espécies são capazes de se associar com *C. albicans* aumentando assim sua patogenicidade (Sullivan *et al.*, 2004).

Acredita-se que a formação de biofilme pode ter um papel importante na maioria das doenças produzidas por *C. albicans* (Ramage & Lopez.Ribot, 2005; Martinez & Fries, 2010). A capacidade de *C. albicans* de formar biofilmes em dispositivos ou aparelhos médicos tem potencializado seus efeitos deletérios à saúde humana (Hawser & Douglas, 1994).

Segundo Finkel & Mitchell (2011), a formação de biofilmes causados por *C. albicans* é a maior causa de infecções em cateteres e segundo Nett *et al.* (2007) é a quarta causa de infecções da corrente sanguínea e terceira no caso de infecções do trato urinário.

A expansão da população imunocomprometida, o uso de cateteres intravenosos, aumento no número de procedimentos invasivos, de tratamentos de quimioterapia citotóxica e transplantes, podem contribuir aumentando o número de infecções promovidas por *Candida* (Ortega *et al.*, 2011). Também é observado que infecções causadas por *Candida* são as mais comuns dentre as infecções fúngicas que ocorrem em pacientes com AIDS (Fidel, 2006; Hasan *et al.*, 2009).

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps****A terapêutica antifúngica – um breve histórico***

A terapêutica antifúngica teve seu início em 1903 quando começou a ser utilizado o iodeto de potássio, sendo este, ainda hoje, bastante utilizado no tratamento da esporotricose tanto em homens como em animais. Em 1951, a nistatina, um derivado poliênico isolado de *Streptomyces noursei*, começou a ser usada no tratamento das infecções, causadas principalmente por *Candida* spp., na pele e mucosas (Sidrim & Rocha, 2004).

Alguns anos depois, entre 1956 e 1957, Gold *et al.* isolaram a anfotericina B (AmB) da bactéria *Streptomyces nodosus*, sendo este antifúngico o grande responsável pelos avanços no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas (Hann & Prentice, 2001), e ainda hoje empregado como o fármaco de escolha para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas mais graves (Sidrim & Rocha, 2004). Dependendo da dose utilizada, seus efeitos podem ser fungicida ou fungistático, sendo importante ressaltar que ao mesmo tempo em que a AmB se liga ao ergosterol na célula fúngica, apresenta também alta afinidade pelo colesterol (presente nas células de mamíferos), sendo tal afinidade a responsável pelos efeitos tóxicos desta droga.

Embora seja um agente fungicida de largo espectro, com pouca resistência intrínseca ou adquirida, o uso da AmB é bastante limitado, sendo isto agravado pela inexistência de uma formulação oral para o tratamento sistêmico (Chapman *et al.*, 2008). Três formulações lipídicas de AmB (complexo lipídico de anfotericina B, anfotericina B sulfato de colesterol e anfotericina B lipossomal) foram desenvolvidas e aprovadas pelo FDA nos últimos anos.

A AmB pode ser administrada sozinha ou com outras drogas (geralmente flucitosina), permitindo a diminuição da quantidade de AmB a ser administrada, com conseqüente diminuição de efeitos colaterais, sem causar prejuízo na sua resposta terapêutica (Sidrim & Rocha, 2004).

Em 1958, foi isolada a griseofulvina de *Penicillium griseofulvum*, um antifúngico que age penetrando na célula fúngica, através de um processo de transporte dependente de energia e, uma vez no núcleo, liga-se aos microtúbulos, interferindo na formação do fuso mitótico (Sidrim & Rocha, 2004).

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Até a presente data são conhecidas sete classes de drogas antifúngicas disponíveis no mercado (Quadro 1), de acordo com seus mecanismos de ação (Chapman *et al.*, 2008).

Apesar da existência de um número considerável de agentes antifúngicos, o tratamento convencional para doenças fúngicas ainda é limitado quando comparado à terapia antibiótica disponível (Fontenelle *et al.*, 2008). Em parte isto pode ser explicado pelo fato de os fungos, sendo organismos eucarióticos, compartilharem várias vias metabólicas e estruturas celulares com os mamíferos (Sidreim & Rocha, 2004). Além disso, as drogas conhecidas mencionadas no Quadro 1 apresentam propriedades microbiológicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas únicas, além de efeitos adversos e interações com outros medicamentos que limitam sua eficácia no tratamento das infecções fúngicas (Chapman *et al.*, 2008).

Os fatores mencionados acima, juntamente com a ocorrência de fenômenos de resistência às drogas utilizadas, vem incentivando a busca por novas drogas para o tratamento de infecções fúngicas (Giordani *et al.*, 2001; Fontenelle *et al.*, 2008). O grande desafio nos tempos atuais é o desenvolvimento de drogas específicas para a célula fúngica, não afetando o hospedeiro vertebrado (Debono & Gordee, 1994; Harris, 2002).

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Tabela 1. Principais drogas antifúngicas utilizadas na terapêutica atual (retirado de Chapman *et al.*, 2008).

Nome	Mecanismo de ação
Derivados poliênicos Anfotericina B (AmB) Formulações lipídicas da AmB Nistatina	Perturbação da membrana fúngica pela ligação ao ergosterol
Alilaminas Terbinafina	Redução da biosíntese de ergosterol pela inibição da esqualeno epoxidase
Derivados morfolínicos Amorolfina	Redução da biosíntese de ergosterol pela inibição de enzimas relacionadas ao citocromo P450
Análogos nucleosídeos Flucitosina	Inibição da biosíntese de DNA e RNA
Derivados azólicos Imidazóis Miconazol Cetoconazol Triazóis Fluconazol Itraconazol Voriconazol Posaconazol Ravuconazol	Redução da biosíntese de ergosterol pela inibição de enzimas relacionadas ao citocromo P450
Equinocardinas Micafungina Caspofungina Anidulafungina	Redução da biosíntese da parede celular fúngica por inibição da síntese de glucana
Outros Griseofulvina	Inibição da formação do fuso mitótico

Estrutura e modo de ação dos peptídeos antifúngicos

Os peptídeos antifúngicos (AFPs) são amplamente distribuídos podendo ser encontrados em bactérias, animais e plantas. As pesquisas com AFPs foi acelerada nos últimos anos permitindo um aumento crescente no número de AFPs conhecidos, assim como garantiu avanços no entendimento de seus modos de ação (Jessen *et al.*, 2006).

Os AFPs constituem um grupo representado por peptídeos com estruturas lineares ou cíclicas com propriedades hidrofóbicas ou anfipáticas. Em relação às estruturas primárias dos AFPs, assim como no caso dos

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

peptídeos antibacterianos, não existe um domínio estrutural conservado ao qual seja atribuída a atividade antifúngica dessas moléculas (Jessen *et al.*, 2006). Muitos peptídeos antifúngicos são capazes de formar α -hélice, o que poderia estar relacionado com sua habilidade em interagir com as cadeias laterais de lipídeos da membrana dos diferentes microorganismos, levando à disrupção da função da membrana interferindo com o balanço osmótico da célula (Goraya *et al.*, 1998).

As defensinas vegetais representam exemplos bem estudados de peptídeos antifúngicos com pontes dissulfeto. As defensinas vegetais possuem oito resíduos de cisteína ligados por pontes dissulfeto, que estabilizam uma estrutura formada por três folhas β -extendidas antiparalelas, com somente uma α -hélice (Bruix *et al.*, 1993; Bruix *et al.*, 1995; De Lucca & Walsh, 1999).

Também pode ser citado o peptídeo antimicrobiano gomesina, isolado da aranha *Acanthoscuria gomesiana*, com 18 resíduos de aminoácidos, apresentando quatro resíduos de cisteínas envolvidos em duas pontes dissulfetos, um ácido piroglutâmico na extremidade N-terminal e uma arginina α -amidada na porção C-terminal. A gomesina possui notável espectro de atividade biológica, apresentando forte atividade antibacteriana (contra bactérias Gram-positivas: 0,2-12,5 μ M e contra bactérias Gram-negativas: 0,4-6,25 μ M), além de inibir a proliferação de fungos filamentosos e leveduras, incluindo patógenos humanos de interesse clínico, em baixas concentrações (0,4-25 μ M) (Bulet *et al.*, 2004).

Em mamíferos, as α e β -defensinas são pequenas proteínas de cationicidade variável, anfipáticas (Ganz *et al.*, 1990), que adotam estrutura de β -folhas estabilizadas por três pontes dissulfeto (De Lucca & Walsh, 1999) e agem sobre microrganismos causando a formação de poros multiméricos, com conseqüente perda de minerais e metabólitos essenciais à célula (Lehrer *et al.*, 1985; White *et al.*, 1995).

No caso dos anfíbios, podemos destacar as magaininas, primeiros peptídeos antimicrobianos descritos, que apresentam um amplo espectro de ação, incluindo fungos (Zasloff, 1987).

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Além dos peptídeos naturais, a engenharia de peptídeos tem se mostrado uma opção importante no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. A fusão de partes da magainina 2 com cecropina A resultou em um peptídeo híbrido, P18, com potente atividade antifúngica contra *C. albicans*, *Trichosporum beigelli*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium oxysporum*, com MICs variando entre 12,5 e 25 μM (Lee *et al.*, 2004).

Descrição da espécie em estudo

A espécie *Hypsiboas raniceps* (Cope, 1862) (Figura 5) é uma rã neotropical comumente encontrada no Cerrado e na Caatinga (Arzabe 1999; Guimarães e Bastos, 2003), sendo a espécie mais difundida dentre as espécies do grupo *Hypsiboas albopunctatus*. No mapa representado pela figura 6 observa-se a distribuição dessa espécie na América do Sul, onde está evidenciada a sua ocorrência nas regiões Amazônica, Central e Nordeste do Brasil, no sul da Colômbia, na Guiana Francesa, na Amazônia Boliviana, no Paraguai e no nordeste da Argentina (Frost, 2009).



