

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Avaliação biológica da secreção cutânea da rã *Leptodactylus ocellatus*: peptídeos
citólíticos e proteases**

Tese de doutorado

Anna Christina Carvalho Coutinho do Nascimento

Orientadora: Profa. Dra. Mariana de Souza Castro

Brasília, dezembro de 2007

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mariana de Souza Castro, pela orientação, a paciência e a compreensão.

Ao Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa, pelo apoio ao desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

A Antônio Rufino e Nuno Domingues, pelo apoio operacional e a constante disposição em ajudar.

Ao Prof. Dr. Eduardo Cilli, pela síntese de peptídeos e as discussões.

Ao Prof. Dr. Jaime Santana, ao Dr. Sebastián Charneau, à Dra. Izabela Dourado, e a Flávia, pelo auxílio na caracterização da atividade proteolítica.

À Profa. Dra. Cynthia Kyaw, pelo apoio à realização dos ensaios antimicrobianos.

Ao Dr. Jonas Perales, pela análise MALDI-TOF/TOF MS/MS.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Félix, por nos fornecer a rafinose para o ensaio de osmoproteção.

A Natan Maciel, pela ajuda na utilização do programa PAUP 4.0.

A Adriana Magalhães e Rafael Guércio, pela ajuda com os géis; a Elaine Nascimento, pelo auxílio nos ensaios biológicos, e aos demais colegas do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, pela agradável companhia.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Dr. Wagner Fontes, Dr. Carlos André O. Ricart, MSc. Pedro José P. Zanotta, Dra. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima e Dr. Ricardo Bastos Cunha, pela constante disposição em colaborar.

A Ana Tiberti, secretária de pós-graduação, pelos auxílios prestados.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), à FINATEC (Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos) e à FUB/UnB (Fundação Universidade de Brasília), que possibilitaram a realização do presente trabalho.

A meus pais, Maria Lúcia e Hugo, por sempre terem apoiado meus estudos.

A Caio B. F. W. Abramo, pelo carinho e o companheirismo.

ÍNDICE

	Página
Lista de abreviaturas	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	x
Resumo	xi
Abstract.....	xii
I – INTRODUÇÃO	1
II – JUSTIFICATIVA	9
III – OBJETIVO GERAL.....	10
IV – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
V – METODOLOGIA.....	10
1. Preparação da secreção cutânea.....	10
2. Fracionamento da secreção.....	11
3. Quantificação de material protéico.....	11
4. Ensaio antibacterianos.....	12
5. Ensaio antifúngico	13
6. Ensaio hemolíticos	14
7. Espectrometria de massa	15
8. Seqüenciamento automático de peptídeos.....	16
9. Síntese química de análogos de <i>ocellatin 4</i>	16

10. Avaliações de atividade proteolítica.....	17
11. Bioinformática.....	20
VI – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
1. Prospecção de peptídeos citolíticos.....	21
<i>Ocellatin 4</i>	24
<i>Ocellatin 5</i>	34
2. Investigação da relação entre estrutura e atividade de peptídeos.....	37
3. Estudo preliminar da atividade proteolítica na secreção de <i>L. ocellatus</i>	43
VII – PERSPECTIVAS.....	49
VIII – CONCLUSÃO.....	51
IX – REFERÊNCIAS.....	53
X – APÊNDICE.....	61
Artigo publicado pela revista <i>Toxicon</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ATTC. *American Type Culture Collection.*

CFU. Unidade formadora de colônia.

F-R-AMC. *N-CBZ-Phe-Arg-7- amide-4-methylcoumarin.*

G-P-AMC. *Gly-Pro-7-amide-4-methylcoumarin.*

G-P-L-G-P-AMC. *N-succinyl-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-7-amide-4-methylcoumarin.*

HC₅₀. Concentração capaz de promover 50% de hemólise.

HCCA. Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.

I-A-AMC. *N-succinyl-Ile-Ala-7-amide-4-methylcoumarin.*

L-AMC. *L-Leu-7-amide-4-methylcoumarin hydrochloride.*

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

MIC. Concentração inibitória mínima.

MM. Massa molecular.

MME. Massa molecular experimental.

MMT. Massa molecular teórica.

MOPS. Ácido morfolinopropano sulfônico.

NCTC. *National Collection of Type Cultures.*

PAGE. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

PTH. Feniltioidantoína.

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

RPMI. *Roswell Park Memorial Institute.*

SDS. Dodecil sulfato de sódio.

TCA. Ácido tricloroacético.

TFA. Ácido trifluoroacético.

TFE. Trifluoroetanol.

UV. Ultravioleta.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Glândulas da pele de anfíbio anuro.....	1
Figura 2. Precursores dos peptídeos <i>dermaseptins S</i>	2
Figura 3. Alguns possíveis mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos.....	6
Figura 4. <i>Leptodactylus ocellatus</i>	8
Figura 5. Sondagem de atividades antibacteriana e hemolítica com frações cromatográficas da secreção cutânea de <i>L. ocellatus</i>	22
Figura 6. Alinhamento múltiplo entre os peptídeos caracterizados e <i>ocellatins</i> 1, 2 e 3.....	23
Figura 7. Purificação e determinação da massa molecular de <i>ocellatin</i> 4.....	25
Figura 8. Curva de hemólise do peptídeo <i>ocellatin</i> 4.....	26
Figura 9. Similaridade entre <i>ocellatin</i> 4 e peptídeos de leptodactilídeos e hilídeos.....	28
Figura 10. Similaridade entre <i>ocellatin</i> 4 e alguns peptídeos hemolíticos.....	31
Figura 11. Projeções de Schiffer e Edmundson e atividades de quatro peptídeos de leptodactilídeos.....	32
Figura 12. Projeções de Schiffer e Edmundson e atividades de quatro peptídeos hemolíticos.....	34
Figura 13. Alinhamentos múltiplos entre <i>ocellatin</i> 5 e outros peptídeos de leptodactilídeos.....	35
Figura 14. Projeção de Schiffer e Edmundson de <i>ocellatin</i> 5.....	37
Figura 15. Seqüências de <i>ocellatin</i> 4 e dos análogos produzidos por síntese química.....	38
Figura 16. Projeções de Schiffer e Edmundson dos peptídeos “S5;K7;A10;N12”, <i>ranatuerin</i> 2B e <i>pentadactylin</i>	39
Figura 17. Projeções de Schiffer e Edmundson de <i>ocellatin</i> 4 e dos análogos sintéticos.....	41

Figura 18. Pontos de clivagem observados nos fragmentos de <i>ocellatins</i> 1 a 5, <i>syphaxin</i> e <i>fallaxin</i>	45
Figura 19. Fluorescência originada pela clivagem proteolítica de dois substratos pela secreção de <i>L. ocellatus</i>	46
Figura 20. SDS-PAGE da fração cromatográfica proteolítica da secreção de <i>L. ocellatus</i> em gel 12% corado com prata.....	47
Figura 21. Atividade gelatinolítica da secreção de <i>L. ocellatus</i> em SDS-PAGE 10%-gelatina 0,1%.	48

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Propriedades dos análogos sintéticos de <i>ocellatin 4</i>	40
Tabela 2. Atividade biológica dos análogos de <i>ocellatin 4</i>	42
Tabela 3. Fragmentos de <i>ocellatins</i> detectados por MALDI-TOF MS.....	44

RESUMO

Cerca de 94% dos peptídeos de secreção cutânea de anfíbios anuros caracterizados até o momento foram isolados de espécies das famílias Bombinatoridae, Hylidae e Ranidae, enquanto os repertórios peptídicos dos anfíbios das outras mais de 40 famílias são, ainda, pouco conhecidos. A família Leptodactylidae, à qual pertence a rã sul-americana *Leptodactylus ocellatus*, é uma das pouco estudadas no que diz respeito a peptídeos de secreção cutânea, de modo que apenas oito peptídeos de leptodactilídeos haviam sido descritos até então. O presente trabalho resultou na caracterização de dois novos peptídeos da secreção cutânea de *L. ocellatus*: *ocellatins* 4 e 5, que possuem, respectivamente, 21 e 17 resíduos de aminoácidos e apresentam atividades antibacteriana e hemolítica. Verificou-se, ainda, a ocorrência de outros componentes hemolíticos na secreção de *L. ocellatus*, o que indica uma possível necessidade de proteção contra ectoparasitas. Foi, também, realizado um estudo preliminar da relação entre estrutura e atividade dos peptídeos, o qual consistiu na síntese de análogos de *ocellatin* 4, modificados por substituição, deleção ou inserção de resíduos de aminoácidos, e na avaliação das atividades hemolítica, antibacteriana e antifúngica desses análogos. Finalmente, verificou-se a ocorrência de proteases ativas na secreção de *L. ocellatus*, por meio de ensaios que utilizaram caseína, gelatina e substratos fluorogênicos para evidenciar a atividade proteolítica.

ABSTRACT

About 94% of all amphibian skin secretion peptides characterized to date have been isolated from species belonging to the families Bombinatoridae, Hylidae and Ranidae, while little is known about the peptide repertoires of frogs from the other more than 40 families. The Leptodactylidae family, which includes the South American frog *Leptodactylus ocellatus*, is one that has been subjected to few studies of skin secretion peptides, hence only eight leptodactylid peptides had been so far described. The present work has led to the characterization of *ocellatins* 4 and 5, two new peptides from the skin secretion of *L. ocellatus*, with 17 and 21 amino acid residues and showing hemolytic and antibacterial activities. The presence of other hemolytic compounds in the secretion of *L. ocellatus* has been observed and may indicate the need of molecular defense against external parasites. Preliminary studies of the relationship between structure and activity of peptides have been conducted as well, by means of comparing the hemolytic, antibacterial and antifungal activities of synthetic analogs of *ocellatin* 4 in which the sequence had been altered by substitution, deletion or insertion of amino acid residues. Lastly, we confirmed the occurrence of active proteases in the secretion of *L. ocellatus* by performing assays that used casein, gelatin or fluorogenic substrates to evidence proteolytic activity.

I – INTRODUÇÃO

A classe Amphibia compreende três ordens: Anura (sapos e rãs), Caudata (salamandras) e Gymnophiona (cecílias) (Duellman & Trueb, 1994), sendo Anura a maior ordem, com cerca de 5453 espécies, pertencentes a, pelo menos, 45 famílias (Frost, 2007). Inicialmente aquáticos, os anfíbios puderam passar a viver também em ambientes terrestres graças ao desenvolvimento de adaptações morfológicas e fisiológicas, sendo uma das principais o desenvolvimento de um tegumento altamente especializado. Diversas funções fisiológicas são desempenhadas pela pele dos anfíbios, como respiração cutânea, osmorregulação, termorregulação e secreção de compostos de defesa, que constituem uma barreira inicial contra predação, parasitoses e infecções (Stebbins & Cohen, 1995). Muitos dos compostos de defesa são de natureza protéica.

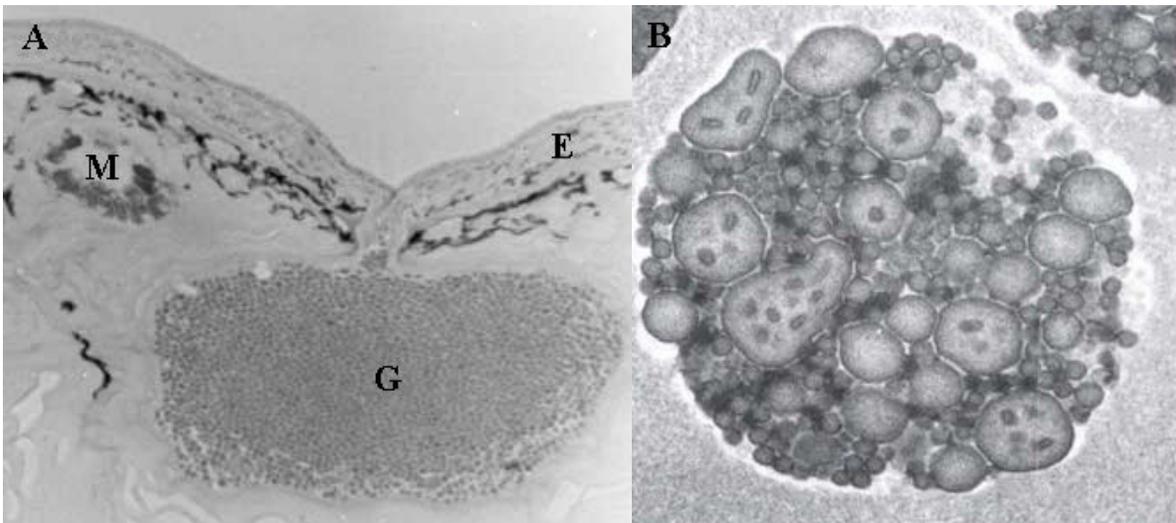


Figura 1. Glândulas da pele de anfíbio anuro. A) Secção transversal da pele dorsal de *Odontophrynus cultripes* (Cycloramphidae), revelando epiderme (E); glândula granulosa (G) e glândula mucosa (M). B) Eletromicrografia do lúmen de uma glândula granulosa. (Nascimento *et al.*, 2003)

A pele dos anfíbios apresenta dois tipos de glândulas acinares: mucosa e granulosa (Toledo & Jared, 1995) (Fig. 1). As glândulas mucosas, em geral mais numerosas, secretam mucinas, envolvidas na lubrificação e na manutenção da umidade da pele, na termorregulação e na osmorregulação. As glândulas granulosa secretam a maior parte dos compostos com atividade biológica, incluindo peptídeos de defesa.

Os peptídeos da secreção cutânea de anfíbios anuros são originados a partir do processamento proteolítico de precursores polipeptídicos constituídos por três regiões principais: o peptídeo-sinal, uma seqüência espaçadora ácida, rica nos aminoácidos hidrofílicos aspartato (D) e glutamato (E), e um domínio C-terminal contendo a seqüência do peptídeo maduro (Fig. 2). O peptídeo-sinal endereça o polipeptídeo à glândula granulosa antes do processamento proteolítico. A primeira clivagem proteolítica remove o peptídeo-sinal, expondo a seqüência ácida, que se hidrata, contribuindo para manter o polipeptídeo ainda inativo. A segunda clivagem, que remove a seqüência ácida, liberando peptídeos ativos, ocorre apenas quando a atividade secretora é estimulada (Apponyi *et al.*, 2004).

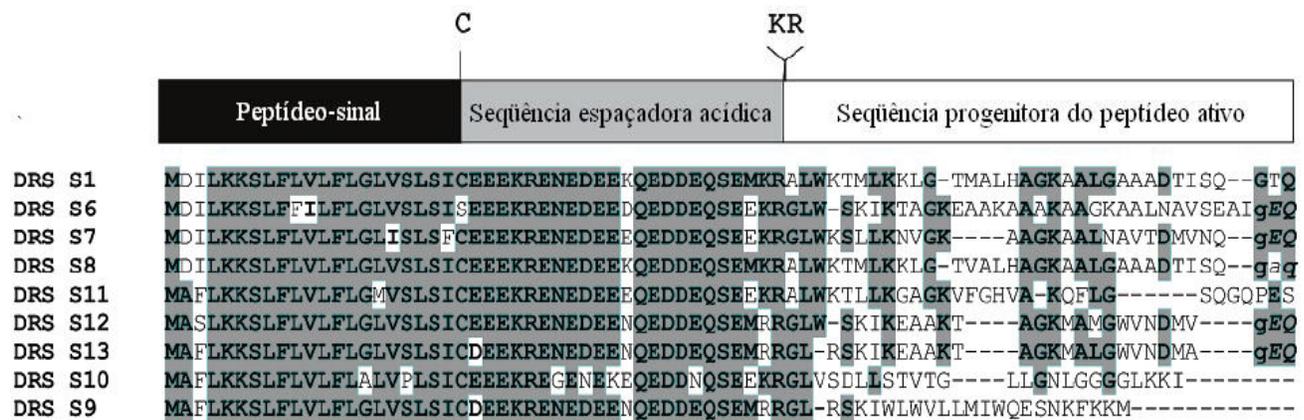


Figura 2. Precursores dos peptídeos *dermaseptins S*, da secreção cutânea da rã *Phyllomedusa sauvagei* (Hylidae).

Resíduos conservados destacam-se em cinza. (Modificado de: Lequin *et al.*, 2006)

Depois de secretados, os peptídeos sofrem, ainda, outras clivagens, o que indica que algumas proteases são estocadas nas glândulas granulosas e secretadas simultaneamente com os peptídeos. Entretanto, os mecanismos pelos quais se dá a compartimentalização entre proteases e peptídeos no interior das glândulas granulosas ainda não foram elucidados (Resnick *et al.*, 1991). O processamento proteolítico pode originar um repertório de peptídeos similares, porém com diferentes tamanhos, cargas e espectro de ação (Epanand & Vogel, 1999; Amiche *et al.*, 1999), o que oferece proteção otimizada ao anfíbio a um baixo custo metabólico (Charpentier *et al.*, 1998).

O interesse científico na atividade antimicrobiana apresentada por peptídeos de secreção cutânea de anfíbio emergiu após a purificação do peptídeo *bombinin*, da rã *Bombina variegata* (Bombinatoridae), por Csordas & Michl (1969), e foi impulsionado pela caracterização dos peptídeos *magainins*, de *Xenopus laevis* (Pipidae) (Zasloff, 1987).

Em geral, os peptídeos antimicrobianos de anuros apresentam seqüências de 10 a 46 resíduos de aminoácidos, contendo vários resíduos positivamente carregados, que os tornam catiônicos, e vários resíduos hidrofóbicos (Barra & Simmaco, 1995). A conformação mais comum é a α -hélice anfipática (Oren & Shai, 1998), que dispõe as cadeias laterais dos aminoácidos polares em um mesmo lado e as cadeias apolares no lado oposto, propiciando a interação entre peptídeos e membranas biológicas (Dathe & Wieprecht, 1999). A ocorrência de amidação C-terminal, modificação pós-traducional que confere maior carga positiva à molécula e estabiliza regiões helicoidais, é bastante bastante freqüente entre os peptídeos de defesa dos anfíbios (Pukala *et al.*, 2006b).

A maioria dos peptídeos antimicrobianos de anuros estudados até o momento foi isolada de de rãs das famílias Hylidae e Ranidae. Os peptídeos de hílídeos costumam pertencer a um dos seguintes grupos: (1) antimicrobianos de amplo espectro semelhantes a *citropin 1* (peptídeo de rã do

gênero *Litoria*); (2) antimicrobianos de amplo espectro semelhantes a *caerin 1* e *maculatin 1* (ambos, também, de rãs do gênero *Litoria*) e (3) antimicrobianos de espectro restrito.

Os peptídeos do primeiro grupo apresentam estrutura em hélice com faces hidrofóbica e hidrofílica bem definidas e são ativos contra bactérias, especialmente Gram-positivas. Os peptídeos do segundo grupo são ativos contra bactérias, fungos e vírus e possuem regiões helicoidais nas extremidades, sendo essas regiões unidas por um segmento flexível essencial à atividade. Muitos peptídeos antimicrobianos de amplo espectro apresentam, em adição, atividade contra células cancerosas (Pukala *et al.*, 2006b). Os peptídeos do terceiro grupo, de espectro de ação restrito, são ativos apenas contra determinadas bactérias Gram-negativas e não apresentam amidação C-terminal.

Assim como os peptídeos com espectro de ação restrito dos hilídeos, os peptídeos de ranídeos, em geral, não são amidados no C-terminal, porém, costumam apresentar pontes dissulfeto na região C-terminal e amplo espectro de ação (Pukala *et al.*, 2006b).

Muitos peptídeos antimicrobianos de anfíbios apresentam carga líquida igual ou superior a +2, o que favorece a interação com fosfolipídeos negativamente carregados, presentes em membranas bacterianas (Biggin & Sansom, 1999; Blondelle *et al.*, 1999). Em contrapartida, a interação com fosfolipídeos zwitteriônicos, expostos na face extracelular da membrana plasmática de eritrócitos, costuma ser mais fraca (Lohner & Prenner, 1999; Matsuzaki, 1999). Conseqüentemente, grande parte dos peptídeos catiônicos apresenta atividade seletiva contra bactérias. Peptídeos com cargas fracas, no entanto, costumam apresentar atividade citolítica contra células eucarióticas (Shai, 1999).

A interação de peptídeos catiônicos com as membranas de microorganismos ocasiona desequilíbrio osmótico e leva rapidamente à lise celular (Zaslouff, 2002; Hancock & Chapple, 1999), o que contrasta com o mecanismo de ação de antibióticos clássicos, que se baseia em inibições enzimáticas e é relativamente lento (Lohner & Prenner, 1999). Alguns experimentos revelaram que

determinados peptídeos, em contato com bicamadas lipídicas, causam formação de canais iônicos voltagem-dependentes, heterogêneos em tamanho e duração (Hancock & Chapple, 1999).

Um dos modelos de mecanismos de ação que explicam a formação de canais é o *barrel-stave*, proposto inicialmente para o peptídeo *alamethicin*, do fungo *Trichoderma viride*. Segundo o modelo *barrel-stave*, peptídeos na forma monomérica aderem à membrana celular e nela se inserem. Os monômeros inseridos unem-se de modo a circundar um poro aquoso (Fig. 3B), o qual pode ter seu tamanho aumentado na medida em que mais monômeros inserem-se na membrana (Oren *et al.*, 1999).

Um outro mecanismo foi proposto para peptídeos que podem interagir fortemente com os lipídeos de membrana, formando dobras na camada lipídica: a formação de poros toroidais. De acordo com esse mecanismo, um peptídeo com estrutura em α -hélice insere-se perpendicularmente na bicamada fosfolipídica e mantém, ao longo de sua estrutura helicoidal, ligações com lipídeos adjacentes, o que ocasiona rearranjos na bicamada e leva à formação de um canal iônico (Biggin & Sansom, 1999) (Fig. 3C). O peptídeo *magainin*, de *Xenopus laevis*, forma poros toroidais em membranas (Ludtke *et al.*, 1996).

A conformação em α -hélice é, provavelmente, necessária à formação de poros, pois permite a inserção dos peptídeos na membrana. Entretanto, verificou-se que certos peptídeos sintéticos contendo D-aminoácidos (o que altera a estrutura em hélice) apresentavam atividade semelhante à de L-peptídeos helicoidais (Shai, 1999). Tais observações indicaram a existência de mecanismos de atividade citolítica independentes de estrutura em α -hélice e modelos baseados em interações superficiais com membranas foram propostos.

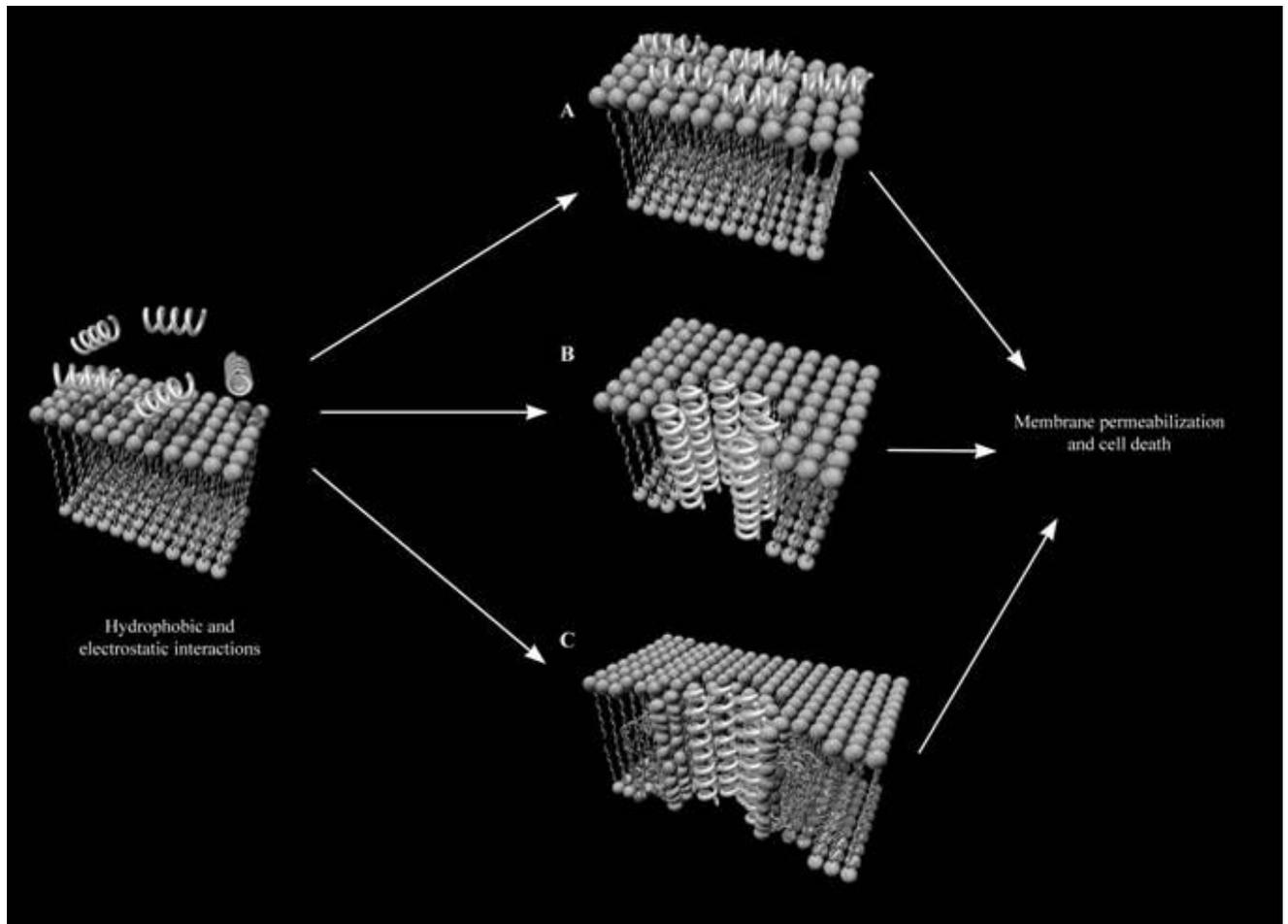


Figura 3. Alguns possíveis mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos. A) *Carpet-like*; B) *barrel-stave* e C) poro toroidal. (Nascimento *et al.*, 2003)

Segundo o mecanismo *carpet-like* (Fig. 3A), moléculas de peptídeo saturam a superfície da membrana e sofrem rotação, direcionando seus resíduos apolares ao interior hidrofóbico da bicamada, o que altera o arranjo lipídico e leva à desintegração da membrana (Oren *et al.*, 1999; Ghosh *et al.*, 1997). Esse modelo foi corroborado por experimentos de fluorescência e dicroísmo circular, que revelaram que as moléculas de alguns peptídeos orientam-se paralelamente à membrana até a concentração de 3,3 mol%, a partir da qual peptídeos como *magainin* e *alamethicin* assumem orientação perpendicular (Biggin & Sansom, 1999; Bechinger, 1999).

Há um modelo de mecanismo de ação que combina interações superficiais e formação de poros, o de Shai–Matsuzaki–Huang, segundo o qual moléculas de peptídeo aderem à face extracelular da membrana plasmática, tensionando-a e reduzindo sua espessura, de modo a formar poros transitórios. Moléculas de peptídeo podem passar pelos poros, alcançando a face interna da membrana e outros elementos intracelulares (Zasloff, 2002).

Além dos quatro mecanismos descritos, a atividade antimicrobiana de peptídeos de anfíbios pode, ainda, decorrer da inibição da síntese de DNA em microorganismos (Blondelle *et al.*, 1999). Devido à grande quantidade de variáveis envolvidas na ação dos peptídeos, diversos aspectos ainda não foram totalmente esclarecidos, como os fatores determinantes do mecanismo de ação, a ocorrência de mais de um mecanismo de ação para uma mesma molécula e a relação entre o espectro de ação e as estruturas primária e secundária do peptídeo.

A elucidação destes aspectos poderá ser de grande contribuição para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos de natureza peptídica. A terapia baseada em peptídeos pode oferecer algumas vantagens significativas, como a ação rápida e independente de receptores, que reduz bastante a probabilidade do tratamento ocasionar a seleção de genes de resistência em patógenos (Feder *et al.*, 2000; Krugliak *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 1997), e a sinergia observada em combinações de alguns peptídeos antimicrobianos com antibióticos clássicos ou com outros peptídeos (Charpentier *et al.*, 1998), o que favorece o uso em coquetéis.

Tendo em vista a necessidade de ampliação dos conhecimentos sobre os peptídeos antimicrobianos de anfíbios, iniciamos, no ano de 2001, o estudo dos peptídeos da secreção cutânea da rã sul-americana *Leptodactylus ocellatus* (Fig. 4), pertencente à família Leptodactylidae e comumente encontrada no Brasil. Considera-se, atualmente, que a família Leptodactylidae compreende 90 espécies, das quais 80 pertencem ao gênero *Leptodactylus* (Frost, 2007). Entretanto, as relações monofiléticas dentro da família e do gênero ainda não foram completamente

determinadas. As rãs da espécie *L. ocellatus* alimentam-se, principalmente, de insetos, aracnídeos, miriápodes e anelídeos, e seu comprimento geralmente varia entre 8,0 e 11,0 cm, para fêmeas, e entre 9,0 e 12,0 cm, para machos (Dietl *et al.*, 2004).

A etapa inicial do estudo dos peptídeos da secreção cutânea de *L. ocellatus* foi concluída em 2003, com a caracterização de três peptídeos antimicrobianos e hemolíticos: *ocellatins* 1, 2 e 3. *Ocellatin* 1 possui 25 resíduos de aminoácido, enquanto *ocellatins* 2 e 3 possuem 21, e os três peptídeos apresentam amidação C-terminal (Nascimento *et al.*, 2004). O presente trabalho consistiu na continuidade desse estudo e incluiu a caracterização de dois novos peptídeos, a investigação da relação entre estrutura e atividade de peptídeos e a evidência da ocorrência de proteases ativas na secreção de *L. ocellatus*.



Figura 4. *Leptodactylus ocellatus*. (Foto: Antonio Sebben)

II – JUSTIFICATIVA

Embora os peptídeos da secreção cutânea de anfíbios venham sendo objeto de pesquisas há 20 anos, a maioria das famílias de anuros ainda não teve seus peptídeos estudados. Atualmente, existem, no banco de dados Uniprot, 679 registros de peptídeos de pele ou secreção cutânea de anfíbios anuros, sendo que 94% desses registros são referentes a apenas três famílias: Bombinatoridae (8%), Hylidae (21%) e Ranidae (65%).

A família Leptodactylidae, à qual pertence *L. ocellatus* (Fig. 4), é uma das mais de 42 famílias ainda pouco estudadas quanto a peptídeos de secreção cutânea. Excetuando-se *L. ocellatus*, objeto de nossos estudos, dentre as 90 espécies de leptodactilídeos apenas *Leptodactylus fallax*, *Leptodactylus laticeps*, *Leptodactylus pentadactylus* e *Leptodactylus syphax* tiveram o repertório peptídico de suas secreções cutâneas estudado, o que proporcionou a caracterização de cinco peptídeos.

A secreção cutânea de cada espécie de anfíbio apresenta um repertório único de peptídeos e proteínas com tamanho, carga, hidrofobicidade, conformação e espectro de ação distintos das moléculas produzidas por outras espécies (Duda *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2003). O estudo do maior número possível de peptídeos de anfíbios é importante para que, futuramente, possam ser esclarecidos os aspectos que ainda permanecem obscuros, como a regulação do processamento proteolítico dos peptídeos e os fatores determinantes de mecanismo e espectro de ação. Além disso, a caracterização dos repertórios peptídicos de diversas espécies de anuros contribui para ampliar os conhecimentos sobre a biologia dos anfíbios, visto que, muitas vezes, o conteúdo peptídico da secreção cutânea reflete aspectos relacionados aos hábitos dos animais e à pressão a que estão sujeitos em seu ambiente.

III – OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral contribuir para a ampliação do conhecimento acerca dos peptídeos de defesa encontrados na secreção cutânea dos anfíbios anuros, por meio do estudo da secreção cutânea da rã sul-americana *Leptodactylus ocellatus*.

IV – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O projeto teve como objetivos específicos a caracterização de dois novos peptídeos citolíticos da secreção cutânea de *L. ocellatus*; a verificação da ocorrência de proteases ativas e formas processadas de peptídeos na secreção de *L. ocellatus* e o estudo da relação entre estrutura e atividade biológica de peptídeos.

V – METODOLOGIA

1. Preparação da secreção cutânea

Espécimes de *L. ocellatus* adultos foram coletados no Distrito Federal e mantidos nas dependências do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília. Por meio de estímulo elétrico suave, técnica que não prejudica os anfíbios (Apponyi *et al.*, 2004), obteve-se a secreção cutânea, que foi lavada da pele do animal com água Milli-Q, coletada em béquer e liofilizada.

2. Fracionamento da secreção

Cada alíquota de 10,0 mg de secreção cutânea liofilizada foi solubilizada em 200 µL de TFA 0,1% (v/v) em água e submetida a RP-HPLC em coluna C₁₈ (VYDAC 218TP1010, 10 x 250 mm), previamente equilibrada com TFA 0,1% (v/v) em água. Utilizou-se um gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, elevando-se a concentração de 0 a 60% em 60 min, com fluxo de 2,5 mL/min. A eluição foi monitorada por absorvância UV em 216 nm e as frações correspondentes aos picos foram manualmente coletadas e secadas a vácuo.

As frações de interesse foram recromatografadas em coluna Vydac C₁₈ 218TP54, 4,6 x 250 mm, equilibrada com TFA 0,1% (v/v) em água. O gradiente utilizado variou de acordo com o tempo de retenção da amostra. A corrida foi feita com fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV em 216 nm. Os peptídeos purificados foram coletados, secados a vácuo e utilizados nos experimentos subseqüentes.

3. Quantificação de material protéico

A fim de determinar as concentrações das alíquotas que seriam utilizadas nos ensaios proteolíticos, a quantificação do conteúdo protéico da secreção cutânea de *L. ocellatus* foi realizada por meio do microensaio de Bradford (Kruger, 2002), com curva de calibração construída a partir de diluições de albumina sérica bovina 100 µg/mL. A quantificação de peptídeos puros para a realização dos ensaios antimicrobianos e hemolíticos foi realizada por pesagem em microbalança.