Figura 5. Indivíduo adulto de *Hypsiboas raniceps*. Foto: Javier Alejandro Lopez.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*



Figura 6. Distribuição geográfica (zona amarela) da espécie *Hypsiboas raniceps*. Imagem retirada de <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=55622>.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps***JUSTIFICATIVA**

A secreção da pele de muitas espécies de anuros contém um amplo leque de compostos biologicamente ativos, com potencial para o desenvolvimento de novas drogas (Rinaldi, 2002; Conlon *et al.*, 2004; Conlon *et al.*, 2007; Zaiou, 2007) e também na produção de plantas transgênicas de interesse comercial que sejam resistentes a diferentes patógenos. Vários trabalhos ao longo dos últimos 20 anos têm destacado o grande espectro de ação dos peptídeos antimicrobianos de anuros, sendo capazes de inibir a proliferação de bactérias, fungos, protozoários e, até mesmo, de alguns vírus (Chinchar *et al.*, 2001; Navon Venezia *et al.*, 2002; Efron *et al.*, 2002; Rolling-Smith *et al.*, 2002a; Rolling-Smith *et al.* 2002b; Rolling-Smith & Conlon, 2005; Norrby *et al.*, 2005; Livermore, 2009). Os PAMs também têm se mostrado eficientes no tratamento de infecções por bactérias multiresistentes como aquelas causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e a *multidrug-resistant Acinetobacter baumannii* (MDRAB) (Sebeny *et al.*, 2008; Bowling *et al.*, 2009; Geria & Schwartz, 2010).

Outras aplicações para os PAMs de anuros também têm sido sugeridas como, por exemplo, o emprego da magainina 2 (amidada) isolada da rã africana *Xenopus laevis* como agente anticoncepcional (Mystkowska *et al.*, 2001) e no desenvolvimento de plantas transgênicas de tabaco resistentes à infecção pelo fungo *Peronospora tabacina* (Li *et al.*, 2001). Olson *et al.* (2001) constataram que as pseudinas extraídas da pele da rã *Pseudis paradoxa* apresentam papel na regulação do processo de apoptose sobre o vírus da AIDS (Lorin *et al.*, 2005; Vancompernelle *et al.*, 2005) e no diabetes (Marenah *et al.*, 2004a; Marenah *et al.*, 2004b; Marenah *et al.*, 2005; Marenah *et al.*, 2006; Conlon *et al.*, 2008). Alguns autores sugerem o uso destas moléculas em infecções da cavidade oral (Komatsuzawa *et al.*, 2007), doenças oftálmicas (Mannis, 2002), doenças sexualmente transmissíveis (Penberthy *et al.*, 2011) e sepse (Jerala & Porro, 2004).

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

O interesse médico e biotecnológico por espécies vulneráveis, como é o caso dos anuros, tem papel importante na conservação destes animais para a adequada utilização de seus recursos genéticos, possibilitando também um melhor entendimento de diferentes aspectos de sua fisiologia (Rouillé *et al.*, 1989), assim como de sua filogenia (Conlon *et al.*, 2004).

Diante da crescente incidência de infecções por fungos e os relatos de falha terapêutica, faz-se necessário o incremento de pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novas drogas antifúngicas. Portanto, as pesquisas relacionadas com o isolamento, caracterização biológica e química de novas moléculas com potencial antifúngico provenientes da flora e fauna brasileira são importantes, uma vez que a evolução tratou de selecionar um vastíssimo espectro de substâncias eficientes na defesa dos organismos contra infecções. Sabe-se que a secreção cutânea de anfíbios é rica em componentes antimicrobianos, tornando-se assim, candidata natural na busca por novos compostos com atividade antifúngica.

Como pode ser constatado pelos exemplos elencados acima, a secreção cutânea de anuros é uma fonte rica de peptídeos biologicamente ativos, principalmente peptídeos antimicrobianos (PAMs) com atividades citolíticas e citotóxicas relevantes sobre um amplo espectro de organismos. O nosso grupo vem se dedicando nos últimos anos a isolar e caracterizar química e biologicamente PAMs da secreção cutânea de anuros da fauna brasileira, em especial, do Cerrado de modo a fomentar a indústria de medicamentos com novas drogas no tratamento de infecções por bactérias, fungos e protozoários que atingem a população brasileira e mundial.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

OBJETIVO GERAL

Identificar, purificar e caracterizar química e biologicamente peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*.

METAS ESTABELECIDAS

- ✓ Coletar indivíduos (machos e fêmeas) da espécie *H. raniceps* e obter a secreção cutânea bruta por meio de estimulação elétrica moderada;
- ✓ Fracionar a secreção cutânea bruta liofilizada de *H. raniceps* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna de fase reversa C₁₈;
- ✓ Avaliar os efeitos inibitórios das frações cromatográficas resultantes do fracionamento da secreção cutânea bruta liofilizada de *H. raniceps* por RP-HPLC sobre a proliferação do fungo patogênico *Candida albicans*;
- ✓ Analisar, por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, as frações cromatográficas que exibiram atividade inibitória sobre a proliferação de *C. albicans* relevante de modo a determinar seu grau de homogeneidade, bem como as massas moleculares dos componentes presentes;
- ✓ Obter, em alto grau de pureza e em quantidade suficiente para permitir sua caracterização química e biológica, o peptídeo antifúngico aqui identificado, nomeado peptídeo HR 36, mediante recromatografia em coluna de fase reversa C₁₈;
- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima (MIC) do peptídeo antimicrobiano HR 36, isolado a partir da secreção cutânea do anuro *H. raniceps*, sobre o fungo patogênico *C. albicans*.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps***MATERIAIS E MÉTODOS****Reagentes Químicos**

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

Coleta dos espécimes e extração da secreção cutânea de *H. raniceps*

Espécimes adultos de *H. raniceps* foram coletados no estado de Goiás sob a licença de coleta no. 17682-1 (MMA/ICMBio/SISBIO). A coleta, o acondicionamento para transporte, assim como, a manutenção dos espécimes vivos, seguiu as normas estabelecidas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA).

A secreção cutânea de *Hypsiboas raniceps* foi obtida por meio de estimulação elétrica moderada do animal (Castro *et al.*, 2009). A secreção liberada foi recolhida por meio de lavagem do corpo do animal com água Milli-Q e, em seguida, congelada, liofilizada, pesada, alíquotada e armazenada a -20°C em tubos de polipropileno até sua utilização. Os procedimentos envolvendo animais durante a realização deste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade de Brasília - UnB.

Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de *H. raniceps*

Alíquotas (5,0 mg) da secreção bruta de *H. raniceps* liofilizada foram dissolvidas em 220 µL de TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q (solvente A), submetidas a centrifugação por 10 min a 13.600 g. O sobrenadante foi aplicado em coluna de fase reversa C₁₈ (Vydac 218TP54; 4,6 x 250 mm) previamente equilibrada com solvente A, sendo empregado HPLC da empresa Shimadzu Co. (Japão). A eluição foi realizada empregando-se fluxo de 0.8 mL/min.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Primeiramente foi aplicado solvente A puro por 5 min, seguido de gradiente linear de 0–40% por 40 min e de 45–100% de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de TFA (solvente B) por 1 min, finalizando com uma lavagem por 5 min com 100% de solvente B. A absorvância foi monitorada a 216 nm e as frações foram manualmente coletadas, secadas a vácuo e armazenadas a –20°C.

Ensaio de varredura para identificar frações cromatográficas capazes de inibir a proliferação do fungo patogênico *Candida albicans*

O fungo *C. albicans* (cepa ATCC 14053), gentilmente cedido pelo Laboratório de Micologia do LACEN – DF, foi cultivado em Ágar Sabouraud Dextrose 30 (MicroMed).

Preparo da cepa para ensaio de atividade antifúngica. O fungo foi descongelado e foram executadas passagens (repiques) para assegurar sua pureza e viabilidade. O inóculo foi preparado a partir de colônias frescas de *C. albicans*, crescidas em ágar Sabouraud após 24 horas a 37°C, as quais foram ressuspensas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, HIMEDIA) de modo a permitir o pleno crescimento das colônias.

Preparo do inóculo e teste de sensibilidade fúngica. Depois de confirmada a viabilidade da cepa, o fungo foi cultivado em tubos tipo Falcon contendo 5 mL de meio BHI fresco, sob agitação a 37°C durante 1 dia, até atingir a densidade óptica igual a 1 em 595 nm. As leveduras, em fase logarítmica, foram diluídas no mesmo meio de cultura na proporção 1:100. Uma alíquota de 50 µL desta suspensão de levedura a 1:100 (contendo aproximadamente 2×10^3 CFUs) foi incubada por 22 h a 37°C com 50 µL de cada fração cromatográfica resultante do fracionamento da secreção bruta de *H. raniceps* ressuspensa em água Milli-Q estéril, em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato) com o emprego de uma micropipeta. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 37°C, e foi feita uma nova leitura de absorvância em 595 nm após 24 horas em leitora de placas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, USA). Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e água

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Milli-Q estéril, ambos incubados com as suspensões das leveduras. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Análises por espectrometria de massas.

As frações cromatográficas capazes de inibir o crescimento do fungo *C. albicans* foram analisadas em um espectrômetro de massas Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Alemanha).

Esta análise teve por objetivo verificar o grau de homogeneidade das frações obtidas, bem como determinar as massas moleculares dos componentes presentes nas frações ativas.

Cada fração cromatográfica foi resuspendida em 50 μ L TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q e aplicada 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 ($M_r = 1047,19$), angiotensina I ($M_r = 1297,49$), substância P ($M_r = 1348,64$), 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.

Purificação do peptídeo bioativo de interesse

A fração bioativa de interesse foi recromatografada por RP-HPLC injetando-se a amostra dissolvida em 220 μ L de TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q em uma coluna de fase reversa C_{18} (Phenomenex, 4,6 x 250 mm), previamente equilibrada com o mesmo solvente e a eluição foi realizada empregando-se fluxo de 1,0 mL/min. A eluição foi feita com aplicação de gradiente linear de acetonitrila, com detecção UV em 216 nm. As frações eluídas foram coletadas manualmente, secadas a vácuo e armazenadas a -20 °C. Em seguida, as frações cromatográficas obtidas foram novamente analisadas por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps***Determinação da atividade inibitória mínima (MIC) para o fungo *Candida albicans***

Cepas de *C. albicans* (ATCC 14053), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do LACEN – DF, foram cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose 30 (MicroMed). O inóculo foi preparado a partir de colônias congeladas de *C. albicans*, crescidas em 5 mL de meio BHI fresco sob agitação a 37°C até a densidade óptica igual a 1 em 595 nm. As leveduras em fase logarítmica foram diluídas no mesmo meio de cultura na proporção 1:100.