4. Ensaio antibacterianos

Linhas referenciais de bactérias, obtidas do Banco de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP), foram cultivadas em 5 mL de meio Mueller-Hinton, sob agitação, a 37°C. Quando a densidade ótica em 590 nm atingiu o valor de 1,0, cada suspensão bacteriana inicial foi diluída em meio Mueller-Hinton fresco, nas proporções de 1:50 (v/v) para bactérias Gram-negativas e 1:100 (v/v) para Gram-positivas. As amostras foram solubilizadas em água Milli-Q estéril e incubadas com a suspensão bacteriana diluída, numa proporção de 1:1 (v/v), em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato). Como controle representativo da ausência de proliferação bacteriana, incubou-se formaldeído 0,4% (v/v) com a suspensão bacteriana; como controle representativo da proliferação máxima, incubou-se a suspensão bacteriana com água Milli-Q autoclavada. Após a incubação, as placas foram analisadas em 595 nm, em leitora BioRad 3550-UV.

Sondagem de atividade antimicrobiana

As frações cromatográficas da secreção cutânea de *L. ocellatus* foram submetidas, individualmente, ao ensaio antimicrobiano com as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, com incubação por 18 h a 37°C.

Determinação de MIC

Foram realizadas determinações de MIC (menor concentração de peptídeo em que não houve crescimento bacteriano detectável) para as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Alíquotas de 50 µL de diluições seriadas de cada peptídeo puro, feitas a partir de uma solução-estoque 256 µM esterilizada por filtração em filtros Millex GV 0,22 µm, foram incubadas com 50 µL de suspensão bacteriana, contendo de 2 a 7 x 10⁵ CFU, por um período de 21 a 23 h, a 37°C. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5. Ensaio antifúngico

A atividade dos análogos hemolíticos de *ocellatin* 4 foi testada contra os fungos *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012. As determinações de MIC foram realizadas com base no método de microdiluição recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), porém incluindo duas modificações: a utilização de meio de cultura RPMI-1640 com L-glutamina, tamponado em pH 7,0 com MOPS 0,165 M e NaOH 1,0 M e suplementado com glicose 18 g/L, e o ajuste espectrofotométrico do inóculo para que correspondesse à turbidez 0,5 na escala de McFarland. Os peptídeos foram diluídos no meio de cultura e alíquotas de 100 µL foram aplicadas em placas de microtitulação (96 poços, fundo chato). As placas foram mantidas a -20°C até a inoculação, com 100 µL de cultura em cada poço, resultando numa concentração final de 2,0 x 10³ CFU/mL, e incubadas por 48 h. A densidade ótica foi determinada em 490 nm.

6. Ensaio hemolítico

Hemácias humanas O⁺ foram separadas do plasma por sedimentação e lavadas três vezes com tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M. Utilizou-se o mesmo tampão para preparar uma suspensão 1% (v/v) de hemácias e solubilizar as amostras. Em tubos de 1,5 mL, 100 µL da suspensão de hemácias foram incubados com 100 µL da amostra por 60 min, à temperatura ambiente. Foram também incubados com 100 µL da suspensão de hemácias 100 µL de Triton X-100 1% (v/v), constituindo a referência para 100% de hemólise, e 100 µL do tampão Tris, referência para 0%. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 2 min e alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes foram transferidas para placas de microtitulação de 96 poços, analisadas em 405 nm, em leitora BioRad 3550-UV.

Sondagem de atividade hemolítica

As frações cromatográficas da secreção cutânea de *L. ocellatus* foram submetidas, individualmente, ao ensaio hemolítico.

Determinação de HC₅₀

Diluições seriadas feitas a partir de soluções 128 µM de cada peptídeo puro foram incubadas com a suspensão de hemácias. Com os resultados das diversas concentrações, foi construída, por regressão logarítmica, uma curva de hemólise e, a partir da equação desta, foi determinado o valor da concentração capaz de promover 50% de hemólise (HC₅₀). O ensaio foi realizado em triplicata.

Proteção osmótica

A atividade hemolítica dos peptídeos foi testada na presença dos carboidratos arabinose (diâmetro molecular = 0,62 ηm), sacarose (0,92 ηm) e rafinose (1,14 ηm) (Clinkenbeard & Thiessen, 1991), na concentração final de 0,05 M, a fim de investigar se os peptídeos causam a formação de poros na membrana celular das hemácias e estimar o diâmetro funcional dos poros.

7. Espectrometria de massa

MALDI-TOF MS

Utilizou-se o espectrômetro de massa Reflex IV (Bruker Daltonics) para a determinação dos valores das massas moleculares dos peptídeos estudados. As amostras foram dissolvidas em água Milli-Q e, em placa de aço inoxidável, foram aplicados 1 μL de amostra e 1 μL de solução 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de matriz HCCA em TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v). A análise foi feita no modo íon positivo refletor e a escala de massas foi calibrada com Peptide Mix (Bruker Daltonics). O espectro foi analisado de 800 a 3000 m/z.

MALDI-TOF/TOF MS/MS

Para confirmar a presença de amidação C-terminal no peptídeo *ocellatin 4*, realizou-se a análise no espectrômetro Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer, com potencial de aceleração máximo de 20 kV, no modo íon positivo refletor. Em placa de aço inoxidável, misturou-se 0,4 μL do peptídeo dissolvido em TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v) a um igual volume

de matriz HCCA 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila 50% e deixou-se secar ao ar. A calibração foi feita com peptídeos de massas conhecidas e os espectros foram coletados usando-se 2400 tiros de laser, com o supressor metaestável ligado e o gás CID desligado.

8. Seqüenciamento automático de peptídeos

A estrutura primária dos peptídeos foi determinada por degradação de Edman, em seqüenciador automático Applied Biosystems 477A modificado como descrito por Fontes *et al.* (1998). PTH-aminoácidos foram identificados utilizando-se coluna de fase reversa PTH-C₁₈ acoplada a equipamento de HPLC Applied Biosystems 120A. O sistema cromatográfico foi calibrado com padrões de PTH-aminoácidos antes de cada análise.

9. Síntese química de análogos de *ocellatin 4*

Análogos de *ocellatin 4* contendo substituições, deleção ou inserção de resíduos de aminoácidos foram sintetizados manualmente, segundo o protocolo de Atherton e Sheppard (1989). Utilizaram-se os seguintes grupos de proteção da cadeia lateral: Boc (t-butoxicarbonil) para K; tBut (t-butil) para D, T e E e Pmc (2,2,5,7,8 pentametil-chromane-6-sulfonil) para Q e N. Cada ciclo de síntese consistiu na desproteção de Na-Fmoc com piperidina/dimetilformamida 20% (v/v) durante 20 min, seguida por lavagem com diclorometano e dimetilformamida e acoplamento ao próximo resíduo. Ao final da síntese, a clivagem do peptídeo foi realizada em um coquetel contendo água ultrapura 5% (v/v); fenol 5% (v/v); 1,2 etanoditiol 2,5% (v/v) e tioanisol 5% (v/v) em TFA, por 2 h, sob agitação. O peptídeo foi, então, precipitado com éter etílico gelado e filtrado em placa porosa juntamente com a resina. O peptídeo, retido na placa, foi dissolvido em solução aquosa de ácido

acético 10% (v/v) e separado da resina por filtração. O filtrado foi liofilizado, solubilizado em TFA 0,045% (v/v) em água (solvente A) e purificado por RP-HPLC, utilizando-se coluna semi-preparativa (Beckman C18 1 cm x 25 cm), gradiente linear de 10 a 40% de TFA 0,036% (v/v) em acetonitrila (solvente B) durante 90 min, detecção em 220 nm e fluxo de 5 mL/min. A homogeneidade do peptídeo sintético foi verificada por corrida em aparelho de RP-HPLC analítico (Varian), com gradiente de 5 a 95% do solvente B durante 30 min, fluxo de 1,5 mL/min e detecção em 220 nm. A identidade do peptídeo sintético foi confirmada por espectrometria de massa do tipo *electrospray* (Micromass, UK) e análise de aminoácidos (Shimadzu model LC-10A/C-47A).

10. Avaliações de atividade proteolítica

Ensaio espectrofotométrico com caseína

O ensaio foi realizado como descrito por Sousa (2003). A uma alíquota de 10 µg de secreção de *L. ocellatus* (quantificada por microensaio de Bradford), solubilizada em 250 µL de tampão HEPES 100 mM pH. 8,0, acrescentaram-se 500 µL de solução de caseína 0,1% (p/v), preparada com o tampão HEPES. Como controle negativo, adicionaram-se 250 µL de tampão a 500 µL da solução de caseína. A incubação foi feita a 37°C, por 80 min, e em gelo, por 40 min. Ao final, acrescentou-se 1,25 mL de TCA 10% para parar a reação. A amostra e o controle foram centrifugados a 10 000 rpm por 10 min e fez-se a leitura de absorvância em 280 nm, em cubetas de quartzo.

Sondagem de atividade proteolítica

As frações cromatográficas da secreção cutânea de *L. ocellatus* foram submetidas, individualmente, ao ensaio caseinolítico.

Ensaio preliminar de inibição

Um comprimido de coquetel inibidor Complete-Mini Roche foi solubilizado em água Milli-Q (1,0 mL), segundo instruções do fabricante. 10 µg de secreção em 100 µL de tampão HEPES 100 mM pH 8,0 foram incubados com 150 µL do coquetel por 30 min. O controle representativo da ausência de atividade proteolítica foi preparado com 100 µL de tampão HEPES e 150 µL de água Milli-Q e, como controle representativo da ocorrência de atividade proteolítica, 10 µg de secreção de *L. ocellatus* em 100 µL de tampão HEPES foram incubados com 150 µL de água Milli-Q. Acrescentamos 500 µL de solução de caseína 0,1% (p/v) a cada tubo e realizamos o ensaio caseinolítico, como descrito.

Determinação de temperatura e pH ótimos

O efeito da temperatura foi verificado realizando-se o ensaio caseinolítico com incubação a 25, 40 e 60°C. Para a verificação do efeito do pH, o ensaio caseinolítico foi realizado com os tampões: acetato de sódio 100 mM pH 4,0 e pH 5,0; fosfato de sódio 100 mM pH 6,0; HEPES 100 mM pH 7,0 e Tris 100 mM pH 9,0 e pH 10,0.

SDS-PAGE com gelatina

Alíquotas de 10 µg de secreção de *L. ocellatus*, sem redução e aquecimento prévios, foram aplicadas em gel SDS-PAGE 10% contendo 0,1% (p/v) de gelatina como substrato para atividade proteolítica. A corrida foi feita a 4°C, em aparelho Mini Protean II (BioRad), com amperagem constante de 45 mA. Após a corrida, os géis foram lavados em tampão HEPES 100 mM pH. 8,0 por 90 min, à temperatura ambiente, e incubados em uma nova alíquota do tampão por 36 h, a 39°C. Os géis foram corados em solução de Coomassie R250 0,25% (p/v) em solvente metanol/ácido acético/água 50:10:40 (v/v) e descorados no mesmo solvente, para revelar as bandas onde houve degradação da gelatina. Este ensaio foi, também, realizado com variações de pH, lavando-se e incubando-se os géis nos tampões acetato de sódio 100 mM pH 4,0 e pH 5,0; fosfato de sódio 100 mM pH 6,0; HEPES 100 mM pH 7,0 e pH 8,0 e Tris 100 mM pH 9,0 e pH 10,0.

Clivagem de substratos fluorogênicos

Foi realizado um teste qualitativo preliminar da atividade proteolítica da secreção cutânea sobre substratos fluorogênicos. Uma alíquota de 10 µg de secreção de *L. ocellatus* foi solubilizada em 200 µL de água Milli-Q. Em placa de microtitulação (96 poços, fundo chato), foram incubados 2 µL da solução de secreção com cada substrato na concentração final de 20 µM, em tampão HEPES 25 mM, pH 7,5, num volume final de 100 µL. A presença de fluorescência foi observada pela exposição da placa à luz UV, nos tempos de 30 min e 24 h de incubação. Os substratos testados foram F-R-AMC; G-P-AMC; G-P-L-G-P-AMC; I-A-AMC e L-AMC.

11. Bioinformática

Os seguintes programas foram utilizados: (1) Expasy - Compute pI/Mw (http://au.expasy.org/cgi-bin/pi_tool), para cálculo das massas moleculares monoisotópicas dos peptídeos; (2) Innovagen - Peptide Property Calculator (<http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>), para cálculo das cargas dos peptídeos, considerando-se a presença de amidação C-terminal; (3) BLAST2 (Altschul *et al.*, 1997 - <http://au.expasy.org/tools/blast/>), para buscas por similaridade no banco de dados Uniprot; (4) ClustalW (Thompson *et al.*, 1994 - <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), para alinhamentos múltiplos de seqüências de proteínas, ajustados manualmente, quando necessário; (5) HydroMCalc (Alex Tossi & Luca Sandri - <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html#uhrel>), para cálculo das hidrofobicidades médias dos peptídeos, pelas escalas de Kyte & Doolittle (1982) e de Eisenberg (1982); (6) o aplicativo em <http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>, para projeções helicoidais dos peptídeos; (7) PAUP 4.0, para construção de árvores consenso *neighbor-joining bootstrap 50% majority-rule*, por análise de distância, baseadas nos alinhamentos de seqüências, com reordenação dos caracteres em 1000 réplicas e (8) TreeView, para exibição das árvores.

VI – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Prospecção de peptídeos citolíticos

A etapa inicial do trabalho consistiu no fracionamento da secreção cutânea de *L. ocellatus* e na busca por componentes citolíticos, realizada por meio dos ensaios de sondagem de atividades antibacteriana e hemolítica. Esses experimentos revelaram treze frações ativas, das quais apenas três não apresentaram atividade hemolítica, sendo duas ativas contra *S. aureus* e uma ativa contra *S. aureus* e *E. coli*. Dentre as outras dez frações, duas apresentaram atividade contra os três tipos celulares e oito revelaram-se hemolíticas e ativas contra *S. aureus*. (Fig. 5).

Seis das oito frações hemolíticas ativas contra *S. aureus* encontram-se no final do perfil cromatográfico da secreção, tendo sido eluídas a partir de 46% de acetonitrila. O longo tempo de retenção em HPLC, próximo de 50% de acetonitrila, está relacionado a uma maior anfipaticidade dos peptídeos, que contribui para a atividade hemolítica (Sitaram & Nagaraj, 1999), e à presença de vários resíduos hidrofóbicos na seqüência. Essas observações coincidem com as de Nielsen *et al.* (2007), que constataram que a substituição de alaninas por leucinas (mais hidrofóbicas), na seqüência do peptídeo *fallaxin*, de *Leptodactylus fallax*, resultou em aumentos na atividade hemolítica, na atividade contra *S. aureus* e no tempo de retenção.

É possível que a presença de diversas frações hemolíticas na secreção cutânea de *L. ocellatus* seja um reflexo da necessidade que os anfíbios de regiões com vegetação seca têm de se proteger contra o ectoparasitismo por aracnídeos, como ácaros da família Trombiculidae e carrapatos da família Ixodidae. Outros ectoparasitas como sanguessugas (Hirundinoidea) e larvas de insetos da ordem Diptera (Duellman & Trueb, 1994) poderiam, também, ser afetados pela secreção de compostos hemolíticos.

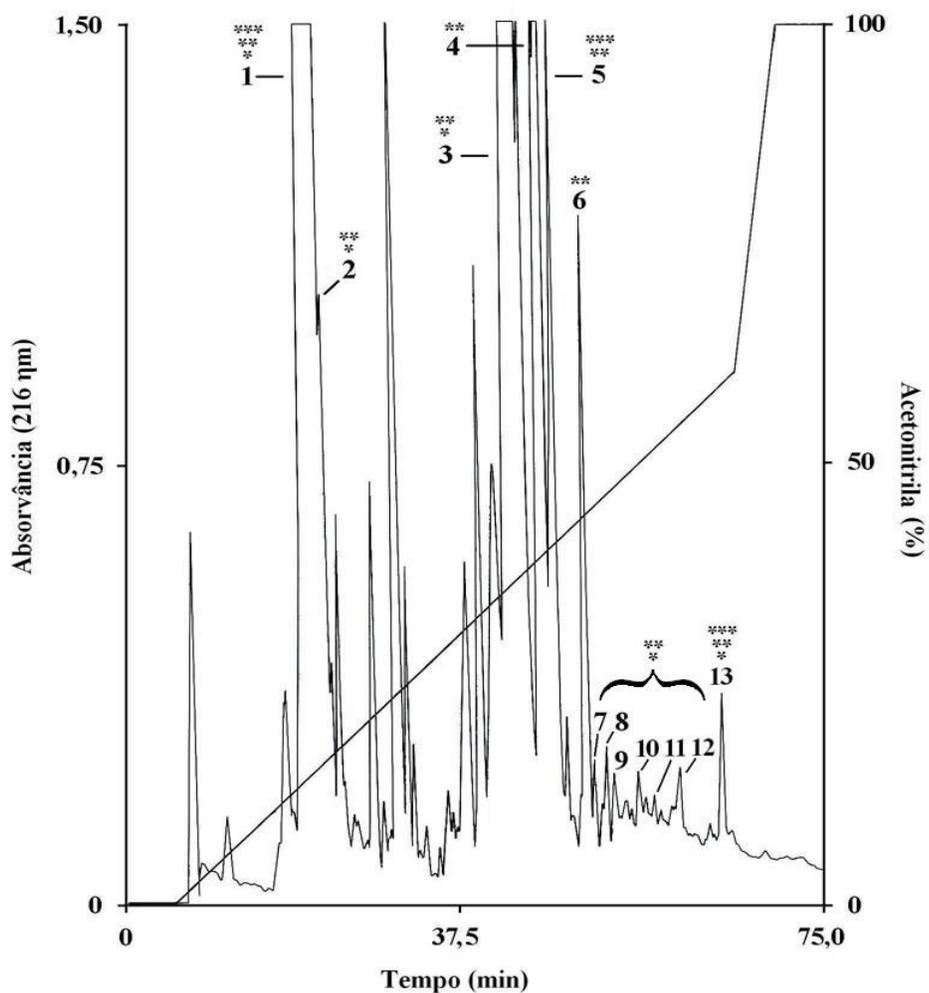


Figura 5. Sondagem de atividades antibacteriana e hemolítica com frações cromatográficas da secreção cutânea de *L. ocellatus*. *** Frações ativas contra *E. coli*; ** ativas contra *S. aureus* e * hemolíticas.