A partir de uma solução-estoque a 256 µM do peptídeo antimicrobiano isolado no presente projeto, esterilizada por filtração em filtro Millex GV 0,22 µm, foi realizada a diluição seriada. A concentração do peptídeo de interesse variou de 128 µM a 2 µM. Foi adicionado em cada poço da microplaca 50 µL do inóculo contendo aproximadamente 2×10^3 CFUs, ficando cada poço com volume final de 100 µL. Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e água Milli-Q estéril, ambos incubados com as suspensões das leveduras. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 35°C, com leitura de absorvância em 595 nm após 24 em leitora de placas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, USA). A concentração inibitória mínima (CIM) para o peptídeo testado foi assumida como sendo a menor concentração onde não houve crescimento detectável espectrofotometricamente.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps***RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De maneira geral, o fracionamento da secreção cutânea de *H. raniceps* resultou em um perfil complexo com a eluição de várias (30) frações cromatográficas (Figura 7) de acordo com o esperado, tendo em vista os resultados anteriormente obtidos por Magalhães *et al.* (2008), que realizaram o fracionamento dessa mesma secreção.

Como no estudo realizado por Magalhães *et al.* em 2008 foi avaliada a atividade inibitória das frações obtidas sobre a proliferação bacteriana, decidiu-se, no presente trabalho, avaliar os efeitos das frações cromatográficas sobre a proliferação do fungo patogênico *Candida albicans*. Assim, as frações cromatográficas obtidas com o fracionamento cromatográfico da secreção bruta de *H. raniceps* foram testadas preliminarmente contra esse fungo patogênico, de modo a permitir a identificação de frações com potencial inibitório sobre sua proliferação celular. Dentre as frações cromatográficas testadas, oito (8) exibiram atividade antiproliferativa sobre *C. albicans*, com porcentagem de inibição de mais de 25%, sendo que duas dessas frações apresentaram uma atividade inibitória maior que 40% (Figura 8).

As frações ativas foram submetidas à avaliação de sua homogeneidade por meio de espectrometria de massas, mas para algumas delas não foram obtidos resultados conclusivos. Dentre as frações analisadas, os espectros das frações 27 (Figura 9) e 28 (Figura 10) (as frações de maior interesse tendo em vista seu potencial inibitório) evidenciaram a presença de contaminantes, sendo necessárias novas etapas cromatográficas.

A fração 27 exibiu taxa de inibição de 42,5% e o principal componente molecular observado apresentou massa molecular protonada de 3004,975 Da (Figura 9). Já a fração cromatográfica 28 com taxa de inibição de 43% sobre a proliferação de *C. albicans* revelou a presença três componentes, sendo o principal com massa molecular protonada de 3007,286 Da (Figura 10).

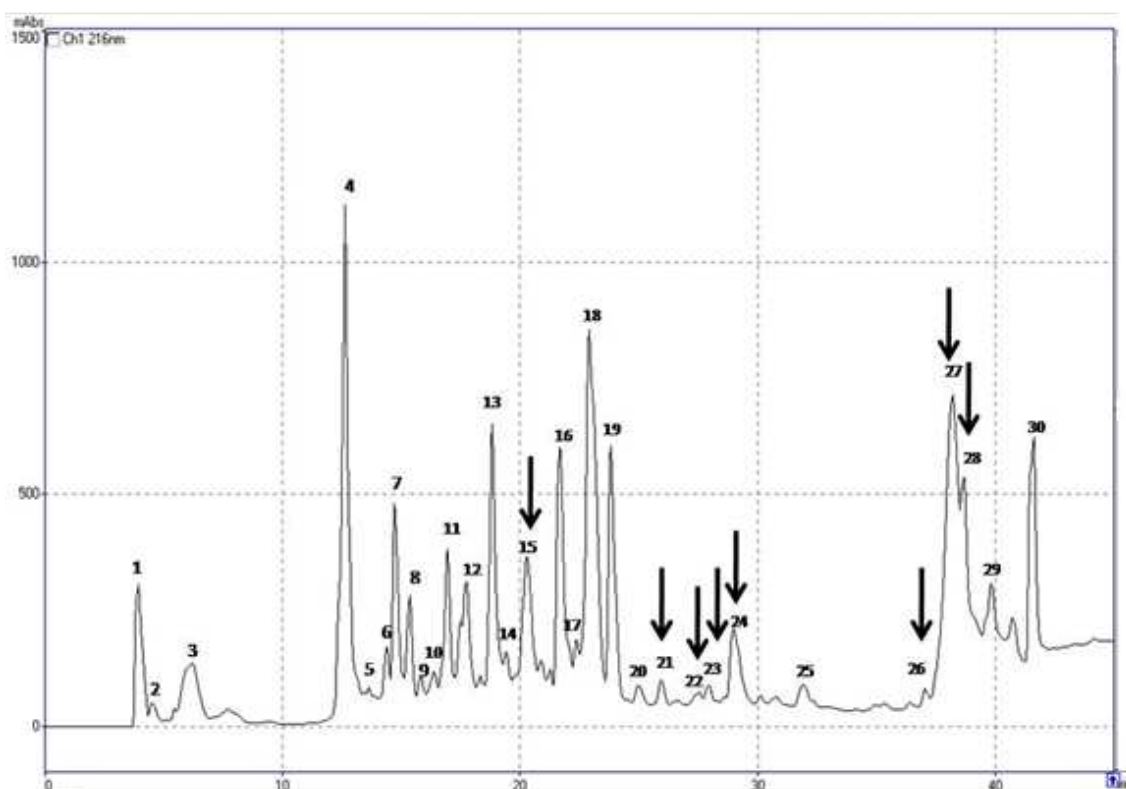
Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Figura 7. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea bruta de *H. raniceps* ressaltando com as setas as frações com atividade antiproliferativa sobre *C. albicans*. O sobrenadante foi aplicado em coluna de fase reversa C₁₈ (Vydac 218TP54; 4,6 x 250 mm) previamente equilibrada com solvente A. A eluição foi realizada empregando-se fluxo de 0,8 mL/min. Primeiramente, foi realizada lavagem com solvente A puro por 5 min e, em seguida, aplicado gradiente linear de 0–40% por 40 min e de 45-100% de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de TFA (solvente B) por 1 min, seguida de uma lavagem de 5 min com 100% de solvente B. A absorvância foi monitorada a 216 nm e as frações foram manualmente coletadas, secadas a vácuo e armazenadas a –20°C

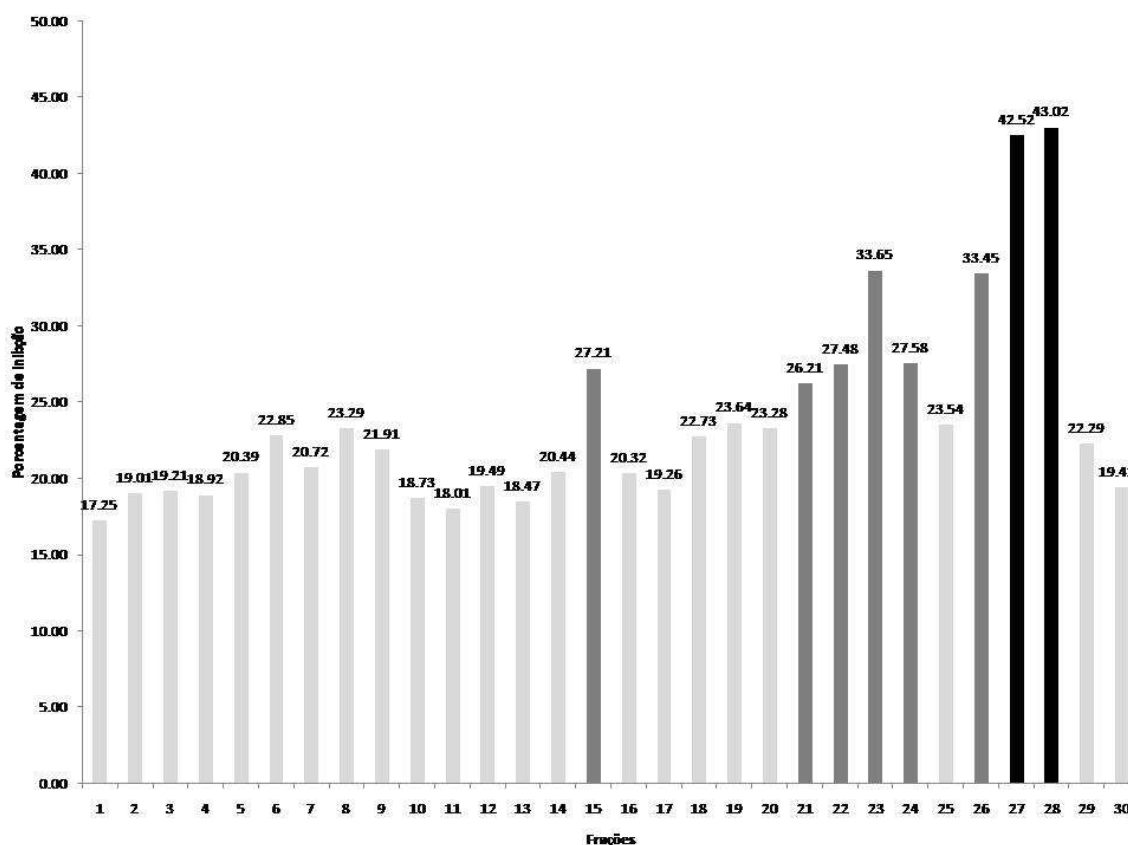
Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Figura 8. Avaliação dos efeitos inibitórios sobre a proliferação da levedura *C. albicans* (ensaio de varredura) da incubação com as frações cromatográficas obtidas com o fracionamento por RP-HPLC da secreção cutânea de *H. raniceps*.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

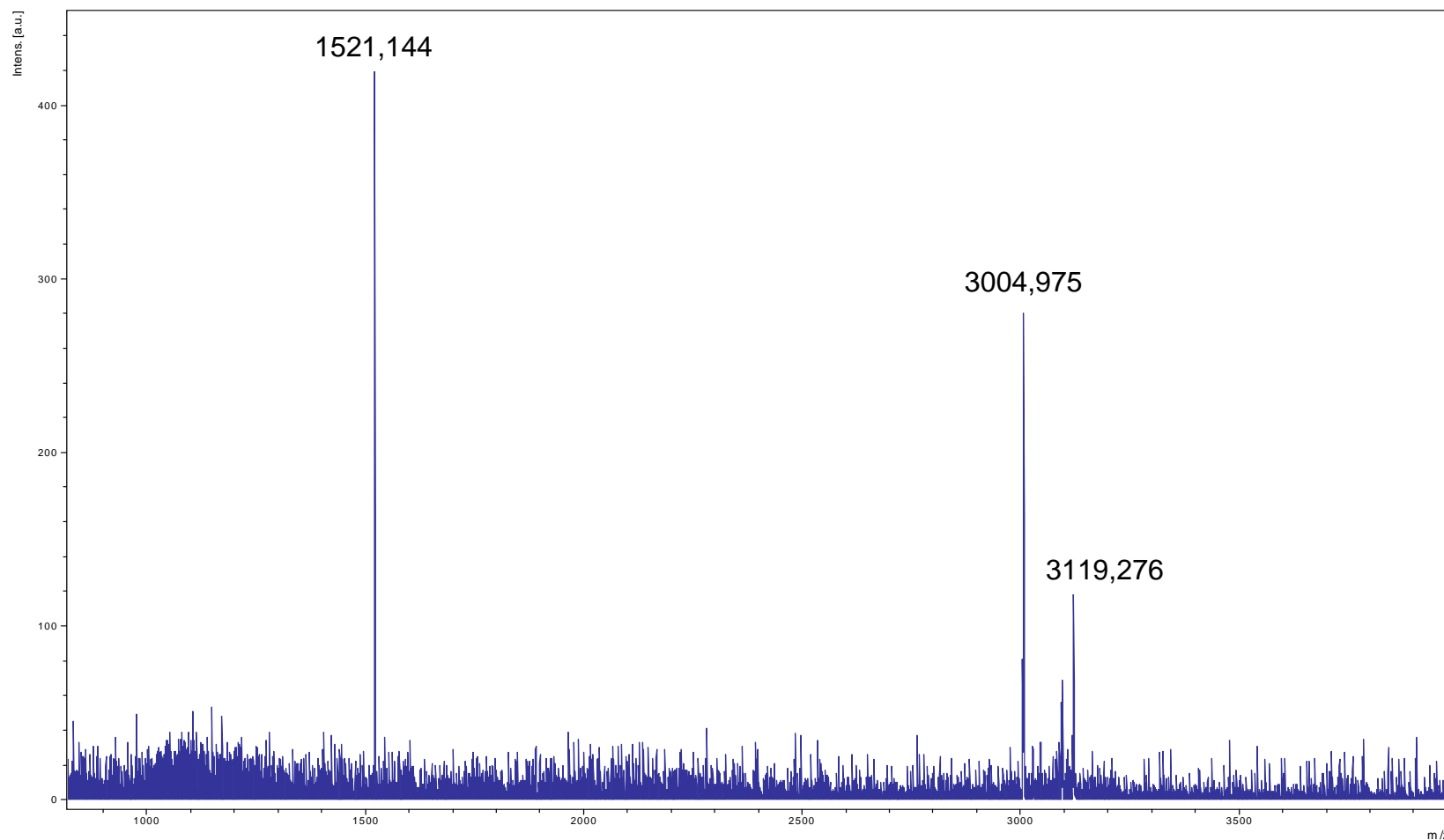


Figura 9. Espectro de massas da fração 27 obtida com o fracionamento da secreção cutânea de *H. raniceps* em coluna C₁₈ (matriz: HCCA; MALDI-TOF MS).

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

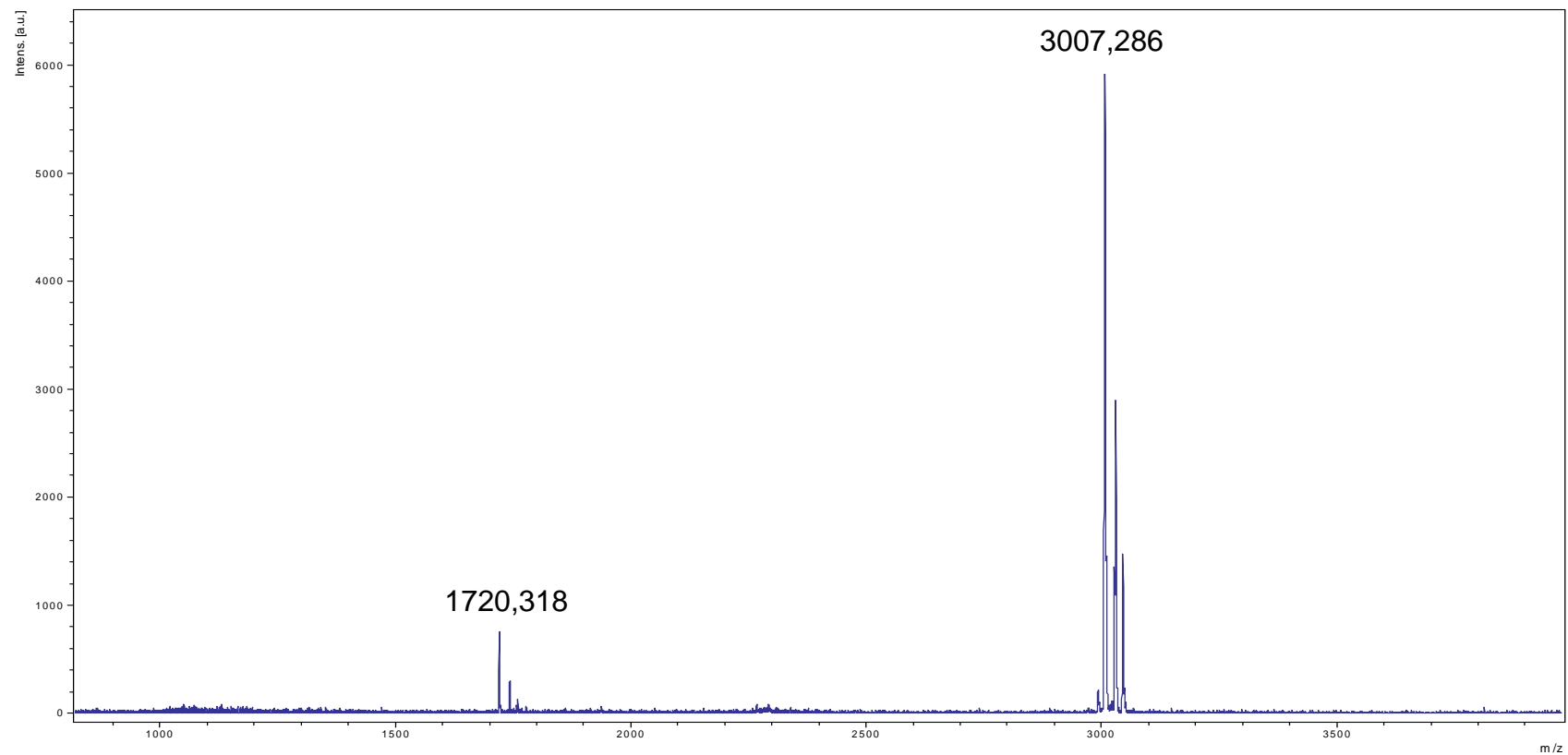


Figura 10. Espectro de massas da fração 28 obtida com o fracionamento da secreção cutânea de *H. raniceps* em coluna C₁₈ (matriz: HCCA; MALDI-TOF MS).

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Baseando-se no estudo realizado por Magalhães *et al.* (2008), no qual foram identificados 9 peptídeos estruturalmente relacionados empregando-se estratégias de purificação de peptídeos e de construção de biblioteca de cDNAs (Tabela 2), selecionou-se a fração 28 para dar prosseguimento ao presente estudo no intuito de isolar o peptídeo bioativo identificado, uma vez que as massas moleculares dos componentes presentes nessa fração, 1720,318 e 3007,28 Da, não correspondem a nenhuma das ranaseptinas previamente caracterizadas por Magalhães *et al.*, 2008. Além disso, o seu grau de homogeneidade mais elevado indicou uma maior facilidade na obtenção do componente purificado por meio do emprego de um novo passo cromatográfico em coluna de fase reversa C₁₈.

Tabela 2. Estruturas primárias e massas moleculares das ranaseptinas e dos peptídeos processados.

PEPTÍDEO	ESTRUTURAS PRIMÁRIAS DAS RANASEPTINAS	MASSA MOLECULAR MONOISOTÓPICA em Daltons DO PEPTÍDEO MADURO	MASSA MOLECULAR MONOISOTÓPICA em Daltons DO FRAGMENTO N-TERMINAL	MASSA MOLECULAR MONOISOTÓPICA em Daltons DO FRAGMENTO C-TERMINAL
Rsp-1	AWLDKLSLKGKVVVGKVALGVAQNYLNPQQ	3136,78	1512,90	1641,88
Rsp-2	AWLDKLSLKGKVVVGKVAIGVAQHLYLNPQQ	3159,79	1512,90	1664,90
Rsp-3	AWLDKLSIGKVVVGKVAIGVAKNLLNPQ	2958,77	1512,90	1463,88
Rsp-4	AWLDKLSLKGKVVVGKVLGVVQNYLNPQQ	3178,83	1512,90	1683,94
Rsp-5	AWLDKLNKLGKVVVGKVALGVVQNYLNPQQ	3219,86	1539,91	1697,96
Rsp-6	ALLDKLSLKGKVVVGKVALGVVQNYLNPQQ	3119,85	1439,91	1697,96
Rsp-7	ALLDKLSLKGKVVVGKVALGVAQHLYLNPQQ	3086,80	1439,91	1664,90
Rsp-8	ALLDKLSLKGKVVVGKVAIGVAQHLYLNPQQ	3086,80	1439,91	1664,90
Rsp-9	ALLDKLSLKGKVVVGKVAIGVAQHLYLNPQ	2958,74	1439,91	1536,84

Essa fração foi submetida à recromatografia por RP-HPLC empregando-se uma coluna C₁₈ da Phenomenex o que permitiu a obtenção de um componente principal que eluiu com tempo de retenção de 36,5 min (Figura 11), o qual mostrou-se homogêneo quando analisado por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (Figuras 12). A diferença de cerca de 1 Da nas massas moleculares observadas nos espectros de massas da fração 28 e da fração resultante da sua recromatografia pode ser explicada por uma calibração incorreta do espectrômetro de massas antes das análises. Novas análises no espectrômetro de massas serão realizadas com ambas as

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

frações logo após uma calibração mais criteriosa do equipamento de modo a eliminar dúvidas quanto à massa molecular do peptídeo purificado.