Em nosso trabalho, buscamos estudar todas as frações que apresentaram atividade antibacteriana, porém, a maioria não se encontrava pura mesmo após sucessivas recromatografias em coluna C₁₈. A redução da velocidade do gradiente de 1% de acetonitrila/min para 0,5% de acetonitrila/min não ocasionou melhoria na resolução dos eluentes. A dificuldade de purificação de alguns peptídeos de secreção de anfíbio deve-se, ao menos em parte, à ocorrência de peptídeos

muito similares na secreção, algumas vezes diferindo entre si somente por um resíduo de aminoácido.

Foi possível purificar apenas as frações 3, 6, 11 e 13 (Fig. 5), que tiveram massa molecular e seqüência determinadas, revelando, respectivamente, os peptídeos Lo1605 (GVVDILKGAGKDLLAH; MMT = 1604,92 u; MME = 1604,79 u); Lo1616 (GLLDFLKAAGKGLVTN; MMT = 1615,93 u; MME = 1616,04 u); *Ocellatin* 5 (GLLDFLKAAGKGLVTNL; MMT = 1729,01 u; MME = 1728,97 u) e *Ocellatin* 4 (GLLDFVTGVGKDIFAQLIKQI; MMT = 2274,30 u; MME = 2273,24 u). *Ocellatins* 4 e 5 são peptídeos que ainda não haviam sido descritos. Lo1605 e Lo1616, entretanto, são apenas fragmentos dos peptídeos *ocellatin* 1 e *ocellatin* 5, o que foi evidenciado por alinhamentos de seqüências (Fig. 6).

Ocellatin 1	GVVDILKGAGKDLLAHLVGKI	SEKV	25
Ocellatin 2	GVLDFKDAAKQILAHAAEQI	----	21
Ocellatin 3	GVDILKNAAKNILAHAAEQI	----	21
Ocellatin 4	GLLDFVTGVGKDIFAQLIKQI	----	21
Ocellatin 5	GLLDFLKAAGKGLVTNL	-----	17
Ocellatin 1	GVVDILKGAGKDLLAHLVGKI	SEKV	25
Lo1605	GVVDILKGAGKDLLAH	-----	16
Ocellatin 5	GLLDFLKAAGKGLVTNL	-----	17
Lo1616	GLLDFLKAAGKGLVTN	-----	16

Figura 6. Alinhamento múltiplo entre os peptídeos caracterizados e *ocellatins* 1, 2 e 3, previamente descritas. Resíduos idênticos estão destacados em preto e substituições conservativas, em cinza escuro. Destacados em cinza claro estão os resíduos encontrados em, pelo menos, três *ocellatins*, porém não em todas.

Fragmentos de peptídeos foram também encontrados nas secreções de outros leptodactilídeos: Rollins-Smith *et al.* (2005) isolaram o fragmento 1-22 do peptídeo *fallaxin* (*L. fallax*), enquanto Dourado *et al.* (2007) identificaram seis fragmentos do peptídeo *syphaxin*, de *Leptodactylus syphax*. A presença de fragmentos peptídicos na secreção evidencia a ocorrência de enzimas proteolíticas secretadas juntamente com os peptídeos.

Ocellatin 4

A facilidade de purificação de *ocellatin 4* (Fig. 7) levou à disponibilidade de uma quantidade maior deste que dos outros peptídeos, o que propiciou um estudo mais aprofundado, incluindo determinações de HC₅₀ e MICs. Porém, ainda que superior à dos outros peptídeos, a quantidade de *ocellatin 4* era ainda limitada e permitiu somente a determinação de MIC para uma espécie de bactéria Gram-negativa (*E. coli*) e uma Gram-positiva (*S. aureus*).

Após determinarmos a seqüência (Fig. 6) e a massa molecular (Fig. 7) de *ocellatin 4*, verificamos a ocorrência de amidação C-terminal, confirmada pela análise MS/MS, na qual os γ -íons C-terminais apresentaram 1 u a menos, que corresponde à substituição de -OH (17 u) por -NH₂ (16 u). A amidação pode contribuir para a atividade citolítica ao induzir a formação de hélice C-terminal, estabilizar as hélices já existentes (Shalev *et al.*, 2002), ou ainda reduzir a repulsão eletrostática entre o C-terminal do peptídeo e o grupo fosfodiéster dos fosfolipídios de membrana (Dourado *et al.*, 2007).

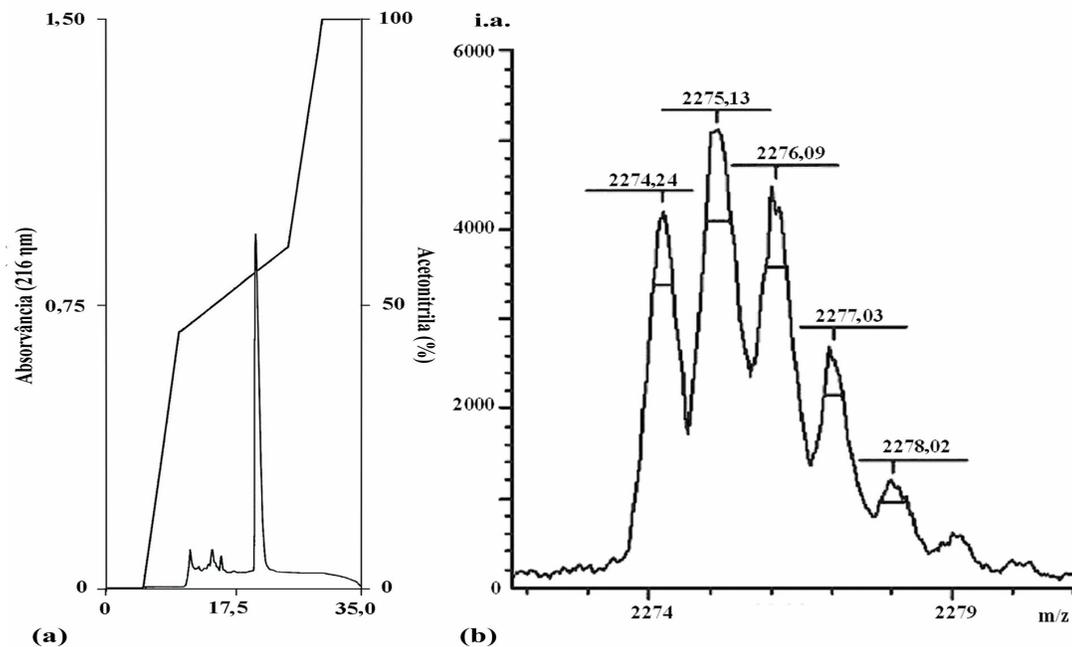


Figura 7. Purificação e determinação da massa molecular de *ocellatin 4*. (A) RP-HPLC, em coluna Vydac C₁₈ 218TP54, 4,6 x 250 mm. (B) Espectro de massa gerado por MALDI-TOF MS, modo refletor positivo.

Os peptídeos que são ativos contra células bacterianas sem apresentar atividade hemolítica geralmente contêm vários resíduos de aminoácidos positivamente carregados e são catiônicos (Epanand & Vogel, 1999): grande parte apresenta carga +2 ao longo da cadeia peptídica, podendo chegar a +3 de carga total, se houver amidação C-terminal. Ao contrário destes, os peptídeos que apresentam pequenos valores de carga da cadeia peptídica revelam-se hemolíticos (Shai, 1999), e este é o caso de *ocellatin 4*.

Ocellatin 4 possui apenas dois resíduos positivamente carregados, contrabalançados por dois negativamente carregados. A cadeia peptídica de *ocellatin 4* confere-lhe carga de -0,0012 em pH 7,0, sendo a carga total elevada a +1 devido à presença de amidação C-terminal. É provável que a fraca carga contribua para a atividade hemolítica de *ocellatin 4*, cuja HC₅₀ para hemácias humanas

foi estimada em 14,3 μM (Fig. 8), ao passo em que reduz sua afinidade por cargas negativas expostas em membranas de bactérias, resultando em atividade antibacteriana menos potente que a de outros peptídeos, com MIC de 64 μM para *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923. A atividade hemolítica está também relacionada à anfipaticidade (Sitaram e Nagaraj, 1999) de *ocellatin* 4, que foi a última fração eluída na cromatografia da secreção de *L. ocellatus* (Fig. 5 – fração n° 13), em torno de 57% de acetonitrila.

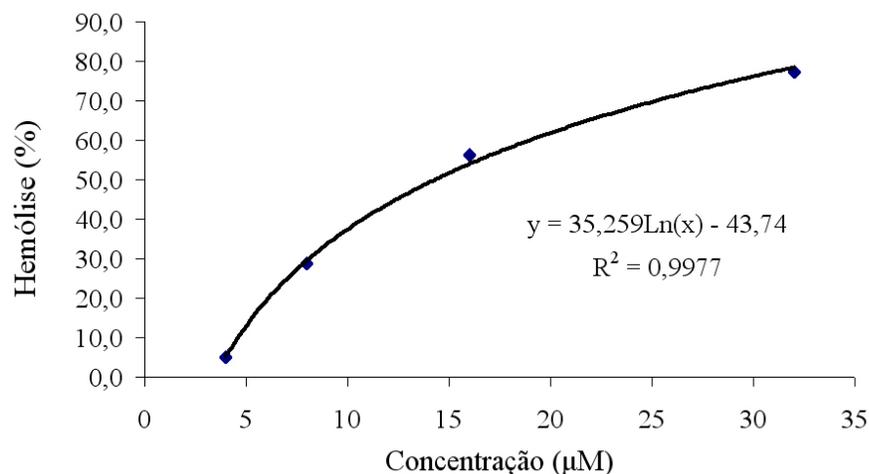


Figura 8. Curva de hemólise do peptídeo *ocellatin* 4.

A anfipaticidade acentuada pode causar uma forte tendência de agregação entre as moléculas do peptídeo em solução aquosa (Chen *et al.*, 2005a). Peptídeos agregados podem ser pouco efetivos contra bactérias, cuja parede celular impede o acesso direto à membrana plasmática. Por outro lado, contra células cuja membrana plasmática é acessível (como as hemácias), peptídeos agregados são mais eficientes, pois, logo ao primeiro contato, já se encontram na concentração necessária para permeabilizá-la (Feder *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 1997; Krugliak *et al.*, 2000). É provável, então, que *ocellatin* 4 seja um peptídeo com alta capacidade de agregação em meio aquoso.

Os resultados obtidos no ensaio de proteção osmótica indicam que o mecanismo da ação hemolítica de *ocellatin 4* envolve a formação de poros na membrana plasmática das hemácias. Os carboidratos arabinose e sacarose, com diâmetros moleculares de 0,62 e 0,92 nm (Clinkenbeard & Thiessen, 1991), na concentração final de 0,05 M, reduziram em 50 e 75%, respectivamente, a atividade hemolítica de *ocellatin 4* na concentração final de 7 µM. Por outro lado, a rafinose, com 1,14 nm de diâmetro molecular (Clinkenbeard & Thiessen, 1991), não causou nenhum decréscimo na atividade hemolítica. Estes dados sugerem que o diâmetro funcional dos poros formados por *ocellatin 4* na membrana de hemácias é superior a 0,92 e inferior a 1,14 nm.

A seqüência de *ocellatin 4* foi comparada às de seis peptídeos de secreção cutânea de leptodactilídeos: *ocellatins 1, 2 e 3* (*Leptodactylus ocellatus* - Nascimento *et al.*, 2004); *fallaxin* (*Leptodactylus fallax* - Rollins-Smith *et al.*, 2005); *laticeptin* (*Leptodactylus laticeps* - Conlon *et al.*, 2006a) e *pentadactylin* (*Leptodactylus pentadactylus* - King *et al.*, 2005a). Dentre estes, o peptídeo mais similar a *ocellatin 4* é *ocellatin 1*, com nove posições idênticas. *Ocellatins 2 e 3* apresentam oito resíduos idênticos aos de *ocellatin 4*; *fallaxin* e *pentadactylin* apresentam sete e *laticeptin*, seis (Fig. 9A).

O aprofundamento da busca por similaridade revelou semelhanças entre *ocellatin 4* e quatro peptídeos das secreções cutâneas de rãs Australianas do gênero *Litoria*. A maior similaridade foi observada com o peptídeo *aurein 5.1* (*Litoria raniformis* e *Litoria aurea* - Rozek *et al.*, 2000), do qual dez posições são idênticas às de *ocellatin 4*, semelhança que supera a observada entre *ocellatin 4* e os peptídeos de leptodactilídeos. Com a inserção de dois gaps na seqüência de *aurein 2.4* (*Litoria aurea* - Rozek *et al.*, 2000), foi possível observar nove posições coincidentes com as de *ocellatin 4*. *Caeridin 7.1* (*Litoria ewingi* - Steinborner *et al.*, 1997) tem apenas 13 resíduos em sua seqüência e difere da porção 1-13 de *aurein 5.1* por apenas uma substituição conservativa, de modo que *ocellatin 4* é também bastante similar a este peptídeo, com oito posições idênticas e três

substituições conservativas. Já com *caeridin 4* (*Litoria caerulea* - Waugh *et al.*, 1993), a identidade é de seis posições (Fig. 9A).

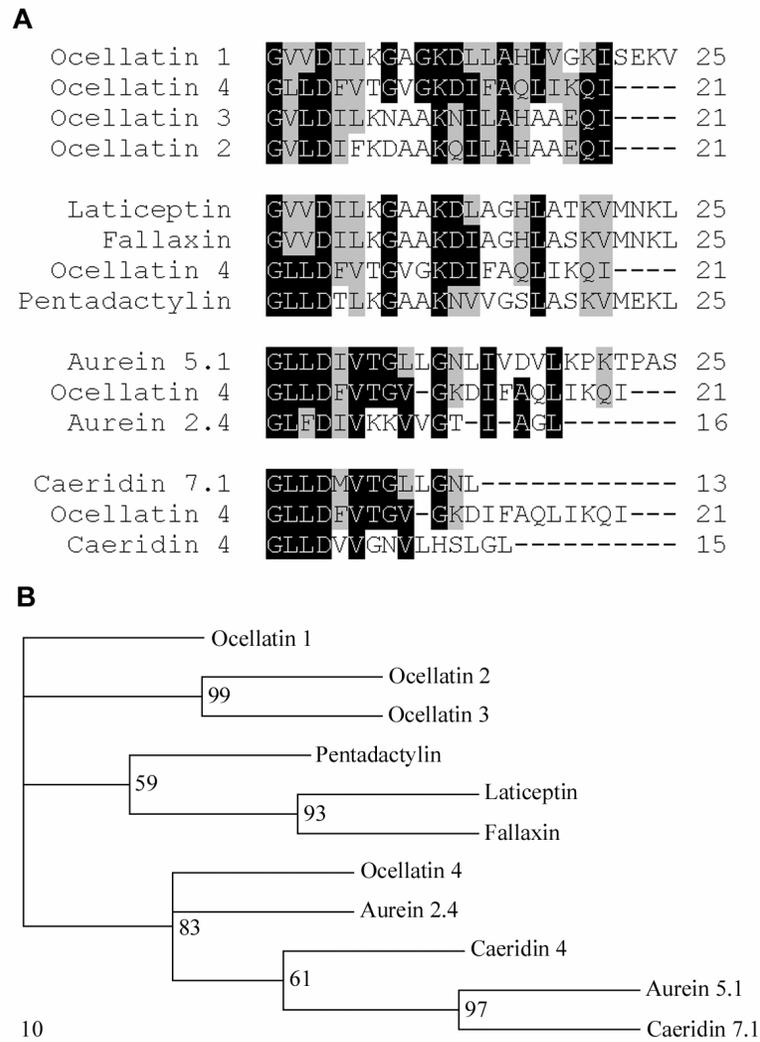


Figura 9. Similaridade entre *ocellatin 4* e peptídeos de leptodactílídeos e hilídeos. (A) Alinhamentos múltiplos de seqüências. Em preto, destacam-se as posições idênticas e, em cinza, as substituições conservativas. (B) Árvore consenso *neighbor-joining bootstrap 50% majority-rule*, baseada nos alinhamentos entre os peptídeos, com valores acima de 50% indicados nas ramificações e escala de distância abaixo da árvore.

Ocellatin 4 parece um intermediário entre os peptídeos de leptodactídeos e *Litoria* comparados, pois compartilha características com ambos os grupos. Os primeiros quatro resíduos parecem ter alguma conservação, estando G1 e D4 presentes nos dez peptídeos analisados. O segmento “1GLLD4” ocorre em *ocellatin 4*, *pentadactylin*, *aurein 5.1* e *caeridins 4* e *7.1*, enquanto os outros peptídeos apresentam, nas posições 2 e/ou 3, substituições conservativas que mantêm o caráter apolar de ambas. Várias outras posições conservadas podem ser observadas: K11, em todos os peptídeos de leptodactídeos; A15 e I21, em *ocellatins 1, 2, 3* e *4*; G8, em *ocellatins 1* e *4*, *aurein 5.1*, *caeridin 7.1*, *fallaxin*, *laticeptin* e *pentadactylin* (Fig. 9A).

Entre as posições 1 e 9, a similaridade entre *ocellatin 4*, *aurein 5.1* e *caeridin 7.1* é contínua, com sete resíduos idênticos e duas substituições conservativas. Neste ponto, evidenciou-se a importância da análise *bootstrap* associada aos alinhamentos de seqüência, a qual pôde nos fornecer uma noção da probabilidade das similaridades observadas entre *ocellatin 4* e peptídeos de rãs do gênero *Litoria* (*aureins* e *caeridins*) ocorrerem por mero acaso.

Simplificadamente, o método da análise *bootstrap* consiste em reordenar os caracteres do conjunto de dados de modo a gerar vários outros conjuntos de dados de tamanho igual ao do original, que são analisados, gerando um consenso (*majority-rule consensus*) e permitindo a atribuição de um grau de confiança estatística às observações de similaridade. Quanto maior é o valor de *bootstrap* de um grupo da árvore-consenso gerada, maior é seu grau de confiabilidade (Swofford & Begle, 1993).

A árvore consenso *neighbor-joining bootstrap 50% majority-rule* baseada no alinhamento entre os peptídeos (Fig. 9B) forneceu um valor de 83% para o grupo formado por *ocellatin 4* e os peptídeos de *Litoria*, indicando considerável confiabilidade e, portanto, pouca probabilidade de que as similaridades observadas aconteçam ao acaso, o que suscita a hipótese de que os peptídeos possam ter evoluído a partir de um mesmo gene ancestral.

Três das quatro subfamílias de hilídeos são predominantemente sul-americanas, enquanto a quarta subfamília, Pelodryadinae, que compreende o gênero *Litoria*, restringe-se a Austrália e Nova Guiné. Acredita-se que os ancestrais dos hilídeos australianos partiram da América do Sul e cruzaram a Antártica, chegando à Austrália, entre 150 e 130 milhões de anos atrás, quando estes três continentes encontravam-se unidos, formando o supercontinente Gondwana (Vanhoye *et al.*, 2003; Nicolas *et al.*, 2003). A família Leptodactylidae é essencialmente sul-americana, de modo que hilídeos e leptodactilídeos podem ter compartilhado um ancestral sul-americano datando de entre 150 e 130 milhões de anos atrás, antes da radiação dos hilídeos australianos. Contudo, hipóteses filogenéticas baseadas em conservação de seqüências de peptídeos de secreção cutânea só poderão ser validadas (ou refutadas) quando os repertórios peptídicos da maior parte das famílias de anfíbios tiverem sido estudados, de modo a tornar o tamanho e a distribuição da amostragem amplos o suficiente para permitir a identificação das limitações inerentes a este tipo de análise (Chen *et al.*, 2006).

Após termos concluído a caracterização de *ocellatin 4*, o peptídeo *syphaxin* (GVLDILKGAAKDLAGHVATKVINKI-CONH₂), da rã *Leptodactylus syphax*, foi descrito por Dourado *et al.* (2007). *Syphaxin* contém 25 resíduos de aminoácidos e difere de *laticeptin* por apenas quatro substituições conservativas, aparecendo agrupada com *laticeptin* e *fallaxin* no filograma baseado no alinhamento de seqüências apresentado por Dourado *et al.* (2007). *Syphaxin* apresenta identidade de apenas seis posições com *ocellatin 4*: G1; L3; D4; G8; K11 e D12.

Não foram observadas similaridades consideráveis entre *ocellatin 4* e outras hemolisinas. Os únicos peptídeos hemolíticos que apresentam alguma semelhança com *ocellatin 4* são: *chrysophsin 3*, das guelras do peixe *Chrysophrys major* (Iijima *et al.*, 2003); *melittin*, do veneno da abelha *Apis mellifera* (Kreil, 1975; Conlon *et al.*, 2003) e *nigrocin 2GRb*, da pele da rã *Rana grahami* (Conlon *et al.*, 2006b) (Fig. 10A).

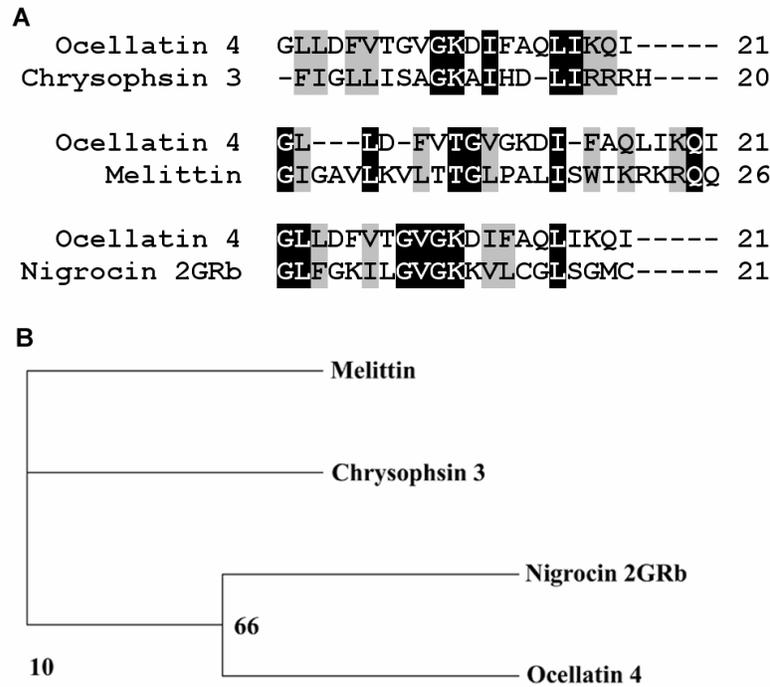


Figura 10. Similaridade entre *ocellatin 4* e alguns peptídeos hemolíticos. (A) Alinhamentos múltiplos de seqüências. Em preto, destacam-se posições idênticas e, em cinza, substituições conservativas. (B) Árvore consenso *neighbor-joining bootstrap 50% majority-rule*, baseada no alinhamento entre os peptídeos, com valores acima de 50% indicados nas ramificações e escala de distância abaixo da árvore.

Entretanto, a árvore consenso *neighbor-joining bootstrap 50% majority-rule* baseada nestes alinhamentos (Fig. 10B) indica que as similaridades entre *chrysopsin 3*, *melittin* e *ocellatin 4* provavelmente devem-se ao acaso, com valores de *bootstrap* inferiores a 50%, não exibidos. A similaridade entre *nigrocin 2GRb* e *ocellatin 4* é mais consistente, com valor de 66% de *bootstrap* (Fig. 6B), porém, *nigrocin 2GRb* apresenta uma ponte dissulfeto e não é amidada no resíduo C-terminal, diferenças marcantes em relação a *ocellatin 4*.

Visto que grande parte dos peptídeos citolíticos de secreção cutânea de anfíbio submetidos a análise de estrutura apresentaram estrutura helicoidal na presença de TFE e em contato com membranas (Oren & Shai, 1998), optamos por comparar as projeções de Schiffer e Edmundson (1967) das porções 1-18 dos peptídeos *ocellatin 4*, *fallaxin*, *laticeptin* e *pentadactylin*. É importante ressaltar, entretanto, que, embora seja provável que estes peptídeos apresentem estrutura helicoidal, não podemos afirmar que isso ocorra sem dados experimentais.

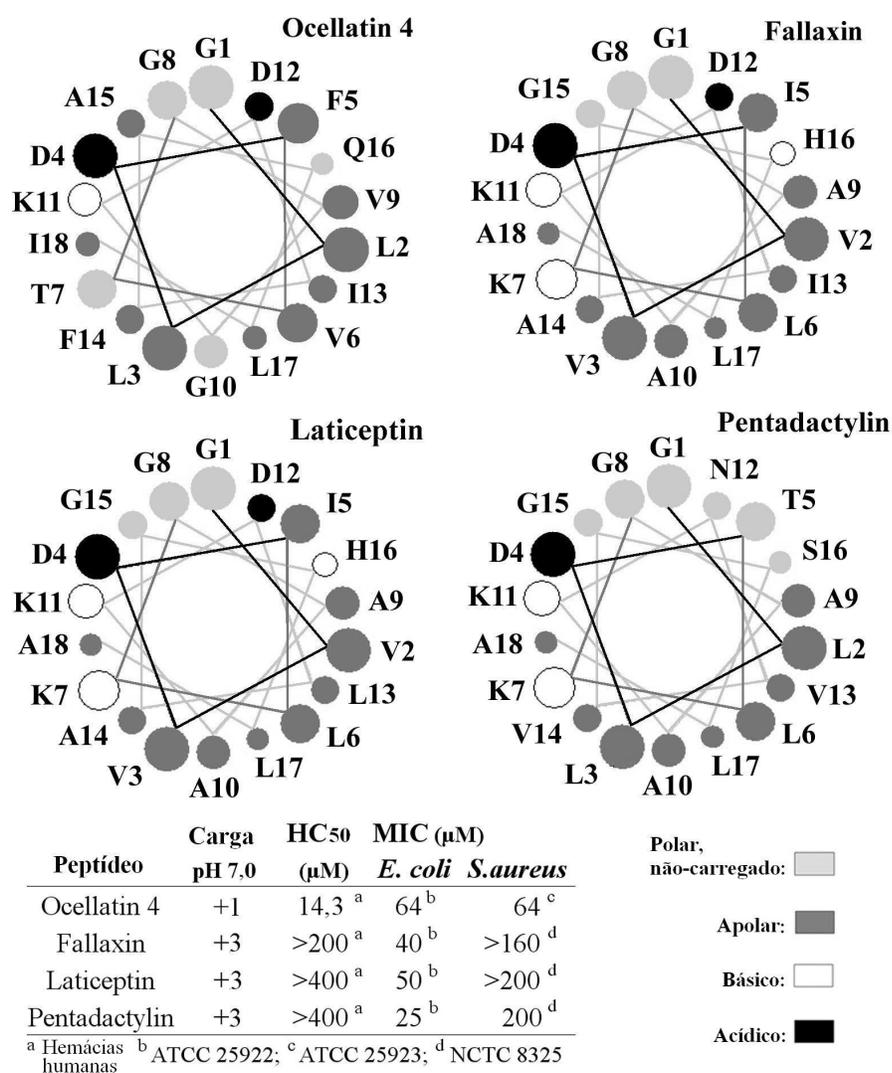


Figura 11. Projeções de Schiffer e Edmundson (resíduos 1 a 18) e atividades de quatro peptídeos de leptodactilídeos.

A projeção de *pentadactylin* revela a face polar mais organizada e um aspartato (D) a menos que os demais peptídeos (Fig. 11). É possível que as cargas negativas expostas em membranas bacterianas sejam repelidas pela carga negativa da cadeia lateral do aspartato (Lee *et al.*, 2006), o que pode explicar parcialmente o fato de *pentadactylin* ser mais ativo que os outros três peptídeos contra *E. coli* ATCC 25922.

A projeção N-terminal de *ocellatin 4* apresenta apenas um resíduo positivamente carregado. Os demais peptídeos, com mais cargas positivas em suas hélices, provavelmente têm maior afinidade pela membrana externa de *E. coli*, rica em lipopolissacarídeos negativamente carregados. *Ocellatin 4*, único peptídeo hemolítico e relativamente ativo contra *S. aureus* destes quatro, apresenta as faces polar e apolar menos organizadas (Fig. 11).

A mesma comparação foi feita entre *ocellatin 4* e os peptídeos hemolíticos *chrysophysin 3*, *melittin* e *nigrocin 2GRb* (Fig. 12), que apresentam destacada atividade antimicrobiana além de atividade hemolítica. *Ocellatin 4* é o que apresenta menor carga em pH 7,0, reforçando a hipótese de que sua atividade antimicrobiana relativamente fraca pode ser resultado da reduzida afinidade elétrica com membranas bacterianas.

Não foi possível relacionar a presença de resíduos negativamente carregados à atividade hemolítica. Tanto *melittin*, o mais hemolítico, quanto *nigrocin 2GRb*, o menos hemolítico, não apresentam resíduos acídicos em suas seqüências, enquanto *chrysophysin 3* e *ocellatin 4* apresentam, respectivamente, um e dois aspartatos. A fraca atividade hemolítica de *nigrocin 2GRb* pode estar relacionada a sua face polar mais organizada e seu menor número de resíduos hidrofóbicos (Fig. 12).

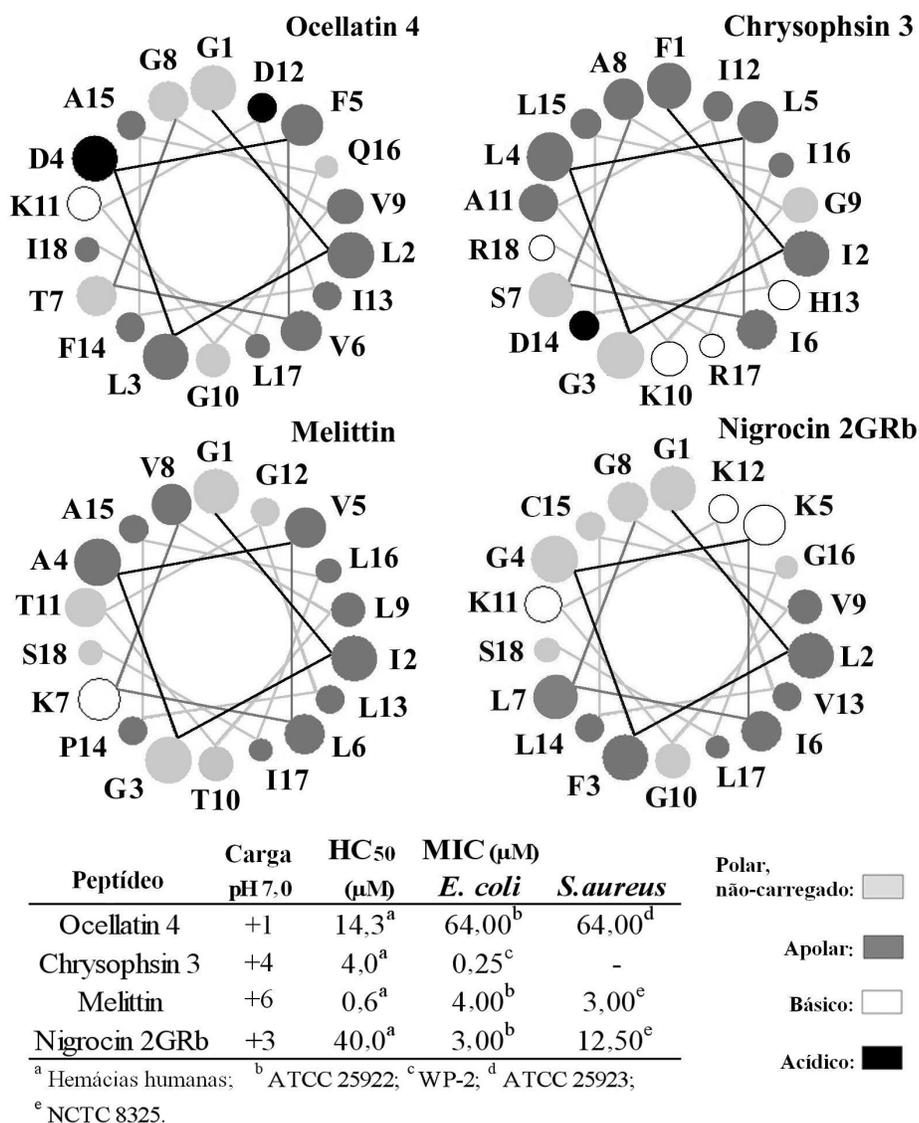


Figura 12. Projeções de Schiffer e Edmundson (resíduos 1 a 18) e atividades de quatro peptídeos hemolíticos.

Ocellatin 5

O baixo rendimento de *ocellatin 5* nas cromatografias da secreção de *L. ocellatus* (fração 11, Fig. 5) não permitiu que acumulássemos material suficiente para as determinações de MIC contra microorganismos e de HC₅₀ contra hemácias humanas. Foi possível realizar somente a análise da

seqüência de *ocellatin 5*, a qual apresentou similaridades apenas com peptídeos de leptodactídeos (Fig. 13).