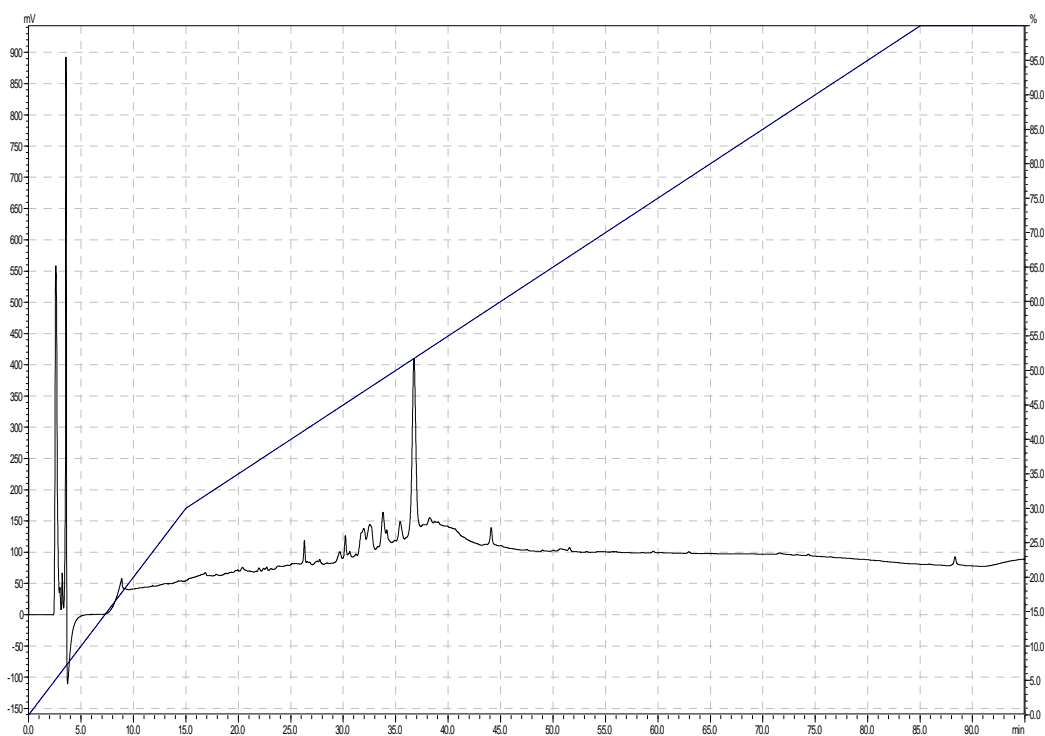


Figura 11. Perfil cromatográfico resultante da recromatografia da fração 28 em coluna C₁₈ da Phenomenex. A fração eluída no tempo de retenção de 36,5 min foi manualmente coletada, seca a vácuo e analisada por MALDI-TOF MS.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

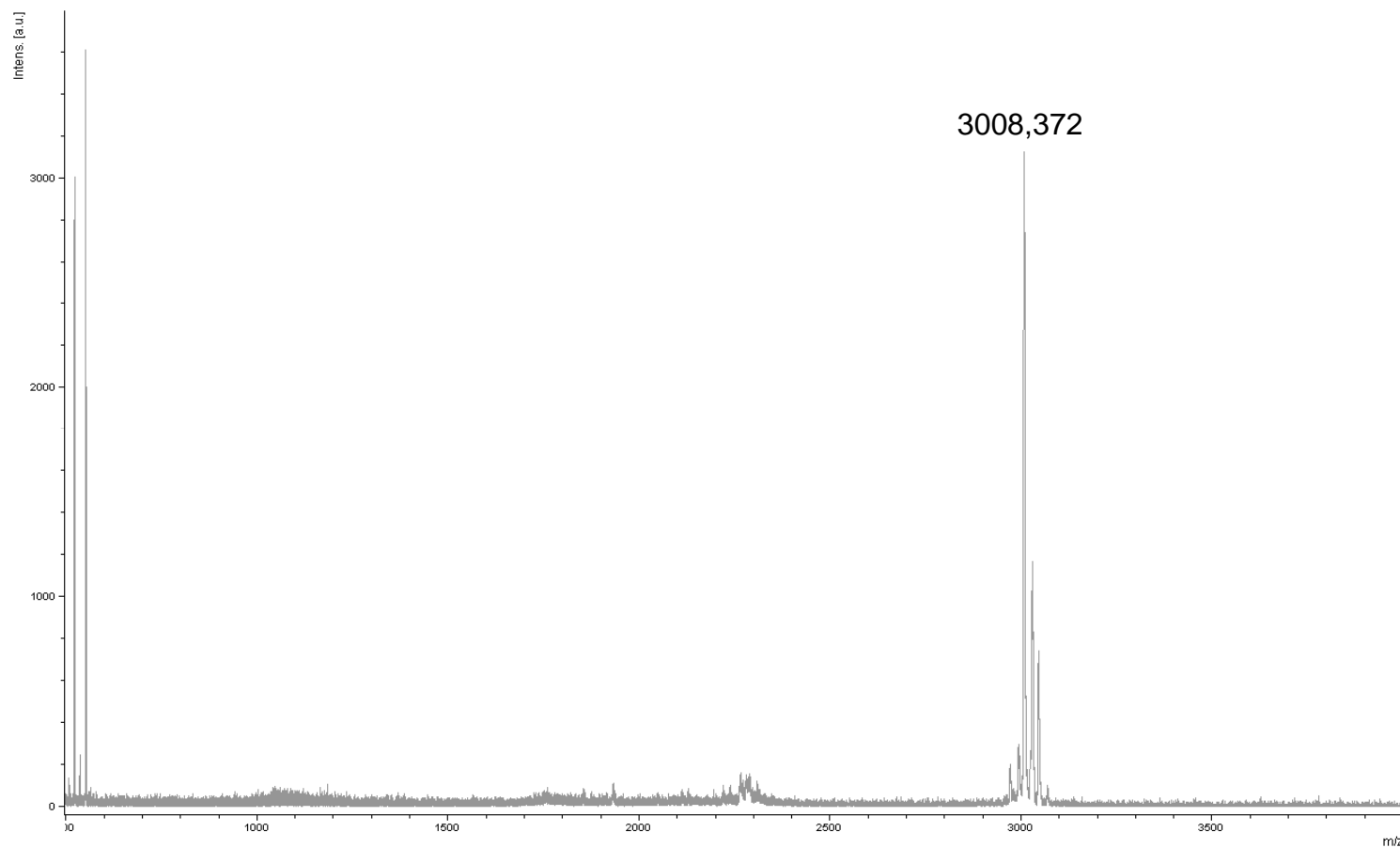


Figura 12. Espectro de massas da fração com tempo de retenção de 36,5 min obtida com a recromatografia da fração 28 em coluna C₁₈ (matriz: HCCA; MALDI-TOF MS).

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Uma vez que a estratégia cromatográfica empregada foi eficiente na purificação do peptídeo ativo, agora denominado HR 36, tendo em vista seu tempo de retenção (sua eluição ocorreu após 36,5 min) na recromatografia, tal peptídeo puro foi acumulado em quantidade suficiente para a realização de um ensaio para a determinação do seu MIC sobre o fungo patogênico *Candida albicans*. Após incubação de diferentes concentrações do peptídeo HR 36 com uma suspensão de *C. albicans* não foi possível a determinação do seu MIC frente a esse patógeno, uma vez que foi observada uma inibição parcial (de cerca de 50%) nas duas maiores concentrações empregadas (128 e 64 μM), confirmando a susceptibilidade de *C. albicans* a esse peptídeo, mas também evidenciando ser esse efeito considerado fraco em comparação com outros PAMs com atividade anti-*Candida* já isolados da secreção cutânea de anuros, cujos MICs encontram-se entre 4-12 μM (Li *et al.*, 2013).

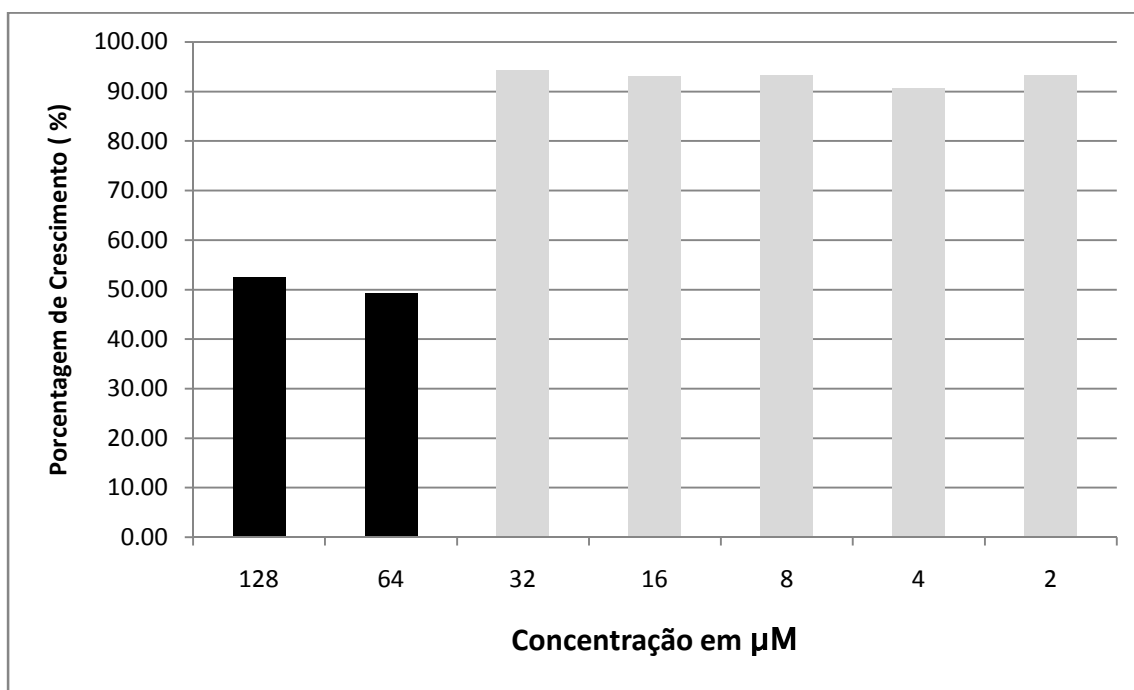


Figura 13. Efeito da incubação de doses crescentes do peptídeo HR 36 sobre a proliferação do fungo patogênico *Candida albicans*.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Muitos estudos são direcionados para a identificação, purificação e caracterização estrutural de peptídeos antimicrobianos devido ao fato que estes compostos presentes nos anuros são produzidos como parte de uma mistura de componentes bioativos que incluem também aminas biogênicas, bufadienólídeos e alcalóides, em resposta a estímulos que ativam as glândulas serosas localizadas de forma assimétrica na superfície dorsal dos anuros (Pukala *et al.*, 2006).