Ocellatin 4	GLLDFVTGVGKDI	FAQI	IKQI	----	21
Ocellatin 5	GLLDFLKAAGKGL	VTNL	-----		17
Ocellatin 1	GVVDILKGAGKDL	LAHL	VGKISEKV		25
Ocellatin 2	GVLDIFKDAAKQI	LAHAAEQI	----		21
Ocellatin 3	GVLDILKNAAKN	ILAHAAEQI	----		21
Fallaxin	GVVDILKGAAKDI	AGHL	ASKVMNKL		25
Laticeptin	GVVDILKGAAKDL	AGHL	ATKVMNKL		25
Syphaxin	GVLDILKGAAKDL	AGHV	ATKVINKI		25
Pentadactylin	GLLDILKGAAKNV	VGSL	ASKVMEKL		25
Ocellatin 5	GLLDFLKAAGKGL	VTNL	-----		17
LASP	GLWDDLKAAAKKV	VSSL	ASAAIEKL		25

Figura 13. Alinhamentos múltiplos entre *ocellatin 5* e outros peptídeos de leptodactídeos.

Os peptídeos de *L. ocellatus* mais similares a *ocellatin 5* são *ocellatins 1* e *4*, respectivamente com nove e oito posições idênticas. Similaridades maiores, com dez posições idênticas, foram observadas entre *ocellatin 5* e os peptídeos *pentadactylin* (*L. pentadactylus* - King *et al.*, 2005a) e *LASP*, o peptídeo estimulador de agressividade de *Leptodactylus*, isolado da secreção cutânea de *L. fallax*, por King *et al.* (2005b).

LASP foi encontrado apenas na secreção de indivíduos machos da espécie *L. fallax*, estando ausente da secreção de fêmeas. Verificou-se que o peptídeo não causa a atração de fêmeas, mas atrai outros machos e estimula, entre esses, comportamentos agressivos relacionados à competição reprodutiva (King *et al.*, 2005b). Devido à similaridade com *LASP*, existe a possibilidade de que *ocellatin 5* possa estar envolvido numa função semelhante, em *L. ocellatus*.

Em pH 7,0, *ocellatin 5* apresenta carga +1, considerando-se apenas a seqüência de aminoácidos. Se houver amidação C-terminal, como em *ocellatin 4*, a carga será de +2. É possível que *ocellatin 5* seja discretamente menos hemolítico que *ocellatin 4*, não apenas por ser mais catiônico, mas também por apresentar tempo de retenção em RP-HPLC um pouco inferior ao de *ocellatin 4*. É, também, possível que a atividade antibacteriana de *ocellatin 5* seja um pouco superior à de *ocellatin 4*, visto que *ocellatin 5* possui um resíduo de aspartato (negativamente carregado) a menos, o que poderia facilitar sua interação com cargas negativas de membranas bacterianas. É importante ressaltar que, apesar de *ocellatin 5* não haver apresentado atividade contra *E. coli* no teste de sondagem (Fig. 5), não podemos afirmar que esta atividade não exista, tampouco podemos considerar *ocellatin 5* menos ativo que *ocellatin 4*, que apresentou atividade contra *E. coli*. Como *ocellatin 5* é eluído em quantidades reduzidas (Fig. 5), a ausência de atividade contra *E. coli* pode haver decorrido de baixa concentração do peptídeo no ensaio de sondagem, realizado diretamente com as frações cromatográficas.

Enquanto *ocellatins 2, 3 e 4* possuem 21 resíduos de aminoácidos e *ocellatin 1* possui 25, *ocellatin 5* apresenta apenas 17 resíduos. Dada a ocorrência de peptídeos truncados nas secreções de *L. ocellatus* e outros leptodactilídeos, é provável que *ocellatin 5* seja um fragmento de um peptídeo ativo maior. Sua projeção em hélice (Fig. 14) revela faces hidrofóbica e hidrofílica menos organizadas que as dos demais peptídeos de leptodactilídeos caracterizados até o momento.

Outras características peculiares de *ocellatin 5* são a presença de cinco leucinas na seqüência, sendo que quatro encontram-se adjacentes na projeção helicoidal, e a ocorrência de glicina na posição 12. Enquanto resíduos de glicina em posições interiores (longe das extremidades da cadeia peptídica) podem conferir maior liberdade conformacional à molécula, é possível que os resíduos de leucina propiciem a formação de estruturas tridimensionais mais complexas, como *coiled-coil* (Nielsen *et al.*, 2007).

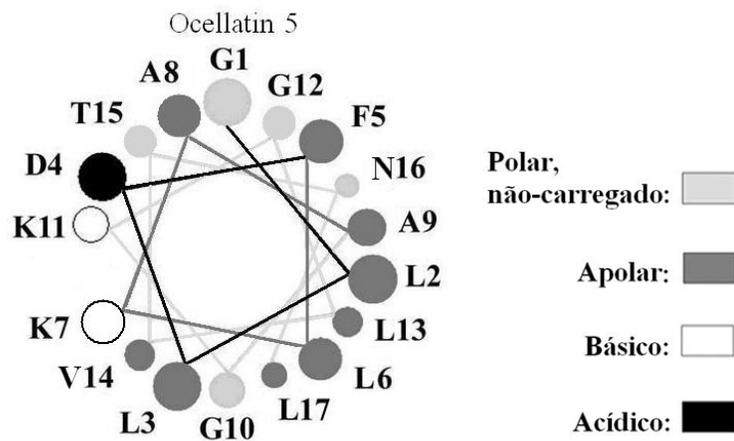


Figura 14. Projeção de Schiffman e Edmundson (resíduos 1 a 18) de *ocellatin 5*.

2. Investigação da relação entre estrutura e atividade de peptídeos

Objetivando verificar os efeitos de certas alterações na seqüência de aminoácidos sobre a atividade citolítica, bem como obter um peptídeo com melhores perspectivas terapêuticas, sintetizamos quimicamente sete análogos de *ocellatin 4* (Fig. 15), os quais podem ser divididos em dois grupos.

O primeiro grupo é formado pelos análogos “K[1,4,8,15];A[12,16,20]”, “K[1,8,15];N[4,12]” e “K[1,8,15];R[4,12]” (Fig. 15), fortemente catiônicos (Tab. 1), nos quais buscamos eliminar, por substituição, as cargas negativas, presentes na seqüência sob a forma de resíduos de aspartato (D), e substituir glicinas (G), fracamente hidrofílicas e com potencial desestabilizador de hélices, por lisinas (K), positivamente carregadas, fortemente hidrofílicas e propiciadoras de hélices (Eisenberg *et al.*, 1982; Kyte & Doolittle, 1982; Rollins-Smith *et al.*, 2005).

K[1;4;8;15];A[12;16;20]	KLLK FVTKV GKAIFKALIKAI (-CONH ₂)
K[1;8;15];R[4;12]	KLLR FVTKV GKRIFKQLIKQI (-CONH ₂)
K[1;8;15];N[4;12]	KLLN FVTKV GKNIFKQLIKQI (-CONH ₂)
Ocellatin 4	GLLD DFVTGV GKDIFAQLIKQI (-CONH ₂)
S5;K7;A10;N12	GLLD SVKGVAKN IFAQLIKQI (-CONH ₂)
S5;K7;Ins-V10;A11;N13	GLLD SVKGVVAKN IFAQLIKQI (-CONH ₂)
Del-2;S4;K6;A9;N11	GLD SVKGVAKN IFAQLIKQI (-CONH ₂)
Del-2;S4;K6;A9;N11;K17	GLD SVKGVAKN IFAQLKQI (-CONH ₂)

Figura 15. Sequências de *ocellatin 4* e dos análogos produzidos por síntese química. Em preto destacam-se resíduos negativamente carregados; em branco, positivamente carregados; em cinza escuro, apolares e, em cinza claro, polares não-carregados.

O segundo grupo constitui-se do análogo “S5;K7;A10;N12” e de suas variações, “S5;K7;Ins-V10;A11;N13”, “Del-2;S4;K6;A9;N11” e “Del-2;S4;K6;A9;N11;K17”. O análogo “S5;K7;A10;N12” foi baseado nas projeções helicoidais 1-18 dos peptídeos de anfíbios *pentadactylin* (*L. pentadactylus*), não-hemolítico e com MIC de 25 µM para *E. coli* ATCC 25922 (King *et al.*, 2005a), e *ranatuerin 2B* (*Rana berlandieri*) (Fig. 16), com MIC de 2 µM para *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* NCTC 8325 (Goraya *et al.*, 2000).

Seis dos sete análogos apresentaram aumento da atividade contra *E. coli*, em relação a *ocellatin 4* (Tab. 2), um indício de que a carga, que variou de +3 a +8 nos análogos, em comparação a +1 de *ocellatin 4* (Tab. 1), é um determinante importante da atividade. Bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, são particularmente suscetíveis à ação de peptídeos catiônicos, pois suas membranas, além de conterem fosfolipídios negativamente carregados, apresentam lipopolissacarídeos negativamente carregados (Epand & Vogel, 1999; Sitaram & Nagaraj, 1999), favorecendo ainda mais a ligação de moléculas catiônicas. O peptídeo “del-2;S4;K[6,17];A9;N11”, no entanto, mesmo possuindo carga +4, teve atividade contra *E. coli* inferior à dos outros análogos e igual à de *ocellatin*

4, deixando claro que, apesar de ser bastante influenciada pelas cargas, a atividade contra bactérias Gram-negativas pode ser alterada por outros fatores.

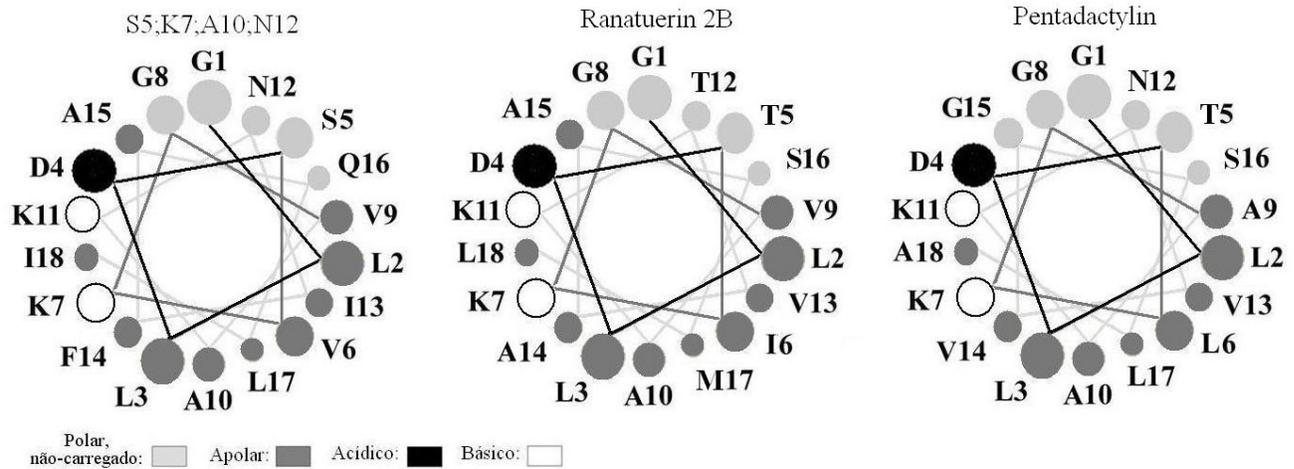


Figura 16. Projeções de Schiffer e Edmundson (resíduos 1 a 18) dos peptídeos “S5;K7;A10;N12”, *ranatuerin* 2B e *pentadactylin*.

“K[1,4,8,15];A[12,16,20]”, “K[1,8,15];N[4,12]” e “K[1,8,15];R[4,12]”, os três peptídeos com as maiores cargas (Tab. 1) foram os mais ativos contra *S. aureus* (Tab. 2), sugerindo que a forte cationicidade pode contribuir também para a atividade contra algumas bactérias Gram-positivas.

Os análogos “S5;K7;ins-V10;A11;N13”, “del-2;S4;K6;A9;N11” e “del-2;S4;K[6,17];A9;N11” foram inativos contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Tab. 2), o que talvez esteja relacionado a alterações na anfipaticidade, ocasionadas pelas deleções e pela inserção, ou à ausência de lisina (K) na posição 11, que é encontrada nos demais análogos, ativos contra essas duas bactérias (Fig. 17), e conservada nos peptídeos de leptodactilídeos (Fig. 13). Os análogos com deleções de L2 foram menos ativos que “S5;K7;ins-V10;A11;N13” contra *E. coli*, o que pode ser parcialmente explicado pelo fato de que os resíduos de leucina são particularmente importantes para

a atividade antimicrobiana, podendo estar envolvidos na organização de estruturas tridimensionais dos peptídeos (Nielsen *et al.*, 2007).

Tabela 1. Propriedades dos análogos sintéticos de *ocellatin 4*.

Peptídeos	MM (u)	Carga pH 7,0	H Eisen.	H Kyte
Ocellatin 4	2273,3	+1	0,01	0,40
K[1,4,8,15];A[12,16,20]	2327,5	+7	-0,19	0,42
K[1,8,15];N[4,12]	2470,5	+6	-0,26	-0,28
K[1,8,15];R[4,12]	2554,7	+8	-0,37	-0,38
S5;K7;A10;N12	2253,3	+3	-0,10	0,15
S5;K7;insV10;A11;N13	2352,4	+3	-0,07	0,17
del2;S4;K6;A9;N11	2140,3	+3	-0,13	-0,02
del2;S4;K[6,17];A9;N11	2155,3	+4	-0,25	-0,47

H: hidrofobicidade média.

Eisen.: escala de Eisenberg (1982).

Kyte: escala de Kyte e Doolittle (1982).

Não foi possível estabelecer relação entre a atividade e as hidrofobicidades médias dos peptídeos, calculadas de acordo com as escalas de Eisenberg (1982) e de Kyte & Doolittle (1982) (Tab. 1), tampouco foi possível correlacionar a atividade à extensão das faces polares e apolares nas projeções em hélice (Fig. 17).

O maior aumento de atividade antibacteriana em relação a *ocellatin 4* foi do peptídeo “K[1,8,15];N[4,12]”, com atividade contra *S. aureus* 32 vezes maior. O maior aumento de atividade hemolítica foi de “K[1,4,8,15];A[12,16,20]”, 35 vezes mais hemolítico que *ocellatin 4*. “K[1,8,15];R[4,12]” também apresentou atividade hemolítica aumentada, cinco vezes maior que a de *ocellatin 4*.

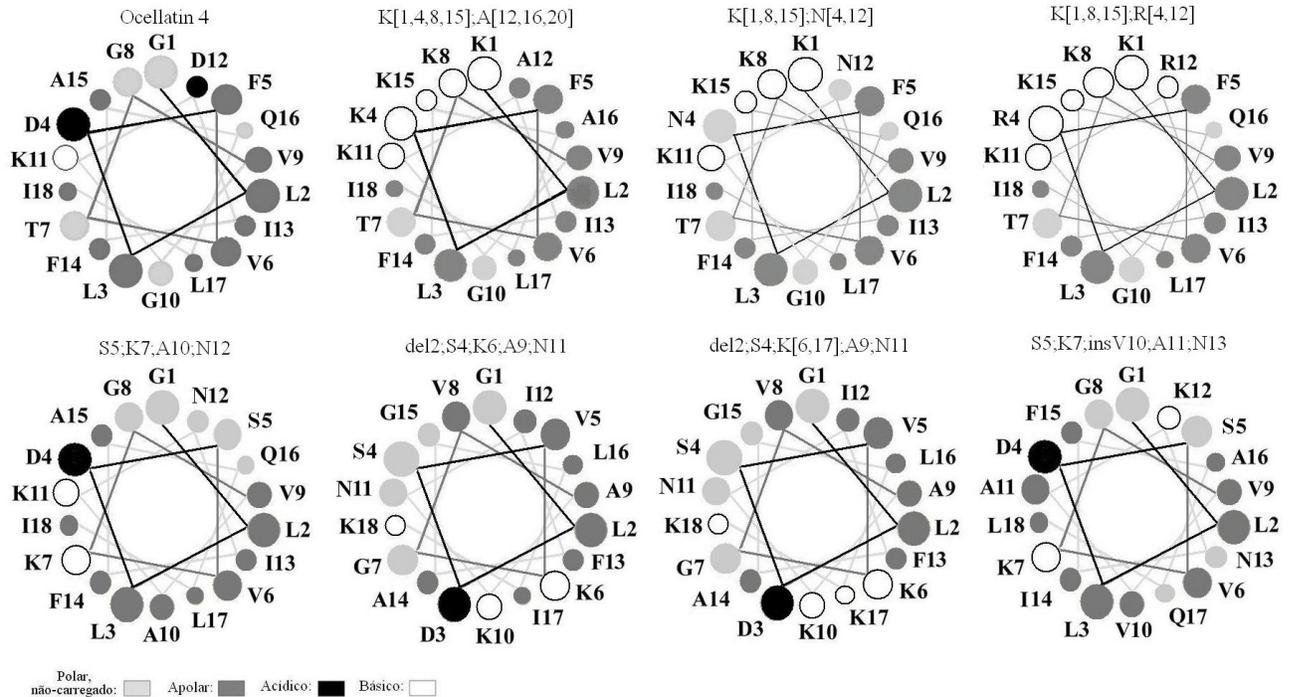


Figura 17. Projeções de Schiffer e Edmundson (resíduos 1 a 18) de *ocellatin* 4 e dos análogos sintéticos.

Ao contrário da atividade hemolítica de *ocellatin* 4, que foi amenizada na presença de carboidratos com 0,62 e 0,92 μm de diâmetro molecular, a forte atividade hemolítica de “K[1,4,8,15];A[12,16,20]” e “K[1,8,15];R[4,12]” não sofreu diminuição na presença de carboidratos potencialmente osmoprotetores, o que sugere que o mecanismo não envolve a formação de poros. É bastante provável que esses análogos não apresentem conformação em hélice, a qual disporia as cargas positivas muito próximas (Fig. 17), causando repulsão elétrica. As atividades fúngicas mais elevadas foram também apresentadas por estes dois peptídeos, que são os de maiores cargas positivas, sendo que “K[1,8,15];R[4,12]”, o mais catiônico foi o único a apresentar atividade significativa contra *C. neoformans* (Tab. 2).

Tabela 2. Atividade biológica dos análogos de *ocellatin 4*.

Peptídeos	MIC (µM)										HC ₅₀ (µM)
	Gram-negativas		Gram-positivas		Fungos				Hemáceas		
	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.krusei</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.neoformans</i>	Hemáceas	
Ocellatin 4	64,0	-	-	64,0	-	-	-	-	-	-	14,3
K[1,4,8,15];A[12,16,20]	8,0	16,0	4,0	4,0	7,8	15,6	15,6	15,6	62,5	62,5	0,4
K[1,8,15];N[4,12]	4,0	8,0	8,0	2,0	31,2	31,2	31,2	62,5	62,5	62,5	Inativo
K[1,8,15];R[4,12]	4,0	8,0	4,0	4,0	7,8	15,6	15,6	7,8	7,8	7,8	3,0
S5;K7;A10;N12	8,0	32,0	2,0	16,0	-	-	-	-	-	-	Inativo
S5;K7;insV10;A11;N13	16,0	128,0	8,0	Inativo	-	-	-	-	-	-	Inativo
del2;S4;K6;A9;N11	32,0	Inativo	8,0	128,0	-	-	-	-	-	-	Inativo
del2;S4;K[6,17];A9;N11	64,0	Inativo	16,0	Inativo	-	-	-	-	-	-	Inativo

Inativo: sem atividade na maior concentração testada, 128 µM.

"-": não testado.

“K[1,8,15];N[4,12]”, apesar de ser o terceiro peptídeo mais catiônico, não apresentou atividade hemolítica e teve atividade antifúngica mais fraca, sugerindo a possibilidade dos resíduos de asparagina (N) nas posições 4 e 12 (Fig. 17) terem prejudicado o mecanismo que levou às fortes atividades hemolítica e antifúngica de “K[1,4,8,15];A[12,16,20]” e “K[1,8,15];R[4,12]”. Em relação à atividade antibacteriana, entretanto, “K[1,8,15];N[4,12]” é tão ativo quanto “K[1,8,15];R[4,12]” e ambos são discretamente mais ativos que “K[1,4,8,15];A[12,16,20]”.

A organização da região 1 a 18 do análogo “S5;K7;A10;N12” igual à de *ranatuerin* 2B favoreceu a atividade antibacteriana e eliminou a atividade hemolítica. Embora contenha um resíduo de aspartato (D), “S5;K7;A10;N12” foi tão ativo contra *E. coli* quanto “K[1,4,8,15];A[12,16,20]”, que não contém aspartato, indicando que a presença de um único resíduo negativamente carregado, na posição 4, não é suficiente para prejudicar a atividade contra *E. coli*. “S5;K7;A10;N12” foi menos ativo que os três peptídeos fortemente catiônicos contra *P. aeruginosa*, porém mais ativo contra *B. subtilis*. “K[1,8,15];N[4,12]” e “S5;K7;A10;N12”, ambos não-hemolíticos e com atividade antibacteriana, são, dentre os análogos de *ocellatin* 4 que sintetizamos, os que apresentam melhores perspectivas terapêuticas. Suas seqüências poderão ser usadas como ponto de partida para o planejamento de peptídeos não-hemolíticos ainda mais potentes contra microorganismos.

3. Estudo preliminar da atividade proteolítica na secreção de *L. ocellatus*

A possibilidade da ocorrência de proteases ativas na secreção cutânea de *L. ocellatus* foi evidenciada pelo fato de que, durante as análises de frações cromatográficas por MALDI-TOF MS, foram detectadas as massas correspondentes a 16 fragmentos peptídicos N-terminais e um fragmento C-terminal derivados de *ocellatins* 1 a 5. Três fragmentos N-terminais e o fragmento

C-terminal foram seqüenciados e tiveram suas estruturas primárias confirmadas (Tab. 3). A identificação dos demais fragmentos C-terminais correspondentes aos N-terminais encontrados foi impossibilitada devido ao fato de que a faixa de massa dessas pequenas moléculas coincide com a faixa dos picos gerados pela ionização da matriz HCCA.

Tabela 3. Fragmentos de *ocellatins* detectados por MALDI-TOF MS.

Fragmentos	MMT	MME	MME-MMT
<i>Ocellatin 1</i>			
LVGKISEKV*	970,60	970,89	0,29
GVVDILKGAGKDL	1283,74	1283,94	0,20
GVVDILKGAGKDLL	1396,83	1396,57	-0,26
GVVDILKGAGKDLLA	1467,87	1468,58	0,71
GVVDILKGAGKDLLAH*	1604,92	1604,96	0,04
GVVDILKGAGKDLLAHL	1718,01	1717,56	-0,45
GVVDILKGAGKDLLAHLVG	1874,10	1874,80	0,70
<i>Ocellatin 2</i>			
GVLDFKDAAKQ	1303,71	1304,30	0,59
GVLDFKDAAKQI	1416,80	1416,83	0,03
GVLDFKDAAKQILA*	1600,92	1601,32	0,40
<i>Ocellatin 3</i>			
GVLDFKNAAKNIL	1480,90	1481,17	0,27
GVLDFKNAAKNILA	1551,93	1551,96	0,03
GVLDFKNAAKNILAHA	1760,03	1759,50	-0,53
<i>Ocellatin 4</i>			
GLLDFVTGVGKDI	1332,73	1332,66	-0,07
GLLDFVTGVGKDIFAQ	1678,89	1678,93	0,04
GLLDFVTGVGKDIFAQLIK	2033,16	2033,58	0,42
<i>Ocellatin 5</i>			
GLLDFLKAAGKGLVTN*	1615,93	1616,44	0,51

*Fragmento seqüenciado.

Os pontos de clivagem correspondentes aos fragmentos situam-se entre as posições 12 e 20 (Fig. 18). Não foi possível identificar a presença de motivo nas seqüências que cause o

reconhecimento como substrato para peptidases, porém, o conjunto de fragmentos de *ocellatin 1* parece retratar algumas clivagens C-terminais sucessivas, o que pode indicar a presença de uma carboxipeptidase na secreção de *L. ocellatus*.



Figura 18. Pontos de clivagem (setas) observados nos fragmentos de *ocellatins 1 a 5*, *syphaxin* e *fallaxin*. Em preto, destacam-se resíduos negativamente carregados; em branco, positivamente carregados; em cinza escuro, apolares e, em cinza claro, polares não-carregados.

Até o momento, não foram encontrados nas secreções cutâneas de leptodactilídeos peptídeos processados que resultem de clivagens entre as posições 1 e 11. Os fragmentos de *syphaxin* descritos por Dourado *et al.* originaram-se de cisões ao C-terminal dos resíduos 16, 19, 22, 23 e 24, enquanto o fragmento de *fallaxin* resulta de cisão após o resíduo 22 (Rollins-Smith *et al.*, 2005) (Fig. 18).

Foi observado que alguns fragmentos peptídicos isolados das secreções de outras famílias de anfíbios anuros sofrem amidação C-terminal após a clivagem (Resnick *et al.*, 1991), o que pode restaurar a atividade antimicrobiana perdida com a cisão (Sitaram & Nagaraj, 1999) ou ativar os fragmentos para o desempenho de outras funções, por exemplo, hormonais. É possível que o segmento 1-11 seja relevante para o desempenho de funções biológicas e que a clivagem entre essas posições seja, por este motivo, menos freqüente. Porém, o número de peptídeos resultantes de

processamento proteolítico conhecidos até o momento é demasiadamente pequeno e ainda não permite conclusões definitivas a respeito da ocorrência ou da frequência de clivagens nas regiões N-terminais.

O ensaio com substratos fluorogênicos revelou que a secreção de *L. ocellatus* ocasionou clivagens nas regiões C-terminais de um resíduo de leucina (L) e de um resíduo de arginina (R) precedido por fenilalanina (F) (Fig. 19), as quais correlacionam-se com algumas das clivagens que originaram os fragmentos que identificamos. Quatro fragmentos resultam de clivagens após resíduos de leucina. Considerando-se as polaridades dos resíduos, a clivagem após arginina, com cadeia lateral positivamente carregada, precedida de fenilalanina, com cadeia lateral hidrofóbica, poderia ser comparada às clivagens após histidina precedida de alanina, em *ocellatin 1*, e após lisina precedida de isoleucina, em *ocellatin 4*.

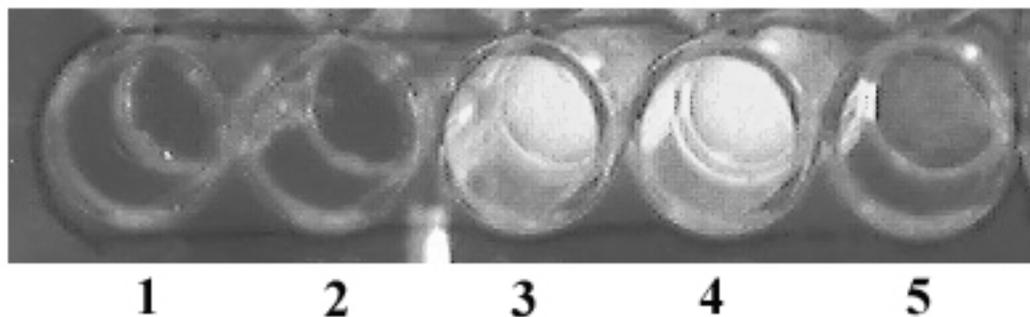


Figura 19. Fluorescência originada pela clivagem proteolítica de dois substratos pela secreção de *L. ocellatus*. 1) G-P-L-G-P-AMC; 2) I-A-AMC; 3) L-AMC; 4) F-R-AMC E 5) G-P-AMC.

Diversas repetições do ensaio espectrofotométrico para detecção de atividade proteolítica confirmaram a ocorrência de proteases ativas na secreção bruta de *L. ocellatus*, capazes de clivar caseína. A realização do ensaio com as frações cromatográficas da secreção indicou que a fração proteolítica corresponde ao pico eluído em aproximadamente 13% de TFA 0,1% (v/v) em

acetonitrila (Fig. 5, fração n° 1). Não foi possível obter espectros de massa desta amostra, mas a aplicação em gel SDS-PAGE 12% sem gelatina, corado com prata, revelou bandas de, aproximadamente, 118 000 u; 63 000 u; 54 000 u e 24 000 u (Fig. 20).

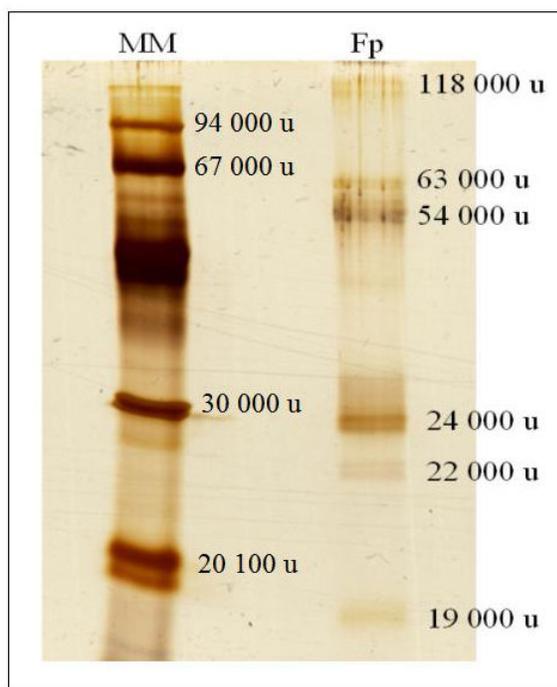


Figura 20. SDS-PAGE da fração cromatográfica proteolítica da secreção de *L. ocellatus* (Fp), em gel 12% corado com prata. MM: marcador de massa molecular.

A aplicação de 10 µg de secreção de *L. ocellatus* em gel SDS-PAGE 10% copolimerizado com 0,1% (p/v) de gelatina, incubado em pH 8,0, revelou, na extremidade superior, duas bandas com atividade proteolítica que se aproximam de 118 000 u. Com menos definição, foram observadas outras regiões ativas de menor faixa de massa molecular (Fig. 21A).

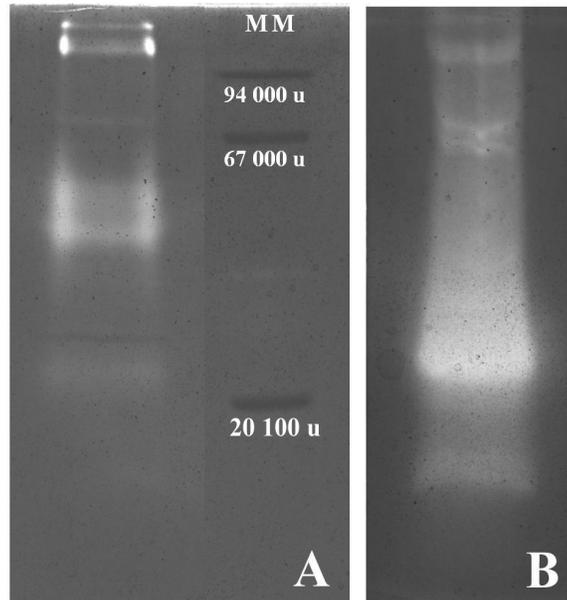


Figura 21. Atividade gelatinolítica da secreção de *L. ocellatus* em SDS-PAGE 10%-gelatina 0,1%: A) pH 8,0; B) pH 5,0; MM, marcador de massa molecular.

A atividade proteolítica da secreção de *L. ocellatus* revelou-se estável e resistente à liofilização, tendo se conservado em material liofilizado mantido a -20°C por cinco anos, o que pode estar relacionado à pouca sensibilidade a variações de temperatura e pH. À temperatura ambiente (25°C), observamos um discreto aumento da atividade proteolítica, porém valores semelhantes foram obtidos a 40 e 60°C . A atividade permaneceu também bastante significativa no intervalo de pH 5,0 a pH 10,0, porém não foi observada em pH 4,0.

É provável que o fato das variações de temperatura e pH ocasionarem poucas alterações perceptíveis na atividade proteolítica total da secreção de *L. ocellatus* decorra, em parte, da presença de mais de uma protease, pois, na medida em que temperatura e pH variam, a atividade de algumas proteases pode ser reduzida enquanto a de outras aumenta. A comparação entre géis incubados em pH 8,0 e pH 5,0 (Fig. 21) mostra que é possível a ocorrência deste efeito. Em relação ao gel em pH

8,0, o gel em pH 5,0 apresenta um grande aumento de atividade em uma das regiões de menor massa molecular, enquanto a atividade das regiões acima pode ter sido reduzida (Fig. 21B).

O teste preliminar de inibição foi realizado com coquetel para evitar que apenas algumas proteases da amostra fossem inibidas, enquanto outras permaneceriam ativas, dificultando a verificação dos resultados. Porém, ainda assim, não foi possível observar inibição. O coquetel utilizado continha inibidores de serino-proteases, cisteíno-proteases e metalo-proteases, porém não incluía inibidores de aspártico-proteases. Uma possível causa da ausência de inibição poderia ser a ocorrência de forte atividade de aspártico-proteases na amostra. Entretanto, acreditamos ser mais provável que a inibição não tenha sido observada devido a problemas metodológicos, que poderão ser revelados e corrigidos pela realização de experimentos de inibição adicionais, em que variem a natureza dos inibidores, as concentrações de amostra e de inibidores e o tempo de incubação, entre outras condições.

VII – PERSPECTIVAS

As possibilidades de continuidade dos estudos de compostos protéicos da secreção cutânea de *L. ocellatus* são inúmeras, tendo em vista a grande quantidade de aspectos que ainda poderiam ser investigados.

Quanto à caracterização de novos peptídeos ativos, seria interessante o desenvolvimento de uma estratégia de purificação das amostras ativas que não puderam ser resolvidas por cromatografia em coluna Vydac C₁₈ 218TP54, 4,6 x 250 mm. Uma possibilidade seria a utilização de colunas de sílica monolítica, resina que oferece maior superfície de contato com moléculas relativamente pequenas (Korby & Kallury, 2005).

As frações presentes em quantidades reduzidas na secreção, como *ocellatin 5*, poderiam ser sintetizadas, o que permitiria determinações de MIC para vários microorganismos e de concentrações líticas para diversos tipos de células eucarióticas. As determinações de atividade biológica poderiam incluir testes contra células de artrópodes, objetivando-se verificar se os componentes hemolíticos da secreção poderiam, de fato, oferecer proteção contra ectoparasitas. Com as frações não-hemolíticas, poderiam ser realizados testes contra parasitas intraeritrocíticos, como *Plasmodium falciparum*, visto que alguns peptídeos de anfíbios, como *dermaseptin S3* (Krugliak *et al.*, 2000), são capazes de eliminar estes parasitas sem causar danos às hemácias.