Ate o momento, os PAMs mais estudados são as magaininas isoladas da rã *Xenopus laevis*, bem como seus análogos, que exibem amplo espectro de ação incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, vírus e protozoários, não exibindo atividade citolítica significativa sobre células de mamíferos, como demonstrado em diversos trabalhos (Soravia *et al.*, 1988; Bessale, *et al.*, 1992; De Lucca & Walsh, 1999; Avrahami & Shai, 2002; Sitaram & Nagaraj, 2002; Pukala *et al.*, 2006). A magainina 2 é um peptídeo com propriedades não-hemolíticas que inibe o crescimento de *C. albicans*, apresentando um MIC igual a 80 µg/mL, além de agir sobre outros fungos como *C. neoformans* e *S. cerevisiae* (Zasloff, 1987).

Da secreção de *Xenopus laevis* também foi isolado o peptídeo PGLa, um peptídeo de 24 resíduos de aminoácidos com atividade inibitória sobre várias cepas patogênicas de *Candida* e *C. neoformans* (Helmerhost *et al.*, 1999; Lohner & Prossnigg, 2009) sendo que a espécie *C. glabrata* foi menos sensível a esse peptídeo (Helmerhost *et al.*, 1999). Em 2000, Van't Hoff *et al.* demonstraram que a associação de AmB com PGLa apresentou um efeito sinérgico contra diferentes cepas de *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus*. Ressalta-se que *A. fumigatus*, um fungo resistente à anfotericina B, mostrou-se bastante sensível à PGLa (Rollins-Smith *et al.* 2002).

As esculentinas 1 e 2, peptídeos com 46 resíduos de aminoácidos, os maiores peptídeos de anfíbios anuros conhecidos até o momento, foram isolados da rã *Rana esculenta* e formam um grupo de peptídeos que apresentam grande atividade sobre bactérias e uma potência moderada contra

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

o fungo *C. albicans* (Simmaco *et al.*, 1994; Goraya *et al.*, 2000; Conlon *et al.*, 2004).

Outra espécie de anfíbio anuro chamada de *Lithobates catesbeianus*, comumente conhecida como rã-touro, apresenta na sua secreção um peptídeo denominado ranatuerina 1 que exibe uma forte atividade inibitória sobre *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (Goraya *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Halverson *et al.*, 2000). Conlon *et al.* (2004) reportaram que um aumento na cationicidade deste peptídeo pela substituição de um resíduo de asparagina na posição 8 por uma lisina resulta em um análogo até seis vezes mais ativo sobre *E. coli* e duas vezes mais sobre *S. aureus* e *C. albicans*, mantendo uma atividade hemolítica baixíssima. Ao mesmo tempo, um aumento na α -helicidade pela substituição de um outro resíduo de asparagina na posição 22 por uma alanina, aumentou em duas vezes o poder antimicrobiano do peptídeo, mas triplicou a atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos (Conlon *et al.*, 2004).

Um outro grupo de peptídeos denominado temporinas foi isolado inicialmente da secreção da rã *Rana temporaria*. As temporinas são constituídas por pequenos peptídeos lineares (10 a 14 resíduos de aminoácidos), com capacidade de formar α -hélice, sendo anfipáticos, hidrofóbicos, catiônicos e contendo C terminal amidado (Simmaco *et al.*, 1998). Geralmente, as temporinas apresentam um único resíduo de aminoácido básico (usualmente a lisina) podendo ser este o motivo pelo qual elas são ativas apenas contra bactérias Gram-positivas (como, por exemplo, *S. aureus*) com MICs que variam entre 1 e 100 μ M (Conlon *et al.*, 2006). Enquanto que a temporina L apresenta dois resíduos básicos e exibe atividade contra bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *P. aeruginosa*, como também contra *C. albicans* (Rinaldi *et al.*, 2002).

Outro peptídeo deste grupo é a temporina 1Dra isolada de *Rana draytonii*. Este peptídeo possui dois resíduos básicos e apresenta atividade contra *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* com MICs iguais a 16, 8 e 32 μ M respectivamente. No entanto também apresenta atividade hemolítica em

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

concentrações acima de 65 μM , reduzindo assim o seu potencial terapêutico (Conlon *et al.*, 2006).

Nos anuros da família Hilidae, gênero *Phyllomedusa*, foram isoladas as dermaseptinas que apresentam propriedades líticas *in vitro* sobre bactérias, protozoários, leveduras e fungos filamentosos (Mor *et al.*, 1994).

Outro gênero de anuros que possui peptídeos antimicrobianos importantes é o gênero *Leptodactylus*. Um exemplo de PAM que merece ser mencionado é a pentadactilina isolada de *Leptodactylus pentadactylus* que possui atividade sobre *C. albicans* (em concentrações bastante elevadas, >200 μM), forte atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e fraca atividade hemolítica (King *et al.*, 2005).

Existem também exemplos de PAMs isolados de outros órgãos, como estômago, como a bufoterina I (peptídeo linear com 39 resíduos de aminoácidos) (Park *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 2009). Esse peptídeo possui um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*B. subtilis* e *S. aureus*), bactérias Gram-negativas (*E. coli*), e fungos (*C. albicans*, *C. neoformans* e *S. cerevisiae*) (Cho *et al.*, 2009).

É importante ressaltar que existem poucos trabalhos na literatura descrevendo as atividades biológicas dos peptídeos presentes nas secreções de anuros do gênero *Hypsiboas*. Dentre eles, Prates *et al.* (2004) isolaram um PAM denominado hylaseptina P1 (HSP1) da secreção de *Hyla punctata* (atualmente *Hypsiboas punctatus*). Este peptídeo apresentou atividade contra *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Castro *et al.* (2005) isolaram dois peptídeos da secreção de *Hyla biobeba* (atualmente a espécie é conhecida como *Hypsiboas lundii*) denominados hylina b1 (Hy-b1) e hylina b2 (Hy-b2). Esses peptídeos possuem 19 resíduos de aminoácidos cada, são catiônicos, ricos em resíduos hidrofóbicos. Tais peptídeos mostraram-se estruturalmente relacionados com as bombininas H isoladas de anuros do gênero *Bombina*.

Com taxas de similaridade estrutural entre 48% e 65% entre as bombininas H e as hylinas b1 e b2, esses dois novos peptídeos são os

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

primeiros exemplos de peptídeos relacionados com as bombina H isolados de anuros não relacionados filogeneticamente com o gênero *Bombina* (Castro *et al.*, 2005).

Em outro trabalho com a espécie *Hypsiboas albopunctatus* foi isolada a hylina a1, um peptídeo linear de 18 resíduos de aminoácidos ativo contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*; *E. faecalis* e *B. subtilis*), assim como contra os fungos *C. neoformans*, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Infelizmente tal peptídeo exibiu atividade hemolítica contra eritrócitos humanos dificultando desta forma o seu emprego como uma alternativa clínica aos antibióticos atuais.

O último trabalho disponível na literatura envolvendo anuros do gênero *Hypsiboas* foi realizado por Magalhães *et al.* (2008). Nesse trabalho foi identificada uma nova família de peptídeos antimicrobianos, denominados raniseptinas, a partir da espécie alvo do presente estudo, *Hypsiboas raniceps*. O peptídeo raniseptina 1 (Rsp-1) foi isolado e apresentou atividade antimicrobiana sobre diferentes bactérias, sem no entanto apresentar efeitos citolíticos sobre eritrócitos humanos. As propriedades antimicrobianas da Rsp-1 foram demonstradas contra três bactérias patogênicas: *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. A raniseptina 1 foi selecionada para a realização destes ensaios devido à sua abundância quando comparada com as outras raniseptinas presentes nessa secreção, sendo que a Rsp-1 equivale a 8% do total dos peptídeos contidos na secreção. Os valores dos MICs para as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* foram 5 e 10 μM , respectivamente, para o peptídeo maduro íntegro (29 resíduos de aminoácidos).

Fica evidente a importância de se ampliar os estudos com anuros do gênero *Hypsiboas*, pois eles podem representar uma fonte abundante de peptídeos ativos contra organismos patogênicos, incluindo os fungos.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

CONCLUSÃO

No presente estudo foi comprovada a presença de peptídeos com atividade antiproliferativa sobre o fungo patogênico *Candida albicans* na secreção cutânea da rã *Hypsiboas raniceps*. De acordo com a estratégia experimental empregada foi possível o isolamento e a caracterização parcial de um peptídeo com atividade inibitória sobre a proliferação de *C. albicans*. Tal peptídeo, denominado HR 36, apresentou massa molecular igual a 3 kDa e foi capaz de inibir em 50% o crescimento da levedura *C. albicans* nas concentrações de 128 e 64 μ M.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

PERSPECTIVAS

Como perspectivas imediatas do presente trabalho, podem ser relacionadas as seguintes etapas:

- ✓ Determinação da estrutura primária do peptídeo HR 36;
- ✓ Produção, por síntese química, do peptídeo HR 36 empregando-se química Fmoc;
- ✓ Tendo disponibilidade de material, proceder à determinação das atividades inibitórias do peptídeo HR 36 sobre a proliferação de diferentes organismos patogênicos como fungos (*Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*), bactérias (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. faecalis*) e protozoários (*T. cruzi*, *L. brasiliensis*, *P. falciparum*);
- ✓ Avaliação dos efeitos citotóxicos do peptídeo HR 36 sobre células tumorais;
- ✓ Avaliação dos efeitos citolíticos do peptídeo HR 36 sobre células sanguíneas humanas.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Ajesh, K. & Sreejith, K. 2009. Peptide antibiotics: an alternative and effective antimicrobial strategy to circumvent fungal infections. *Peptides* 30(5), 999-1006.

Almirante, B.; Rodriguez, D.; Park, B.J.; Cuenca-Estrella, M.; Planes, A.M.; Almela, M., Mensa, J.; Sanchez, F. & Ayats, J. 2005. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J. Clin Microbiol.* 43, 1829–1835.

Arendrup, M. C., Fuursted, K., Gahrn-Hansen, B., Jensen, I. M., Knudsen, J. D., Lundgren, B., Schønheyder, H. C. & Tvede, M. 2005. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *J Clin Microbiol.* 43, 4434–4440.

Arzabe, C. 1999. Reproductive activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. *Revista Brasileira de Zoologia* 16(3), 851-864.

Belaid, A; Aouni, M; Khelifa, R; Trabelsi, A; Jemmali, M; & Hani, K. 2002. *In vitro* antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. *J. Med. Virol.* 66, 229-234.

Bowling, F. L.; Jude, E. B.; Boulton, A. J. 2009. MRSA and diabetic footwounds: contaminating or infecting organisms?. *Curr. Diab. Rep.* 9, 440-444.

Brand, G. D.; Leite, J. R., De Sá Mandel, S. M.; Mesquita, D. A.; Silva, L. P.; Prates, M. V.; Barbosa, E. A.; Vinecky, F.; Martins, G. R.; Galasso, J. H.; Kuckelhaus, S. A.; Sampaio, R. N.; Furtado, J. R. JR.; Andrade, A. C. & Bloch, C. Jr. 2006. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347(3), 739-746.

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

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

Bruix, M.; Gonzales, C.; Santoro, J.; Soriano, F.; Rocher, A.; Mendez, E. & Rico, M. 1995. ¹H-NMR studies on the structure of a new thionin from barley endosperm. *Biopolymers* 36, 751–763.

Bruix, M; Jimenez, M. A; Santora, J; Gonzalez, C; Colilla, F. J; Mendez, E. & Rico, M. 1993. Solution structure of γ -1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by ¹H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry* 132, 715–724.

Bulet, P.; Stöcklin, R. & Menin, L. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol.* 198, 169-184.

Castro, M. S.; Matsushita, R. H.; Sebben, A.; Sousa, M. V. & Fontes, W. 2005. Hylins: bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the Brazilian tree-frog *Hyla biobeba*. *Protein Pept. Lett.* 12(1), 89-93.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Castro, M. S.; Ferreira, T.C.G.; Cilli, E.M.; Crusca, E. Jr.; Mendes-Giannini, M.J.S.; Sebben, A.; Ricart, C.A.O.; Sousa, M.V. & Fontes, W. 2009. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). *Peptides* 30, 291-296.

Chinchar, V. G.; Wang, J.; Murti, G.; Carey, C. & Rollins-Smith, L. A. 2001. Inactivation of frog virus 3 and channel catfish virus by esculentin-2P and ranatuerin-2P, two antimicrobial peptides isolated from frog skin. *Virology* 288, 351-357.

Cho, J.H.; Sung, B.H. & Kim, S.C. 2009. Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788, 1564-1569.

Clarke, B.T. 1997. The natural history of amphibians skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biol. Rev.* 72, 365-379.

Colombo, A. L.; Nucci, M.; Park, B. J.; Noue' r, S. A.; Arthington-Skaggs, B., da Matta, D. A.; Warnock, D.; Morgan, J. & Brazilian Network Candidemia Study. 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwidesentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2816-2823.

Conlon, J. M.; Al-Ghaferi, N.; Ahmed, E.; Meetani, M. A.; Leprince, J. & Nielsen, P. F. 2011. Orthologs of magainin, PGLa, procaerulein-derived, and proxenopsin derived peptides from skin secretions of the octoploid frog *Xenopus amietii* (Pipidae). *Peptides* 31, 989-994.

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

Conlon, J. M.; Power, G. J.; Abdel-Wahab, Y. H. A.; Flatt, P. R.; Jiansheng, H. & Coquet, L. 2008. A potent, non-toxic insulin-releasing peptide isolated from an extract of the skin of the Asian frog, *Hylarana guntheri* (Anura:Ranidae). *Regulatory Peptides* 15, 153-159.

Conlon, J. M.; Woodhams, D. C.; Raza, H.; Coquet, L.; Leprince, J.; Jouenne, T.; Vaudry, H. & Rollins-Smith, L. A. 2007. Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). *Toxicon* 50, 498-506.

Csordás, A. & Michl, H. 1969. Primary structure of two oligopeptides of the toxin of *Bombina variegata* L. *Toxicon* 7(2), 103-108.

De Lucca, A. J. & Walsh, T. J. 1999. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(1), 1-11.

Debono, M. & Gordee, R. S. 1994. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 471-497.

Devaux, P. F. 1991. Static and dynamic asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 30, 1163-1173.

Duellman, W. E. & Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland. 670 pp.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Efron, L; Dagan, A; Gaidukov, L; Ginsburg, H & Mor, A. 2002. Direct interaction of dermaseptin S4 aminoheptanoyl derivative with intraerythrocytic malaria parasite leading to increased specific antiparasitic activity in culture. *J. Biol. Chem.* 277, 24067-24072.

Eggimann, P.; Garbino, J. & Pittet, D. 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non immunosuppressed patients. *Lancet Infect. Dis.* 3, 685-702.

Enright, M. C; Robinson, D. A; Randle, G; Feil, E. J. Grundmann, H. & Spratt, B. G. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 7687-7692.

Espinel-Ingroff, A., Canton, E., Peman, J., Rinaldi, M. G. & Fothergill, A. W. 2009. Comparison of 24-hour and 48-hour voriconazole MICs as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method (M27-A3 document) in three laboratories: results obtained with 2,162 clinical isolates of *Candida* spp. and other yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2766-2771.

Fidel, P. L. Jr. 2006. *Candida*-host interactions in HIV disease: relationships in oropharyngeal candidiasis. *Adv. Dent. Res.* 19, 80-84.

Finkel, J. S. & Mitchell, A. P. 2011. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 109-118.

Fontenelle, R. O.; Morais, S. M.; Brito, E. H.; Brilhante, R. S.; Cordeiro, R. A.; Nascimento, N. R.; Kerntopf, M. R.; Sidrim, J. J. & Rocha, M. F. 2008. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. *J. Appl. Microbiol.* 104(5), 1383-1390.

Frost, D. R. 2009. *Amphibian Species of the World*: an online reference. Version 2.20. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia>. American Museum of Natural History, New York, USA.

Ganz, T & Lehrer, R. I. 1998. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 41-44.

Ganz, T; Selsted, M. E & Lehrer, R. I. 1990. Defensins. *Eur. J. Haematol.* 44, 1-8.

Geria, A. N. & Schwartz, R. A. 2010. Impetigo update: new challenges in the era of methicillin resistance. *Cutis.* 85, 65-70.

Giordani, R.; Treboux, J.; Mais, M. & Regli, P. 2001. Enhanced antifungal activity of ketoconazole by *Euphorbia characias* latex against *Candida albicans*. *J. Ethnopharmacol.* 78(1), 1-5.

Goraya, J.; Knoop, F. C. & Conlon, J. M. 1999. Ranatuerin 1T: an antimicrobial peptide isolated from the skin of the frog *Rana temporaria*. *Peptide* 20, 159-163.

Goraya, J.; Knoop, F. C. & Conlon, J. M. 1998. Ranatuerins: antimicrobial peptides isolated from the skin of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250(3), 589-592.

Goraya, J.; Wang, Y.; Li, Z.; O'Flaherty, M.; Knoop, F. C.; Platz, J. E. & Conlon, J. M. 2000. Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American frogs *Rana luteiventris*, *Rana berlandieri* and *Rana pipiens*. *Eur. J. Biochem.* 267(3), 894-900.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Guimarães, L. D. & Bastos, R. P. 2003. Vocalizações e interações acústicas em *Hyla raniceps* (Anura, Hylidae) durante a atividade reprodutiva. *Iheringia* 93(2), 149-158.

Hancock, R. E. & Chapple, D. S. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(6), 1317–1323.

Hancock, R. E. W. 1997. Peptide antibiotics. *Lancet* 349, 418-422.

Hancock, R. E. & Sahl, H. G. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24(12), 1551–1557.

Hann, I. M. & Prentice, H. G. 2001. Lipid-based amphotericin B: A review of the last 10 years of use. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17, 161-169.

Harris, R. 2002. Progress with superficial mycoses using essential oils. *Int. J. Aromath.* 12, 341-344.

Hasan, F.; Xess, I.; Wang, X.; Jain, N. & Fries, B. C. 2009. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect.* 11, 753-761.

Hawser, S. P. & Douglas, L. J. 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect. Immun.* 62, 915–921.

Helmerhost, E. J.; Reijnders, I. M.; Van't Hoff, W.; Veerman, E. C.; Nieuw, A. V. & Amerongen, A. 1999. A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Lett.* 449, 105-110.

Hirsch, E. B. & Tam, V. H. 2010. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 65(6), 1119-1125.

Hong, S. Y.; Oh, J. E. & Lee, K. H. 1999. *In vitro* antifungal activity and cytotoxicity of a novel membrane-active peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(7), 1704-1707.

Horn, D. L.; Neofytos, D.; Anaissie, E. J.; Fishman, J. A.; Steinbach, W. J.; Olyaei, A. J.; Marr, K. A.; Pfaller, M. A.; Chang, C. H. & Webster, K. M. 2009. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1695–1703.

Hoskin, D. W. & Ramamoorthy. 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 357–375.

<http://www.iucnredlist.org/search?page=2>

<http://www.sbherpetologia.org.br/>

Jerala R. & Porro M. 2004. Endotoxin neutralizing peptides. *Curr. Top. Med. Chem.* 4, 1173–1184.

Johnson, E. M. 2008. Issues in antifungal susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* 61(1), i13-i18.

Kim, Y. S. & Cha, H. J. 2010. Disperse distribution of cationic amino acids on hydrophilic surface of helical wheel enhances antimicrobial peptide activity. *Biotechnol. Bioeng.* 107(2), 216-223.

King, J. D.; Al-Ghaferi, N.; Abraham, B.; Sonnevend, A.; Leprince, J.; Nielsen, P. F. & Conlon, J. M. 2005. Pentadactylin: an antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 141, 393-397.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Komatsuzawa, H.; Ouhara, K.; Kawai, T.; Yamada, S.; Fujiwara, T.; Shiba, H.; Kurihara, H.; Taubman, M.A. & Sugai, M. 2007. Susceptibility of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to defensins and potential therapeutic use of defensins in oral diseases. *Curr. Pharm. Des.* 13, 3084-3095.

Lai, C. C.; Wang, C. Y.; Liu, W. L.; Huang, Y. T. & Hsueh, P. R. 2012. Time to positivity of blood cultures of different *Candida* species causing fungaemia. *J. Med. Microbiol.* 61, 701–704.

Lee, D. G.; Hahm, K. S. & Shin, S. Y. 2004. Structure and fungicidal activity of a synthetic antimicrobial peptide, P18, and its truncated peptides. *Biotechnol.Lett.* 26, 337-341.