Tendo ainda em vista a caracterização de novos componentes da secreção de *L. ocellatus*, um procedimento relativamente simples e que possivelmente traria resultados interessantes seria a separação entre secreções de machos e de fêmeas, o que poderia permitir a identificação de peptídeos que desempenhem funções de feromônios, como *LASP*, de *L. fallax*. (King *et al.*, 2005b).

Quanto aos estudos da relação estrutura-atividade, uma possibilidade seria aprofundar a verificação do efeito dos resíduos de lisina sobre a atividade citolítica, realizando-se substituições por lisina em cada posição da seqüência de um peptídeo e substituindo-se as lisinas originais do peptídeo por alanina.

Tendo a organização da região N-terminal do análogo “S5;K7;A10;N12” (similar à de *ranatuerin 2B*) se revelado favorável à atividade antimicrobiana, em detrimento da atividade hemolítica, seria também interessante fazer, a partir desse peptídeo, substituições individuais de cada resíduo por um resíduo com uma propriedade oposta, como hidrofobicidade, carga ou tamanho da cadeia lateral, o que permitiria verificar a relevância dessas características em cada posição da seqüência. A associação de experimentos de dicroísmo circular à síntese de análogos de peptídeos seria bastante enriquecedora, pois permitiria estabelecer relações de causa e efeito entre alterações

na estrutura primária e alterações na estrutura secundária, bem como o cálculo do momento hidrofóbico para os peptídeos.

Dentre as diversas possibilidades de continuação do presente trabalho, três ensaios serão realizados em breve: o teste de cinética da atividade proteolítica da secreção de *L. ocellatus* sobre substrato caseína-cromógeno; o ensaio de atividade proteolítica em SDS-PAGE-gelatina na presença de inibidores irreversíveis, o qual poderia revelar a que classe pertencem algumas das bandas proteolíticas observadas e, por fim, a tentativa de caracterizar os precursores dos peptídeos secretados por *L. ocellatus*.

Os precursores de peptídeos antimicrobianos de secreção cutânea de anfíbios apresentam a região do peptídeo-sinal bastante conservada interespecificamente (Vanhoye *et al.*, 2003; Nicolas *et al.*, 2003). Dadas as observações de similaridade entre *ocellatin 4* e peptídeos de *Litoria aurea* e *Litoria caerulea*, é possível que, utilizando-se um primer 5' correspondente à região altamente conservada dos precursores dos peptídeos dessas duas espécies de rãs (Chen *et al.*, 2005b; Pukala *et al.*, 2006a) e partindo-se de RNAm extraído de secreção cutânea, possamos amplificar cDNAs referentes aos precursores dos peptídeos de *L. ocellatus*. Essa técnica encontra-se já bem consolidada e apresenta alto índice de sucesso. Caso nossa tentativa seja bem-sucedida, realizaremos a primeira caracterização de precursores de peptídeos da secreção cutânea de um leptodactídeo.

VIII – CONCLUSÃO

A caracterização de peptídeos da secreção cutânea de anfíbios anuros é importante para a ampliação dos conhecimentos sobre a biologia dos anfíbios e para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos de origem peptídica, que poderão ser eficientes contra patógenos resistentes.

Até então, apenas oito peptídeos de leptodactilídeos eram conhecidos. O presente trabalho somou a esse número dois novos peptídeos, *ocellatins* 4 e 5. Os peptídeos *ocellatins* 1-5, de *L. ocellatus*, constituem um grupo de moléculas fracamente catiônicas, variando entre 17 e 25 resíduos de aminoácidos, com conservação dos resíduos G1, D4, K11 e I21. *Ocellatins* 1-5 possuem atividade hemolítica significativa e atividade antimicrobiana fraca em comparação à de alguns peptídeos de anfíbios. Outros peptídeos hemolíticos, ainda não caracterizados, estão presentes na secreção de *L. ocellatus*, evidenciando uma possível necessidade de proteção contra ectoparasitas.

O estudo da secreção cutânea de *L. ocellatus* confirmou observações previamente feitas por outros autores, como a ocorrência de proteases ativas secretadas juntamente com os peptídeos, relatada por Resnick *et al.* (1991) e a tendência de moléculas com tempo de retenção mais longo em RP-HPLC apresentarem atividade hemolítica e atividade contra a bactéria *S. aureus* (Sitaram & Nagaraj, 1999; Nielsen *et al.*, 2007).

O presente projeto foi um dos primeiros trabalhos sobre secreção cutânea de anfíbios realizados no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da Universidade de Brasília e forneceu dados relevantes para o aperfeiçoamento de técnicas e a continuidade desta linha de pesquisa no laboratório.

Os estudos dos análogos de *ocellatin* 4 e da atividade proteolítica darão origem a novos artigos, a serem submetidos para publicação em periódicos internacionais. A caracterização do peptídeo *ocellatin* 4 originou o artigo *Purification, characterization and homology analysis of ocellatin 4, a cytolytic peptide from the skin secretion of the frog Leptodactylus ocellatus* (doi:10.1016/j.toxicon.2007.07.014), publicado pela revista *Toxicon* (ISSN: 0041-0101, IF 2006 = 2,509). As seqüências de aminoácidos de *ocellatin* 4 e *ocellatin* 5 foram submetidas ao banco de dados UniProt e seus números de acesso são, respectivamente, P85090 e P85443.

IX – REFERÊNCIAS

- Altschul, S.F., Maden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Amiche, M., Seon, A.A., Pierre, T.N., Nicolas, P., 1999. The dermaseptin precursors: a protein family with a common preproregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 456, 352-356.
- Apponyi, M.A., Pukala, T.L., Brinkworth, C.S., Maselli, V.M., Bowie, J.H., Tyler, M.J., Booker, G.W., Wallace, J.C., Carver, J.A., Separovic, F., Doyle, J., Llewellyn, L.E., 2004. Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. *Peptides* 25, 1035-1054.
- Atherton, E., Sheppard, R.C., 1989. *Solid phase peptide synthesis: a practical approach (the practical approach series)*, Oxford University Press, USA.
- Barra, D., Simmaco, M., 1995. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends Biotechnol.* 13, 205–209.
- Bechinger, B., 1999. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 157-183.
- Biggin, P., Sansom, M., 1999. Interactions of α -helices with lipid bilayers: a review of simulation studies. *Biophys. Chem.* 76, 161-183.
- Blondelle, S.E., Lohner, K., Aguilar, M.I., 1999. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 89-108.

- Charpentier, S., Amiche, M., Mester, J., Vouille, V., Le Caer, J.P., Nicolas, P., Delfour, A., 1998. Structure, synthesis and molecular cloning of dermaseptins B, a family of skin peptide antibiotics. *J. Biol. Chem.* 273, 14690–14697.
- Chen, Y., Mant, C.T., Farmer, S.W., Hancock, R.E.W., Vasil, M.L., Hodges, R.S., 2005a. Rational design of α -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *J. Biol. Chem.* 280, 12316–12329.
- Chen, T., Scott, C., Tang, L., Zhou, M., Shaw, C., 2005b. The structural organization of aurein precursor cDNAs from the skin secretion of the Australian green and golden bell frog, *Litoria aurea*. *Regul. Pept.* 128, 75– 83.
- Chen, T., Zhou, M., Rao, P., Walker, B., Shaw, C., 2006. The Chinese bamboo leaf odorous frog (*Rana (Odorrana) versabilis*) and North American *Rana* frogs share the same families of skin antimicrobial peptides. *Peptides* 27, 1738-1744.
- Clinkenbeard, K.D., Thiessen, A.E., 1991. Mechanism of action of *Moraxella bovis* hemolysin. *Infect. Immun.* 59, 1148-1152.
- Conlon, J.M., Sonnevend, A., Patel, M., Camasamudram, V., Nowotny, N., Zilahi, E., Iwamuro, S., Nielsen, P.F., Pál, T., 2003. A *melittin*-related peptide from the skin of the Japanese frog, *Rana tagoi*, with antimicrobial and cytolytic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 496–500.
- Conlon, J.M., Al-Ghaferi, N., Abraham, B., Sonnevend, A., King, J.D., Nielsen, P.F., 2006a. Purification and properties of *laticeptin*, an antimicrobial peptide from skin secretions of the South American frog *Leptodactylus laticeps*. *Protein Pept. Lett.* 13, 355-359.
- Conlon, J.M., Al-Ghaferi, N., Abraham, B., Jiansheng, H., Cosette, P., Leprince, J., Jouenne, T., Vaudry, H., 2006b. Antimicrobial peptides from diverse families isolated from the skin of the Asian frog, *Rana grahami*. *Peptides* 27, 2111–2117.

- Csordas, A., Michl, H., 1969. Primary structure of two oligopeptides of the toxin of *Bombina variegata* L.. *Toxicon*. 7, 103-108.
- Dathe, M., Wieprecht, T., 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 71-87.
- Dietl, J., Fritz, S., Kittel, R., Sole, M., 2004. *Leptodactylus ocellatus*. AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. Berkeley, California. Accessible at: <http://amphibiaweb.org/>. (Accessed: 02.01.2008).
- Dourado, F.S., Leite, J.R., Silva, L.P., Melo, J.A., Bloch Jr., C., Schwartz, E.F., 2007. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus siphax*. *Toxicon* 50, 572–580.
- Duda Jr., T.F., Vanhoye, D., Nicolas, P., 2002. Roles of diversifying selection and coordinated evolution in the evolution of amphibian antimicrobial peptides. *Mol. Biol. Evol.* 19, 858–864.
- Duellman, W.E., Trueb, L., 1994. *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, USA.
- Eisenberg D., Weiss R.M., Terwilliger C.T., Wilcox W., 1982. Hydrophobic moments and protein structure. *Faraday Symp. Chem. Soc.* 17, 109-120.
- Epand, R.M., Vogel, H.J., 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 11-28.
- Feder, R., Dagan, A., Mor, A., 2000. Structure-Activity Relationship Study of Antimicrobial Dermaseptin S4 Showing the Consequences of Peptide Oligomerization on Selective Cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 275, 4230–4238.
- Fontes, W., Cunha, R.B., Sousa, M.V., Morhy, L., 1998. Improving the recovery of lysine in automated protein sequencing. *Anal. Biochem.* 258, 259-267.

- Frost, D.R., 2007. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.1. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Ghosh, J.K., Shaool, D., Guillaud, P., Ciceroni, L., Mazieri, D., Kustanovich, I., Shai, Y., Mor, A., 1997. Selective Cytotoxicity of Dermaseptin S3 toward Intraerythrocytic Plasmodium falciparum and the Underlying Molecular Basis. *J. Biol. Chem.* 272, 31609–31616.
- 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, 894-900.
- Hancock, R.E.W., Chapple, D., 1999. Peptide antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1317-1323.
- Iijima, N., Tanimoto, N., Emoto, Y., Morita, Y., Uematsu, K., Murakami, T., Nakai, T., 2003. Purification and characterization of three isoforms of chrysophysin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *Eur. J. Biochem.* 270, 675–686.
- King, J.D., Al-Ghaferi, N., Abraham, B., Sonnevend, A., Leprince, J., Nielsen, P.F., Conlon, J.M., 2005a. *Pentadactylin*: an antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 141, 393–397.
- King, J.D., Rollins-Smith, L.A., Nielsen, P.F., John, A., Conlon, J.M., 2005b. Characterization of a peptide from skin secretions of male specimens of the frog, *Leptodactylus fallax* that stimulates aggression in male frogs. *Peptides* 26, 597-601.
- Korby, M., Kallury, K., 2005. Advantage of Silica Monolithic HPLC Columns – Highly Reproducible Results with Onyx™ - Phenomenex – Application note TN1025, at <http://www.phenomenex.com/phen/Products/onyx/pdf/TN-1025.pdf>

- Kreil, G., 1975. The structure of *Apis dorsata melittin*: phylogenetic relationships between honeybees as deduced from sequence data. *FEBS Lett.* 54, 100-102.
- Kruger, N.J., The Bradford method for protein quantitation, in Walker, J.M. (ed.), *The Protein Protocols Handbook: second edition*, Humana Press, Totowa, 2002, pp. 747–752.
- Krugliak, M., Feder, R., Zolotarev, V., Gaidukov, L., Dagan, A., Ginsburg, H., Mor, A., 2000. Antimalarial Activities of Dermaseptin S4 Derivatives, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2442-2451.
- Kyte J., Doolittle R., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Lee, K.H., Lee, D.G., Park, Y., Kang, D., Shin, S.Y., Hahn, K.S., Kim, Y., 2006. Interactions between the plasma membrane and the antimicrobial peptide HP (2-20) and its analogues derived from *Helicobacter pylori*. *Biochem J.* 394, 105-114.
- Lequin, O., Ladram, A., Chabbert, L., Bruston, F., Convert, O., Vanhoye, D., Chassaing, G., Nicolas, P., Amiche, M., 2006. Dermaseptin S9, an α -helical antimicrobial peptide with a hydrophobic core and cationic termini. *Biochemistry* 45, 468-480.
- Lohner, K., Prenner, E., 1999. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 141-156.
- Ludtke, S.J, He, K., Heller, W.T., Harroun, T.A., Yang, L., Huang, H.W., 1996. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* 35, 13723-13728.
- Matsuzaki, K., 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 1-10.
- Nascimento, A.C., Fontes, W., Sebben, A., Castro, M.S., 2003. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein Pept. Lett.* 10, 227-238.

- Nascimento, A.C., Zanotta, L.C., Kyaw, C.M., Schwartz, E.N., Schwartz, C.A., Sebben, A., Sousa, M.V., Fontes, W., Castro, M.S., 2004. *Ocellatins*: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). *Protein J.* 23, 501–508.
- Nicolas, P., Vanhoye, D., Amiche, M., 2003. Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. *Peptides* 24, 1669–1680.
- Nielsen, S.L., Frimodt-Møller, N., Kragelund, B.B., Hansen, P.R., 2007. Structure-activity study of the antibacterial peptide *fallaxin*. *Protein Sci.* 16, 1969-1976.
- Oren, Z., Shai, Y., 1998. Mode of action of linear amphipathic α -helical anti-microbial peptides. *Biopolymers* 47, 451-463.
- Oren, Z.; Hong, J., Shai, Y., 1999. A comparative study on the structure and function of a cytolytic α -helical peptide and its antimicrobial β -sheet diastereomer. *Eur. J. Biochem.* 259, 360-369.
- Pukala, T.L., Bertozzi, T., Donnellan, S.C., Bowie, J.H., Surinya-Johnson, K.H., Liu, Y., Jackway, R.J., Doyle, J.R., Llewellyn, L.E., Tyler, M.J., 2006a. Host-defence peptide profiles of the skin secretions of interspecific hybrid tree frogs and their parents, female *Litoria splendida* and male *Litoria caerulea*. *FEBS J.* 273, 3511–3519.
- Pukala, T.L., Bowie, J.H., Maselli, V.M., Musgrave, I.F., Tyler, M.J., 2006b. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. *Nat. Prod. Rep.* 23, 368–393.
- Resnick, N., Maloy, W., Crut, H. & Zasloff, M., 1991. A novel endopeptidase from *Xenopus* that recognises α -helical structure. *Cell* 66, 541–554.
- Rollins-Smith, L.A., King, J.D., Nielsen, P.F., Sonnevend, A., Conlon, J.M., 2005. An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura:Leptodactylidae). *Regul. Pept.* 124, 173–178.

- Rozek, T., Wegener, K.L., Bowie, J.H., Olver, I.N., Carver, J.A., Wallace, J.C., Tyler, M.J., 2000. The antibiotic and anticancer active *aurein* peptides from the Australian bell frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. Eur. J. Biochem. 267, 5330-5341.
- Schiffer, M., Edmundson, A.B., 1967. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. Biophys. J. 7, 121– 135.
- 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. Biochim. Biophys. Acta. 1462, 55-70.
- Shalev, D., Mor, A., Kustanovich, I., 2002. Structural Consequences of Carboxyamidation of Dermaseptin S3, Biochemistry 41, 7312-7317.
- Sitaram, N., Nagaraj, R., 1999. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. Biochim. Biophys. Acta 1462, 29-54.
- Sousa, M.M.L., 2003. Análise proteômica da peçonha de *Cerodirphia speciosa* (Lepidoptera, Saturniidae). Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular – Departamento de Biologia Celular - Universidade de Brasília.
- Stebbins, R.C., Cohen, N.W., 1995. A Natural History of Amphibians. Princeton University Press, New Jersey.
- Steinborner, S.T., Bowie, J.H., Tyler, M.J., Wallace, J.C., 1997. An unusual combination of peptides from the skin glands of Ewing's tree frog, *Litoria ewingi* - Sequence determination and antimicrobial activity. Aust. J. Chem. 50, 889-894.
- Swofford, D.L., Begle, D.P., 1993. PAUP – Phylogenetic Analysis Using Parsimony – User's Manual. Smithsonian Institution, Washington, USA.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Toledo, R.C., Jared, C., 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 111A, 1-29.
- Vanhoeye, D., Bruston, F., Nicolas, P., Amiche, M., 2003. Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *Eur. J. Biochem.* 270, 2068–2081.
- Waugh, R.J., Stone, D.J.M., Bowie, J.H., Wallace, J.C., Tyler M.J., 1993. Peptides from Australian frogs. Structures of the caeridins from *Litoria caerulea*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 573-576.
- 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, 5449–5454.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.

X – APÊNDICE

Artigo publicado pela revista *Toxicon*