Lehrer, R. I; Szklarek, D; Ganz, T & Selsted, M. E. 1985. Correlation of binding of rabbit granulocyte peptides to *Candida albicans* with candidacidal activity. *Infect.Immun.* 49, 207–211.

Li, A.; Zhang, Y.; Wang, C.; Wu, G. & Wang, Z. 2013. Purification, molecular cloning, and antimicrobial activity of peptides from the skin secretion of the black-spotted frog, *Rana nigromaculata*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29(10), 1941-1949.

Li, J.; Xu, X.; Xu, C.; Zhou, W.; Zhang, K.; Yu, H.; Zhang, Y.; Zheng, Y.; Rees, H. H.; Lai, R.; Yang, D. & Wu, J. 2007. Anti-infection peptidomics of amphibian skin. *Molecular Cellular Proteomics* 6, 882–894.

Li, Q.; Lawrence, C. B.; Xing, H. Y.; Babbitt, R. A.; Bass, W. T.; Maiti, I. B. & Everett, N. P. 2001. Enhanced disease resistance conferred by expression of an antimicrobial magainin analog in transgenic tobacco. *Planta* 212, 635-639.

Lin, Y.; Hu, N.; Lyu, P.; Ma, J.; Wang, L.; Zhou, M.; Guo, S.; Chen, T. & Shaw, C. 2014. Hylaranins: prototypes of a new class of amphibian antimicrobial peptide from the skin secretion of the oriental broad-folded frog, *Hylarana latouchii*. *Amino Acids* 46(4), 901-909.

Livermore, D. M. 2009. Has the era of untreatable infections arrived? *J. Antimicrob. Chemother.* 64, i29–i36.

Lorin, C.; Saidi, H.; Belaid, A.; Zairi, A.; Baleux, F. & Hocini, H. 2005. The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity *in vitro*. *Virology* 334, 264-275.

Magalhães, B. S.; Melo, J. A.; Leite, J. R.; Silva, L. P.; Prates, M. V.; Vinecky, F.; Barbosa, E. A.; Verly, R. M.; Mehta, A.; Nicoli, J. R.; Bemquerer, M. P.; Andrade, A. C. & Bloch, C. Jr. 2008. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26(4), 1057-1061.

Mannis, M. J. 2002. The use of antimicrobial peptides in ophthalmology: an experimental study in corneal preservation and the management of bacterial keratitis. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 100, 243–271.

Marenah, L., Flatt, P. R., Orr, D. F., Shaw, C., & Abdel-Wahab, Y. 2005. 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* 66, 204-210.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Marenah, L.; Flatt, P. R.; Orr, D. F.; McClean, S.; Shaw, C. & Abdel-Wahab, Y. H. 2004a. Brevinin-1 and multiple insulin-releasing peptides in the skin of the frog *Rana palustris*. *Journal of Endocrinology* 181, 347-354.

Marenah, L.; Flatt, P. R.; Orr, D. F.; McClean, S.; Shaw, C. & Abdel-Wahab, Y. H. 2004b. Skin secretion of the toad *Bombina variegata* contains multiple insulin-releasing peptides including bombesin and entirely novel insulinotropic structures. *J. Biol. Chem.* 385, 315-321.

Marenah, L.; Flatt, P. R.; Orr, D. F.; Shaw, C. & Abdel-Wahab, Y. H. A. 2006. 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* 188, 1-9.

Martinez, L. R. & Fries, B. C. 2010. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. *Curr. Fungal Infect. Rep.* 4, 266–275.

Matsuzaki, K.; Harada, M.; Funakoshi, S.; Fujii, N. & Miyajima, M. 1991. Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1063, 162-170.

Meicken, M.; Holroyd, D. L.; Rautenbach, M. 2005. Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(10), 4085–4092.

Mor, A.; Hani, K. & Nicolas, P. 1994. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms, *J. Biol. Chem.* 269, 31635–31641.

Mystkowska, E. T.; Niemierko, A.; Komar, A. & Sawicki, W. 2001. Embryotoxicity of magainin-2-amide and its enhancement by cyclodextrin, albumin, hydrogen peroxide and acidification. *Hum. Reprod.* 16, 1457-1463.

Nascimento, A. C.; Fontes, W.; Sebben, A. & Castro, M. S. 2003. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein Pept. Lett.* 10, 227-238.

Nett, J.; Lincoln, L.; Marchillo, K.; Massey, R.; Holoyda, K.; Hoff, B.; VanHandel, M. & Andes, D. 2007. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 510-520.

Newman, D.; Cragg, J. & Gordon M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70(3), 461–477.

Nicolas, P.; Vanhoye, D. & Amiche, M. 2003. Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. *Peptides* 24, 1669–1680.

Norrby, S. R.; Nord, C. E. & Finch, R. 2005. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect. Dis.* 5, 115–119.

Nucci, M.; Queiroz-Telles, F.; Toboń, A. M.; Restrepo, A. & Colombo, A. L. 2010. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin. Infect. Dis.* 51, 561–570.

Olson, L. III; Soto, A. M.; Knoop, F. C. & Conlon, J. M. 2001. Pseudin-2: a novel antimicrobial peptide with low hemolytic activity from the skin of the paradoxical frog. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 1001-1005.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Ortega, M.; Marco, F.; Soriano, A.; Almela, M.; Martinez, J. A.; Lopez, J.; Pitart, C. & Mensa, J. 2011. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J. Hosp. Infect.* 77, 157-161.

Pappas, P. G.; Kauffman, C. A. & Andes, D. 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48, 503-535.

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

Park, S.-C.; Park, Y. & Hahm, K.-S. 2011. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 5971-5992.

Penberthy, W. T.; Chari, S.; Cole, A. L. & Cole, A. M. 2011. Retrocyclins and their activity against HIV-1. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2231-2242.

Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 133-163.

Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. 2010. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit. Rev. Microbiol.* 36, 1-53.

Pough, F. H.; Janis, C. M. & Heiser, J. B. 2003. *A vida dos vertebrados*. 3^a ed., São Paulo. Atheneu, 699 pp.

Prates, M. V.; Sforça, M. L.; Regis, W. C.; Leite, J. R.; Silva, L. P.; Pertinhez, T. A.; Araújo, A. L.; Azevedo, R. B.; Spisni, A. & Bloch, C. Jr. 2004. The NMR derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. *J. Biol. Chem.* 279(13), 13018-13026.

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

Queenan, A. M. & Bush, K. 2007. Carbapenemases: the versatile α -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 440-458.

Ramage, G. & Lopez-Ribot, J. L. 2005. Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Methods Mol. Med.* 118, 71-79.

Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D. & Aranha, C. 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents* 24, 536-547.

Rex, J. H.; Pfaller, M. A.; Galgiani, J. N.; Bartlett, M. S.; Espinel-Ingroff, A.; Ghannoum, M. A.; Lancaster, M.; Odds, F. C.; Rinaldi, M. G.; Walsh, T. J. & Barry, A. L. 1997. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin. Infect. Dis.* 24, 235-47.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Rinaldi, A. C. 2002. Antimicrobial peptides from amphibian skin: anexpanding scenario. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 799–804.

Rollins-Smith, L. A.; Carey, C.; Longcore, J.; Doersam, J. K.; Boutte, A.; Bruzgal, J. E. & Conlon, J. M. 2002. Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 471-479.

Rouillé, Y.; Michel, G.; Chauvet, M. T.; Chauvet, J. & Acher, R. 1989. Hydrins, hydroosmotic neurohypophysial peptides: osmoregulatory adaptation in amphibians through vasotocin precursor processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA of the National Academy of Sciences of the USA* 86, 5272-5275.

Sahl, H. G.; Pag, U.; Bonness, S.; Wagner, S.; Antcheva, N. & Tossi, A. 2005. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *J. Leukoc. Biol.* 77, 466–475,

Sebben, A. & Schwartz, C. A. 1993. Defesa química dos anfíbios. *Ciência Hoje* 15(87), 25-33.

Sebeny, P. J.; Riddle, M. S. & Petersen, K. 2008. *Acinetobacter baumannii* skin and soft tissue infection associated with war trauma. *Clin. Infect. Dis.* 47, 444-449.

Shai, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1462, 55-70.

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

Shao, L. C.; Sheng, C. Q. & Zhang, W. N. 2007. Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds. *Yao Xue Xue Bao.* 42, 1129–1136.

Sidrim, J. J. C. & Rocha, M.F.G. 2004. Micologia médica à luz de autores contemporâneos, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Simmaco, M.; Mignogna, G. & Barra, D. 1998. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* 47(6), 435-450,

Simmaco, M.; Mignogna, G.; Canofeni, S.; Miele, R.; Mangoni, M. L. & Barra, D. 1996. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur. J. Biochem.* 242(3), 788-792.

Sitaram, N. & Nagaraj, R. 2002. Host-defense antimicrobial peptides: importance of structure for activity. *Curr. Pharm. Des.* 8, 727-742.

Sokol, O. M. 1977. A subordinal classification of frogs (Amphibia: Anura). *J. Zool.(London)* 82, 505- 508.

Sullivan, D. J.; Moran, G. P.; Pinjon, E.; Al-Mosaid, A.; Stokes, C.; Vaughan, C. & Coleman, D. C. 2004. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 4, 369–376.

Toledo, R. C. & Jared, C. 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 111(1), 1-29.

Tortora, G. J.; Funke, B. R. & Case, C.L. 2003. Microbiologia. 6^a ed., Artes Médicas.

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*

Tortorano, A. M.; Kibbler, C.; Peman, J.; Bernhardt, H.; Klingspor, L. & Grillot, R. 2006. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 27, 359–366.

Turnidge, J. & Paterson, D. L. 2007. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 391-408.

Villegas, M.V.; Lolans, K.; Correa, A.; Kattan, J.N.; Lopez, J.A.; Quinn, J. P. 2007. The Colombian nosocomial resistance study group first identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 1553-1555.

Wade, D. & Weil, A. 1994. *Bufo alvarius*: a potent hallucinogen of animalorigin. *Journal of Ethnopharmacology* 41, 1-8.

White, S. H.; Wimley, W. C. & Selsted, M. E. 1995. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 521–527.

Yeaman, M. R. & Yount, N. Y. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55, 27–55.

Zaiou, M. 2007. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J. Mol. Med.* 85, 317–329

Zaoutis, T. E; Argon, J.; Chu, J.; Berlin, J.A; Walsh, T. J & Feudtner, C. 2005. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1232–1239.

Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(15), 5449-5453.

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

Dissertação de Mestrado

Diego Alejandro Falico

Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps*