



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

LUZ ELENA TRIANA VIDAL

TESE DE DOUTORADO

**Composição proteica e caracterização funcional da
secreção cutânea de *Dendropsophus columbianus*
(Boettger, 1892)**

Brasília, Março de 2017

LUZ ELENA TRIANA VIDAL

TESE DE DOUTORADO

**Composição proteica e caracterização funcional da
secreção cutânea de *Dendropsophus columbianus*
(Boettger, 1892)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

**Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas – Departamento de
Biologia Celular - UnB**

Brasília, Março de 2017

*Dedico este trabalho ao povo brasileiro
por ter realizado meu sonho de estudar*

Agradecimentos

Apresento os meus mais sinceros agradecimentos à meu orientador Sébastien Olivier Charneau, aos professores Wagner Fontes e Mariana Castro, ao laboratório de bioquímica de proteínas, ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da faculdade de Medicina, à Universidade de Brasília (UnB), à Universidad del Cauca, aos professores Carlos André Ricart, Consuelo Lima, Philippe Grellier, Osmino Rodrigues Pires Júnior, Sonia Maria de Freitas, Jimmy Alexander Guerrero Vargas, Izabela Dourado Bastos, Renato Caparroz, aos biólogos Jorge Alberto Zúñiga e Alice Cunha Morales Álvares, à Deus, minha família, meus amigos e colegas.

Este projeto foi desenvolvido graças ao apoio financeiro da Universidade de Brasília (UnB) e das agências brasileiras de fomento à pesquisa, CAPES/Incentivo à Pesquisa em Parasitologia Básica [23038.005298/2011-83], Cooperação Franco-Brasileira CAPES-COFECUB (723/11), Rede Pró-Centro-Oeste (FAPEG / CNPq 563998/2010-4 e 563998/2010-5), FAPDF [193.000.987], Finep, Fundação Hemocentro de Brasília, Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris na França.

SÚMARIO

Resumo.....	1
Palavras-chave.....	3
Abstract.....	4
Keywords.....	6
Lista de abreviaturas.....	7
1. Introdução	9
1.1. Secreção cutânea de anfíbios	10
1.1.1. Peptídeos antimicrobianos (AMPs): conceitos gerais	11
1.1.2. Seletividade, conformação, carga e hidrofobicidade dos AMP	13
1.1.3. Mecanismos de ação dos AMPs	17
1.1.3.1. Mecanismo por agregação	17
1.1.3.2. Mecanismo de formação de poro toroidal	17
1.1.3.3. Mecanismo de barril	18
1.1.3.4. Mecanismo Carpet-like.....	19
1.2. Potencial farmacológico dos AMPs	21
1.2.1. Atividade antibacteriana dos AMPs.....	21
1.2.2. Atividade antiparasitária dos AMPs	22
1.2.3. Atividade antifúngica dos AMPs	23
1.2.4. Atividade imunomoduladora dos AMPs.....	24
1.3. O processamento enzimático de AMPs e a atividade proteolítica da secreção cutânea de anuros	25
1.4. Estudos proteômicos do tipo <i>shotgun</i> das secreções cutâneas de anuros....	26
1.4. <i>Dendropsophus columbianus</i> (Boettger, 1892)	27
2. Justificativa.....	29
3. Objetivo	31
4. Materiais e Métodos	33
4.1. Etapa I, busca de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de <i>D. columbianus</i>	36
4.1.1. Obtenção da secreção cutânea.....	36
4.1.2. Perfil proteico: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	36
4.1.3. Fracionamento da secreção bruta	36
4.1.5. <i>Screening</i> antimicrobian	37
4.1.6. Purificação do peptídeo de interesse	38
4.1.7. Determinação da estrutura primária de peptídeo.....	38
4.1.8. Desenho racional de análogos e síntese de peptídeos	38
4.1.9. Dicroísmo circular	39
4.2. Ensaio biológicos	40
4.2.1. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica	40
4.2.2. Determinação da atividade antiparasitária	40
4.2.2.1. Ensaio In vitro contra <i>Plasmodium falciparum</i>	41

4.2.2.2. Ensaio In vitro contra <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	42
4.2.2.3. Ensaio in vitro contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
4.2.2.4. Atividade in vitro contra <i>Giardia lamblia</i>	43
4.3. Atividade hemolítica <i>in vitro</i>.....	43
4.4. Atividade citotóxica <i>in vitro</i>.....	43
4.5. Etapa II, análise peptidômica e proteômica da secreção cutânea de <i>D. columbianus</i> por <i>shotgun</i>.....	44
4.5.1. Identificação de proteínas presentes na secreção cutânea de <i>D. columbianus</i>.....	44
4.5.1.1. Digestão tríplica em solução.....	44
4.5.1.2. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS / MS).....	45
4.5.1.3. Identificação de proteínas	45
4.6. Identificação das enzimas proteolíticas.....	46
4.6.1. Zimografia	46
4.6.2. Digestão em gel SDS-PAGE.....	46
4.6.3. Análise por (LC-MS / MS)	47
4.7. Identificação dos peptídeos não tríplices presentes na secreção cutânea de <i>D. columbianus</i>.....	48
4.8. Avaliação da ativação de neutrófilos	49
5. Resultados.....	52
5.1. Etapa I, busca de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de <i>D. columbianus</i>	53
5.1.1. Perfil proteico em SDS-PAGE.....	54
5.1.2. Fracionamento de secreção bruta por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C ₁₈	54
5.1.3. Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF.....	55
5.1.4. <i>Screening</i> antimicrobiano preliminar	58
5.1.5. Purificação, determinação da estrutura primária da dendroporfina 1 (Dc 1) e construção dos análogos Dc 1.1 e Dc 1.2.....	58
5.1.6. Caracterização estrutural dos peptídeos Dc 1, Dc 1.1 e Dc 1.2	61
5.1.6.1. Projeção tridimensional das sequências primárias dos peptídeos.....	61
5.1.6.2. Análise por dicroísmo circular	63
5.1.6.3. Representação preliminar da estrutura em α -hélice do Dc 1nativo	66
5.1.7. Testes antimicrobianos	67
5.2. Etapa II, análise peptidômica e proteômica da secreção cutânea de <i>D. columbianus</i> por <i>shotgun</i>.....	69
5.2.1. Identificação de proteínas presentes na secreção cutânea de <i>D. columbianus</i>	69
5.2.2. Análise qualitativa das proteínas identificadas por LC-MS/MS.....	69
5.2.3. Anotação das proteínas identificadas.....	70
5.2.4. Proteínas na secreção cutânea de <i>D. columbianus</i> associadas à resposta contra microrganismos	74
5.2.5. Mapeamento das proteínas encontradas na secreção cutânea associadas à resposta de defesa de <i>D. columbianus</i>	75

5.2.6. Mapeamento das vias metabólicas a partir das proteínas identificadas na secreção cutânea de <i>D. columbianus</i>	77
5.2.7. Predição de proteínas secretadas pela pele de <i>D. columbianus</i>	78
5.2.8. Predição de proteínas com peptídeos sinal secretadas pela via clássica usando o servidor SignalP 4.1	79
5.3.9. Predição de proteínas com peptídeos sinal secretadas pela via não clássica usando o servidor SecretomeP 2.0	80
5.2.10. Identificação das hidrolases presentes na secreção cutânea de <i>D. columbianus</i>	80
5.2.11. Identificação de peptídeos endógenos presentes na secreção cutânea de <i>D. columbianus</i>	84
5.2.11.1. Busca por identidade de AMPs com atividade antimicrobiana descrita	85
5.2.11.2. Identificação das sequências com similaridade à Dc 1	86
5.2.11.3. Um novo grupo de peptídeos: as dendropsofinas.....	87
5.2.11.4. Caracterização funcional das Dendropsofinas Dc 2, Dc 7, Dc 13, Dc 17, Dc 18 e Dc 19.....	89
5.2.11.5. Avaliação da ativação de neutrófilos	89
6. Discussão.....	92
6.1. Etapa I, busca de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de <i>D. columbianus</i>	93
6.2.1. Mapeamento das proteínas associadas à resposta de defesa de <i>D. columbianus</i>.....	100
6.2.2. Identificação de hidrolases potencialmente responsáveis no processamento de peptídeos bioativos presentes na secreção cutânea de <i>D. columbianus</i>.....	102
7. conclusões.....	107
8. Perspectivas	110
8. Bibliografia	112

Resumo

A pele dos anfíbios é um tecido especializado na produção de diversas moléculas como peptídeos antimicrobianos, imunomoduladores, aminas biogênicas e hormônios. Esses compostos bioativos podem ser considerados de interesse biotecnológico e alternativas terapêuticas.

O objetivo do presente estudo foi identificar e caracterizar peptídeos e proteínas presentes na secreção cutânea do anfíbio *Dendropsophus columbianus* (Boettger, 1892), relacionados aos mecanismos de defesa contra patógenos.

A primeira abordagem consistiu no fracionamento clássico da secreção cutânea por RP-HPLC. Todas as frações cromatográficas obtidas foram avaliadas quanto à capacidade de inibir a proliferação bacteriana e analisadas por MALDI-TOF/TOF. Um único e novo (sem similaridade de sequência com peptídeos anotados) peptídeo antimicrobiano neutro foi assim isolado e denominado Dendropsofina 1 (Dc 1). Posteriormente, foram desenhados dois análogos catiônicos (Dc 1.1 e Dc 1.2) que mantiveram a estrutura anfipática de Dc 1. Dc 1 e seus dois análogos exibiram atividades antibacterianas moderadas e sem efeitos hemolíticos e citotóxicos em células de mamífero. O Análogo Dc 1.2 exibiu uma maior atividade antibacteriana, o que pode estar relacionado ao seu maior teor de α -hélice e estabilidade térmica em condição experimental hidrofóbica, comparando com Dc 1 e Dc 1.1. O peptídeo nativo Dc1 poderia ser usado como um modelo alternativo para desenvolver novos AMPs.

Numa segunda abordagem, mais moderna e de alta acurácia, foi realizado o primeiro estudo proteômico e peptidômico abrangente da secreção cutânea utilizando nanoLC-MS/MS do tipo Orbitrap Elite™. Os dados foram processados através dos softwares PEAKS e Blast2GO. Foram identificadas 1248 proteínas presentes na secreção cutânea de *D. columbianus*, 127 proteínas foram categorizadas como associadas ao sistema de defesa e 19 relacionadas à resposta contra microrganismos. Mediante zimografia foram detectadas e posteriormente identificadas três hidrolases ativas na secreção total, as quais podem estar relacionadas com o processamento de peptídeos de defesa. Os resultados do peptidoma permitiram determinar um novo grupo de peptídeos endógenos a *D. columbianus*, com alta similaridade de sequência com Dc 1, que foram nomeados como dendropsofinas. As dendropsofinas Dc2, Dc7, DC13, Dc 17, Dc 18 e Dc 19 não apresentaram atividade contra bactérias nem fungos. No entanto, Dc 2 e Dc 18 foram capazes de ativar neutrófilos humanos. Essa atividade poderia estar associada a uma modulação do sistema imune em *D. columbianus*. Esta via de defesa altamente conservada em vertebrados, abre perspectivas quanto ao uso dessas novas moléculas na terapia de doenças infecciosas.

Palavras-chave

Anuros; *Dendropsophus columbianus*; secreção cutânea; peptídeo antimicrobiano; análogos; peptidoma; proteoma; dendropsofinas e ativadores de neutrófilos.

Abstract

Amphibian skin is a tissue specialized in the production of various molecules such as antimicrobial peptides, immunomodulators, biogenic amines and hormones. These bioactive compounds could be considered of biotechnological interest and new therapeutic alternatives.

The aim of the present study was to identify and characterize peptides and proteins present in the cutaneous secretion of the amphibian *Dendropsophus columbianus* (Boettger, 1892), related to pathogen defense mechanisms.

The first approach consisted of the classical fractionation of cutaneous secretion by RP-HPLC. All chromatographic fractions obtained were evaluated for their ability to inhibit bacterial proliferation and analyzed by MALDI-TOF / TOF. A single new antimicrobial neutral peptide was thus isolated and named Dendropsophin 1 (Dc 1), with no sequence similarity with annotated peptides. Subsequently, two cationic analogues (Dc 1.1 and Dc 1.2) keeping the amphipathic structure of Dc 1 were designed. Dc 1 and its two analogues exhibited moderate antibacterial activities and no hemolytic and cytotoxic effects in mammalian cells. Dc 1.2 exhibited slightly improved antibacterial properties that could be related to the higher content of α -helix and thermal stability compared to Dc 1 and Dc 1.1 in hydrophobic experimental condition. The native peptide Dc 1 could be used as an alternative model to develop new AMPs.

In a second modern high-throughput approach, the first comprehensive proteomic and peptidomic study of cutaneous secretion was performed by nanoLC-MS/MS using Orbitrap Elite™ mass spectrometer. Data were processed using PEAKS and Blast2GO programs. 1248 proteins present in the cutaneous secretion of *D. columbianus* were identified, 127 proteins were categorized associated with the defense system and 19 related to the response against microorganisms. Three hydrolases from the total secretion were detected by zymography and subsequently identified, which could be related to the processing of peptides of defense. The peptidome results allowed determining a new group of peptides endogenous to *D. columbianus*, with high sequence similarity with Dc 1, which were named as Dendropsophins. The dendropsophins Dc 2, Dc 7, Dc 13, Dc 17, Dc 18 and Dc 19 showed no activity against bacteria or fungi. However, Dc 2 and Dc 18 are able to activate human neutrophils. This activity could be associated to a modulation of the immune system in *D. columbianus*. This pathway of defense, highly conserved in vertebrates, opens further perspectives regarding the use of these new molecules in the therapy of infectious diseases.

Keywords

Anurans; *Dendropsophus columbianus*; skin secretion; antimicrobial peptide; analogues; peptidome; proteome; dendropsophins and neutrophil activators.

Lista de abreviaturas

AMP: Peptídeo antimicrobiano

APD: The Antimicrobial Peptide Database

Dc: dendropofina

CD: Dicroísmo circular

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

fMLP: formil peptídeo met-leu-phe

GO: *gene ontology*

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

HCCA: ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

IC₅₀: Concentração inibitória necessária para inibir 50% da população

KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LC :Cromatografia Líquida

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

MIC: Concentração inibitória mínima

MQ: Água grau Milli-Q[®]

MS: Espectrometria de Massas

MS/MS: Espectrômetro de massas em série

TFA: ácido trifluoroacético

TFE: 2,2,2-Trifluoroetanol

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

SA: ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico (ácido sinapínico)

1. Introdução

1.1. Secreção cutânea de anfíbios

Os anfíbios representam o grupo tetrápode mais antigo do planeta. A classe Amphibia apresenta uma ampla distribuição em quase todos os continentes, devido à capacidade de colonizar habitats que se encontram em altitudes desde 0 a 3600 metros acima do nível do mar (Urban, Richardson, & Freidenfelds, 2014). A maior porcentagem dos anfíbios descritos corresponde à ordem anura, constituído por rãs e sapos, os quais desenvolveram adaptações evolutivas altamente específicas e conservadas. Neste contexto, podemos citar a pele, um dos caracteres filogenéticos mais especializados nestes animais, que evoluiu em resposta aos diferentes ecossistemas e atualmente desempenha funções de respiração, termorregulação, reprodução, proteção contra fatores bióticos, abióticos e antipredação (Räsänen, Laurila, & Merilä, 2003; Urban et al., 2014).

A pele dos anfíbios é caracterizada por seu aparato exócrino cutâneo. Dois tipos de glândulas são principalmente observadas, as glândulas mucosas e as granulosas (Konig, Bininda-Emonds, & Shaw, 2015). Estas estruturas estão dispersas no dorso do animal e excretam substâncias diretamente na superfície externa. As glândulas mucosas estão envolvidas em processos de manutenção da pele como hidratação, lubrificação e respiração; por outro lado as glândulas granulosas produzem geralmente compostos tóxicos tais como aminas biogênicas, esteróides, alcalóides, bufodienolides, peptídeos e proteínas que apresentam uma série de atividades biológicas, como capacidade neurotóxica, vasoconstritora, antimicrobiana e citotóxica (Clarke, 1997).

Em anuros, a produção de diversos compostos bioativos como aminas biogênicas e peptídeos é modulada pelo sistema nervoso central periférico, o que lhes permite agir simultaneamente em diferentes funções fisiológicas (Konig et al., 2015) e, assim como a maioria dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) podem ser encontrados tanto no trato gastrointestinal como na pele. No tegumento agem como uma defesa química dose-dependente contra potenciais predadores, mostrando geralmente um amplo espectro de atividades biológicas (Conlon, 2011).

O primeiro AMP foi encontrado na pele da rã *Bombina variegata europeia* há 30 anos. Não obstante, o descobrimento da magainina, um potente peptídeo microbicida, isolado da secreção cutânea de *Xenopus laevis*, foi, de fato, um impulso para a descoberta de numerosos peptídeos com atividade antibacteriana, antiparasitária e antifúngica (Conlon, Kolodziejek, & Nowotny, 2004). Os AMPs são sintetizados como um caractere filogenético único, geralmente com pouca ou nenhuma homologia de sequência com outros peptídeos previamente identificados em anfíbios (Hoffmann, Kafatos, Janeway, & Ezekowitz, 1999). Por exemplo, as tigerininas isoladas da *Rana tigerina* apresentam uma ligação dissulfeto intramolecular, que provoca a formação de um anel nonapeptídico; enquanto a temporina 10-d isolada a partir de *Rana ornativentris* não possui resíduo básico na sequência.

Esta diversidade estrutural confere a cada peptídeo uma especificidade quanto ao mecanismo de ação contra diversos patógenos [4], o que resulta em particular interesse para o desenvolvimento de agentes terapêuticos, uma vez que expõem características importantes como: amplo espectro de atividades antimicrobianas contra bactéria, leveduras, fungos e protozoários; seletividade pela membrana de microrganismos, podendo permeabilizar as membranas biológicas, atuam como imunomoduladores e, além disso, não compartilham os mecanismos de resistência dos antibióticos clássicos (Conlon et al., 2004).

1.1.1. Peptídeos antimicrobianos (AMPs): conceitos gerais

Os peptídeos antimicrobianos em geral são componentes da resposta imune inata que têm sido isolados de quase todos os grupos filogenéticos. Ao longo do tempo, os AMPs têm conservado sua capacidade antimicrobiana e, igualmente, seu papel modulador na imunidade (Apponyi et al., 2004). Esta dupla atividade permitiu o desenvolvimento de mecanismos de ação e de resistência específicos para cada peptídeo, o que resulta em notável interesse farmacêutico e

tecnológico na procura por medicamentos com alta seletividade e baixa resistência (Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006).

Os peptídeos antimicrobianos são codificados como precursores contendo uma pró-região ácida altamente conservada; depois de uma ou mais clivagens proteolíticas, os AMPs ativos são liberados por mecanismo holócrino, em resposta à presença de micro-organismos e em situações de estresse ou injúria (Nicolas & Mor, 1995).

Os AMPs possuem entre 10-50 resíduos de aminoácidos, uma carga global positiva (geralmente 2-9) e uma proporção hidrofóbica maior que 30% (Nascimento, Fontes, Sebben, & Castro, 2003). Estes peptídeos apresentam a capacidade de dobrar-se em uma estrutura anfipática tridimensional quando interagem com bicamadas lipídicas, de modo que os aminoácidos positivos podem agir de forma seletiva com membranas biológicas (Nascimento et al., 2003), interagindo diretamente com o patógeno. Igualmente os AMPs podem modular a resposta imune do organismo (Brown & Hancock, 2006). Por exemplo, as defensinas humanas aumentam a proliferação e a produção de citocinas por meio da indução de IL-10, atuando como amplificadores de sinais imunes (Chaly et al., 2000).

De acordo com a estrutura secundária, os AMPs podem classificar-se em três grupos estruturais: peptídeos α -helicoidais (i.e Magaininas); β -peptídeos estabilizados por folhas β (i.e Aureina 1.2) e peptídeos com estruturas estendidas, ricos em glicina, prolina, triptofano, arginina e/ou histidina (i.e Adeptinas) (Yount, Bayer, Xiong, & Yeaman, 2006).

Os peptídeos α -helicoidais compreendem o maior grupo de AMPs conhecidos e já foram reportados mais de 300 peptídeos catiônicos α -helicoidais (Epand & Vogel, 1999). Estes peptídeos foram encontrados no meio intra e extracelular de mamíferos, artrópodes, insetos, anfíbios e peixes; possuem, geralmente, 12-25 resíduos de aminoácidos, e apresentam uma extremidade hidrofílica catiônica e outra hidrofóbica bem definidas. A extremidade N-terminal

da α –hélice, geralmente, contém resíduos básicos e a extremidade c-terminal é a mais hidrofóbica (Teixeira, Feio, & Bastos, 2012). AMPs como magainina-2 e pleurocidina só se dobram em estrutura α - helicoidal dentro de meios miméticos à membrana (Nascimento et al., 2003; Yount et al., 2006).

Os β -peptídeos estabilizados por folhas β são compostos que apresentam folhas β antiparalelas que são estabilizadas por ligações dissulfeto. A presença de aminoácidos básicos fornece uma polaridade ao longo da cadeia tornando-a muito estável (Rivas, Luque-Ortega, & Andreu, 2009; Yount et al., 2006). As defensinas são um grupo de β -peptídeos que contém cisteínas, e são formadas por várias folhas β estabilizadas por 3-4 pontes dissulfeto. No caso das defensinas β existe um motivo conservado, denominado C-core, que é formado por duas folhas β antiparalelas e resíduos básicos ao longo do eixo (Teixeira et al., 2012).

Os peptídeos com estruturas estendidas, ricos em glicina, prolina, triptofano, arginina e/ou histidina diferem da estrutura α -helicoidal ou estrutura de folha β . Por exemplo, a Adeptina rica em triptofano adquire uma estrutura em forma de cunha em ambientes miméticos ao de membrana. Da mesma forma, certos peptídeos ricos em prolina como o PR-bombesina apresentam estruturas hélice do tipo II (Yeaman & Yount, 2003; Yount et al., 2006).

1.1.2. Seletividade, conformação, carga e hidrofobicidade dos AMP

A Seletividade, conformação, carga e hidrofobicidade são as características principais que determinam a atividade antimicrobiana dos AMPs (Teixeira et al., 2012).

Após a interação do peptídeo com a membrana do patógeno, o potencial eléctrico altera-se devido às interações eletrostáticas entre os grupos lipídicos e a face catiônica do peptídeo. Dessa forma, gera-se uma tensão superficial induzida pelas interações hidrofóbicas entre a bicamada lipídica e o extremo apolar da sequência peptídica, que resulta na permeabilização da membrana (Teixeira et al.,

2012). Este processo ocorre seletivamente devido à presença de fosfolípidos hidroxilados e altamente negativos como fosfatidilglicerol (PG) e fosfatidilserina (PS), na superfície de muitos microrganismos, e é esta carga líquida negativa nas membranas dos patógenos que favorece a interação eletrostática com os AMPs (Yeaman & Yount, 2003).

Um pré-requisito para o desenvolvimento de AMPs em nível farmacológico é a toxicidade seletiva, pois tal característica preserva a integridade estrutural e funcional das células hospedeiras. Peptídeos alpha-helicoidais, por exemplo, adoptam suas conformações ativas quando se encontram em meios miméticos aos de membranas de patógenos e só atravessam as membranas da célula hospedeira por processos de osmose ou difusão, gerando a lise só do patógeno intracelular (Jiang et al., 2008).

De modo geral, os AMPs geram um desordenamento seletivo da membrana celular, sem um receptor específico, não obstante a conformação, a carga e a hidrofobicidade são características fundamentais que determinam o mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos (Yeaman & Yount, 2003).

As sequências primárias dos AMPs são muito diversas e, em sua maioria, não apresentam homologia entre si, no entanto, compartilham padrões na conformação tridimensional quando interagem com a membrana do patógeno (Jiang et al., 2008). No caso dos peptídeos helicoidais, na extremidade N-terminal, a glicina na posição 1 é altamente conservada, o que permite o bloqueio da clivagem proteolítica por aminopeptidases (Jiang et al., 2008). Igualmente, a amidação é uma modificação pós-traducional conservada em peptídeos como cecropinas, dermaseptinas e polifemusinas, a qual impede a ação das carboxipeptidases e proporciona uma ligação de hidrogénio adicional que pode contribuir para a formação da hélice (Andreu & Rivas, 1998b).

Mesmo que os peptídeos antimicrobianos diverjam muito em sequência e fonte, a conformação helicoidal é predominante (Nguyen, Haney, & Vogel). A estrutura α -hélice encontra-se nos fluidos extracelulares de insetos e rãs, já que,

muitos destes peptídeos só se tornam helicoidais mediante interações com membranas anfipáticas, favorecendo a atividade antimicrobiana seletiva (Yeaman & Yount, 2003).

As estruturas secundárias frequentemente estudadas são as α -hélice e folha- β . Existe uma estreita relação entre o momento de formação da estrutura secundária do peptídeo e o grau de partição na membrana plasmática (Wieprecht, Apostolov, Beyermann, & Seelig, 1999). Oren et al. desenharam análogos da melitina que mantiveram a atividade antimicrobiana e perderam o efeito hemolítico quando a conformação helicoidal foi modificada (Oren & Shai, 1997).

A conformação anfipática, outro padrão conservado nos AMPs, define-se pela disposição polarizada dos aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos ao longo da hélice. Esta conformação é primordial para AMPs com domínio catiônico polar, já que permite a interação inicial com a superfície da membrana, enquanto que a face hidrofóbica interage mediante as forças de Van der Waals possibilitando a inserção do peptídeo no centro da membrana (Abrunhosa et al., 2005).

Adicionalmente a maioria dos AMPs apresenta um domínio catiônico com carga líquida de +2 a +9, característica importante para a atração eletrostática inicial entre o peptídeo antimicrobiano e as membranas de micro-organismos carregados negativamente. Este potencial eletrostático também tem um papel essencial na formação de poros na superfície bacteriana já que permite a agregação peptídica na face externa da membrana microbiana (Nguyen et al.; Sa'adedin & P Bradshaw; Yeaman & Yount, 2003).

Nas membranas citoplasmáticas bacterianas, os peptidoglicanos conferem uma carga altamente negativa. Estudos com análogos, nos quais se manteve a hidrofobicidade e o grau de anfipaticidade, mostraram que uma diminuição da carga (variando de 6 a 1) reduz a atividade antimicrobiana e que os aumentos na carga contribuem com o aumento da atividade hemolítica (Teixeira et al., 2012).

Existem peptídeos aniônicos como a maximina H5, que têm um amplo espectro de ação antimicrobiana. Esta classe de peptídeos podem apresentar

estruturas secundárias cíclicas, como nos vegetais, e formar pontes salinas com íons catiônicos extracelulares, aumentando a interação com membranas plasmáticas. As funções celulares ainda não foram descritas, mas acredita-se que tem um papel crucial na indução da resposta imune contra microrganismos (Harris, Dennison, & Phoenix, 2009).

A hidrofobicidade é definida como a percentagem de resíduos hidrofóbicos presentes na sequência peptídica e é um parâmetro importante na atividade biológica do peptídeo, já que determina a capacidade de se inserir na membrana (Tossi, Sandri, & Giangaspero, 2000).

Aumentos de hidrofobicidade dos peptídeos anfipáticos helicoidais parecem ter um impacto sobre a toxicidade da célula hospedeira e hemólise, junto a uma redução da atividade antimicrobiana (Shin et al., 2001), o que poderia relacionar-se com o aumento de dimerização das cadeias peptídicas antes da interação com a membrana (Y. Chen et al., 2007). Como foi observado por Giangaspero *et al.* a ausência de resíduos alifáticos, responsáveis pela diminuição da hidrofobicidade média do peptídeo P19 (5/L), inibiu a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativo e Gram-positivo (Giangaspero, Sandri, & Tossi, 2001).

Estudos sugerem que a atividade biológica ótima pode ser conseguida por AMPs moderadamente hidrofóbicos. Do ponto de vista termodinâmico, as sequências altamente hidrofóbicas em um ambiente aquoso formam agregados que não interagem com a membrana (Brown & Hancock, 2006), é por isto níveis crescentes de hidrofobicidade estão correlacionados com mecanismos de resistência e perda da especificidade antimicrobiana (Yeaman & Yount, 2003).

Outra importante relação foi estabelecida entre hidrofobicidade e carga. Em derivados de magainina o aumento da carga levou a um aumento do efeito hemolítico, mas quando a hidrofobicidade foi reduzida a atividade hemolítica diminuiu consideravelmente (Dathe & Wieprecht, 1999).

1.1.3. Mecanismos de ação dos AMPs

Para elucidar como ocorre a inserção dos peptídeos na membrana bacteriana têm sido propostos vários modelos, que em sua maioria propõe a permeabilização de bicamada lipídica; eles explicam como ocorre a inserção dos peptídeos na membrana bacteriana por meio da formação de poros, resultando na lises do patógeno. Existe um consenso em um grupo de mecanismo de ação que foca na desestabilização estrutural dos lipídeos, os quais podem ser classificados em: mecanismo de agregação, mecanismo de formação de poro toroidal, mecanismo de barril e mecanismo carpet-like (Teixeira et al., 2012).

1.1.3.1. Mecanismo por agregação

Existem peptídeos, como as Gramicidinas S, que podem causar a despolarização da membrana plasmática sem a formação de poros (figura 1A). Depois que os peptídeos ligam-se a os fosfolípidos, eles podem inserir-se na membrana e aglomerar-se de forma não estruturada, desestabilizando o centro hidrofóbico da bicamada lipídica. Estes agregados podem associar-se às moléculas de água, conduzindo ao vazamento de íons e moléculas (Bechinger & Lohner, 2006). Este modelo se diferencia essencialmente por ser um evento de curta duração, que permite aos peptídeos atravessarem transitoriamente a membrana sem causar uma despolarização. Uma vez dentro, os peptídeos podem interagir com seus alvos intracelulares como os ácidos nucleicos (DNA ou RNA) (Shai, 2002).

1.1.3.2. Mecanismo de formação de poro toroidal

De acordo com este modelo, os peptídeos se organizam perpendicularmente à membrana e permanecem fortemente ligados aos grupos polares lipídicos, dando um formato circular ao poro (figura 1B). O resultado é um poro aquoso através do qual podem fluir íons e outras moléculas ao interior celular, e finalmente, originar uma alteração osmótica no patógeno por esvaziamento do conteúdo citoplasmático (Epsand & Vogel, 1999). Yeaman *et al.* sugerem que alguns peptídeos podem atravessar a membrana e atuar em alvos intracelulares (Yeaman & Yount, 2003). Simulações de dinâmica molecular também têm demonstrado que a agregação de peptídeos parece ser um pré-requisito para a formação de poros, embora uma estrutura secundária específica não seja necessária. Este tipo de mecanismo é induzido por algumas magaininas, protegrinas e melitina (Teixeira et al., 2012).

1.1.3.3. Mecanismo de barril

Neste modelo, as moléculas peptídicas se aglomeram no lúmen central da membrana formando um barril. Este tipo de poro transmembranar é constituído por peptídeos muito hidrofóbicos, tais como alameticina e zervamicina (Huang, 2006). Os domínios hidrofóbicos interagem com a matriz interna da membrana, em quanto que o domínio hidrofílico forma o revestimento interior do poro (Teixeira et al., 2012).

No processo inicial da formação do poro tipo barril ocorre a ligação dos monômeros. A seguir, os peptídeos sofrem uma mudança na conformação, desestabilizando os grupos polares dos fosfolipídios, induzindo a dissolução da membrana (Teixeira et al., 2012).

o recrutamento progressivo de monômeros resulta na expansão do poro, o que lhes permitem ser transportados para a fase interna da membrana devido ao gradiente de concentração; ao mesmo tempo, a tensão exercida, localmente,

pelos peptídeos gera um desbalanceamento eletroquímico na membrana (figura 1C) (Erand & Vogel, 1999).

1.1.3.4. Mecanismo Carpet-like

No mecanismo *carpet-like* existe uma interação eletrostática entre a face positiva do peptídeo e os grupos aniônicos dos fosfolipídios que desestabiliza a superfície da membrana (figura 1D). Este modelo explica a atividade antimicrobiana das dermaseptinas e de algumas magaininas (Teixeira et al., 2012). Quando se atinge a concentração crítica, as cadeias peptídicas podem formar furos na membrana, causando a desintegração por ruptura da curvatura. Neste mecanismo, os peptídeos não precisam se inserir no centro hidrofóbico da membrana, já que a ruptura ocorre pela formação de micelas (Erand & Vogel, 1999; Teixeira et al., 2012).

Uma vez no citoplasma, os peptídeos desenvolvem vários mecanismos para causar a morte do patógeno. Eles podem alterar a integridade de membrana no microrganismo, inibir a síntese proteica, promover perda de ATP ou gerar estresse oxidativo celular (Brogden, 2005). Portanto, o mecanismo de ação dos AMPs vai depender de distintos fatores como a fase de crescimento do animal, a carga bacteriana adquirida ou tipo da resposta imune (Yeaman & Yount, 2003).

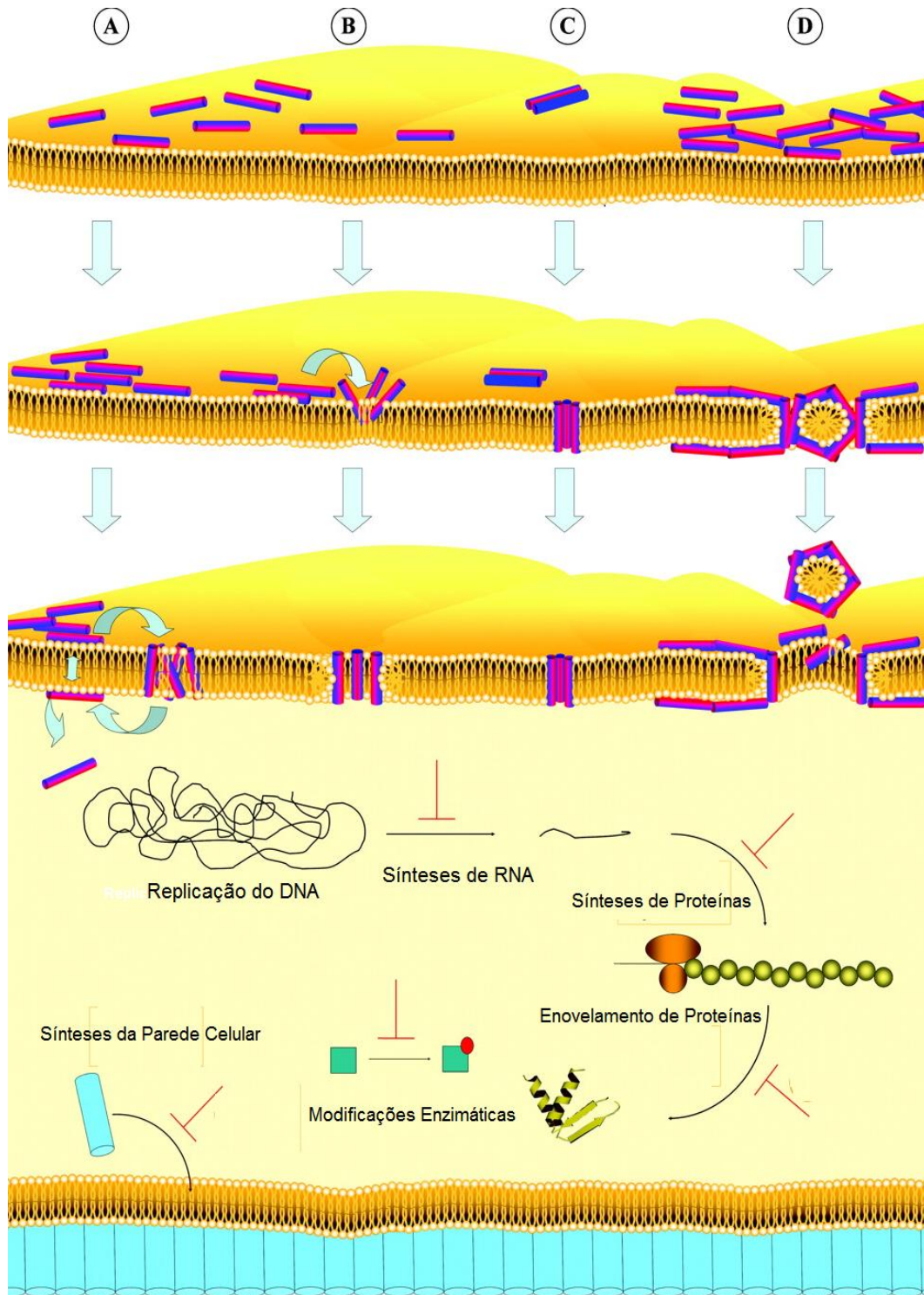


Figura 1. Modelos de ação dos peptídeos antimicrobianos. **A.** Mecanismo por agregação; **B.** Mecanismo de poro toroidal; **C.** Mecanismo de barril; **D.** Mecanismo *Carpet-like*. No interior da célula, marcadas com as linhas vermelhas, estão representadas as possíveis vias da ação dos AMPs (Jenssen et al., 2006).

1.2. Potencial farmacológico dos AMPs

Diferentemente de muitos antibióticos convencionais, os AMPs apresentam maior seletividade por células patogênicas, já que conseguem atuar sobre distintos alvos celulares. Além da afinidade pelas membranas dos microrganismos, existem peptídeos que podem inibir a síntese de proteínas, como no caso da buforina II (C. B. Park, Kim, & Kim, 1998) ou atuar sobre a parede celular como foi observado nas defensinas (Schneider et al., 2010).

Neste contexto, já foram reportados mais de 1900 peptídeos isolados das secreções cutâneas de 178 espécies de anfíbios, que podem ser classificados em 100 famílias de AMPs; o qual representa um promissor cenário na procura de novos tratamentos contra doenças infecciosas (Xu & Lai, 2015).

Como resultado desta diversidade, existem AMPs com diferentes atividades biológicas além da antibacteriana. Tem-se reportado peptídeos com atividade antiprotozoária, antifúngica, imunomoduladora, entre outras.

1.2.1. Atividade antibacteriana dos AMPs

Existem AMPs com ampla faixa de atividade antibacteriana ou com MIC (concentração mínima inibitória) tão baixas quanto as de compostos atualmente utilizados. A pexiganana é um análogo sintético de magainina II, que tem atividade contra a maioria dos isolados bacterianos clínicos cultivados, os quais foram isolados a partir de úlceras de pés de pessoas diabéticas infectadas por *Pseudomonas spp.* (Ge et al., 1999). Os cecropinas D2A21 e D4E1 são potenciais agentes microbicidas tópicos atualmente em ensaios clínicos (Ballweber, Jaynes, Stamm, & Lampe, 2002). A esculentina-1, isolados principalmente de anuros do gênero *Rana*, apresenta uma atividade potente e rápida contra *Pseudomonas spp.* (Luca, Stringaro, Colone, Pini, & Mangoni, 2013)

A dermaseptina S4 tem um valor de MIC de 1 μ M contra *S. aureus* (Navon-Venezia, Feder, Gaidukov, Carmeli, & Mor, 2002), mas um dos maiores desafios é a diminuição da atividade hemolítica. A gramicidina S é utilizada atualmente no tratamento tópico das infecções causadas por *P. aeruginosa* (Marr, Gooderham, & Hancock, 2006).

1.2.2. Atividade antiparasitária dos AMPs

Atividade antiparasitária tem sido descrita para peptídeos antimicrobianos como as temporinas A e as mangaininas, isolados da secreção cutânea de anuros, que apresentam a capacidade de perturbar a homeostase dos protozoários por ruptura das membranas celulares, mas também mediante a interferência com processos do metabolismo do parasita. Os AMPs apresentam uma relativa especificidade por protozoários, devido à carga aniônica no exterior da membrana característica de organismos eucariontes inferiores (Rinaldi, 2002).

Esta classe de AMPs adota uma estrutura helicoidal anfipática em meios hidrofóbicos podendo permeabilizar a membrana do hospedeiro (Friedrich, Scott, Karunaratne, Yan, & Hancock, 1999), mas é a carga catiônica do peptídeo que determina a interação com os fosfolípidos presentes na membrana do parasita. Por exemplo, a estrutura anfipática das temporinas permite-lhes atravessar a bicamada lipídica e agir no citoplasma do protozoário, no entanto, no caso da mangainina existe uma forte interação eletrostática com os fosfolípidos, que finalmente gera a lesão da membrana do patógeno (Rivas et al., 2009). Nas mangaininas os resíduos hidrofóbicos estão organizados em um trecho específico da sequência e promovem a agregação peptídica que causa a permeabilização local da membrana (Rivas et al., 2009). Da mesma forma, a atividade antiparasitária pode estar relacionada com o estágio do parasita. Na espécie *Leishmania spp*, a forma amastigota é mais resistente do que a forma extracelular (Rivas et al., 2009).

Finalmente, existem outros mecanismos de ação antiparasitária que ocorrem no citoplasma do parasita, peptídeos como as Dermaseptin-S1 e H-3 podem ativar as vias de morte celular e gerar um desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (Rivas et al., 2009).

1.2.3. Atividade antifúngica dos AMPs

Os peptídeos antifúngicos agem principalmente na parede celular ou componentes intracelulares (Narayana & Chen, 2015). A parede celular dos fungos é composta de vários componentes, dos quais a quitina é a mais abundante. Os AMPs são capazes de se ligar à quitina (Narayana & Chen, 2015), como a defensina 1 murina (mBD1), que tem uma potente ação contra infecção em casos de candidíase murina (Shen & Wu, 2014). A histatina 5 mostra uma potente atividade contra várias estirpes de fungos, incluindo *Candida albicans* (Helmerhorst et al., 1999).

As equinocandinas são a última classe de agentes antifúngicos a serem aprovados para tratamento de infecção fúngica invasiva. Estes peptídeos têm sido relatados para inibir a síntese de (1, 3) -D-glucano em paredes de células fúngicas (Denning, 2003). Uma equinocandina, denominada Caspofungina, foi aprovada pela FDA em 2001 (Saravolatz, Deresinski, & Stevens, 2003). A iturina A é um peptídeo isolado da bactéria *Bacillus subtilis* que inibe o crescimento de *A. flavus* e *F. moniliforme* (Klich, Lax, & Bland, 1991). Ensaios clínicos preliminares, envolvendo seres humanos e animais mostraram que a iturina A é eficaz contra as dermatomicoses, com um amplo espectro de propriedades antifúngicas e efeitos alergênicos baixos, embora apresente efeitos hemolíticos (Latoud, Peypoux, Michel, Genet, & Morgat, 1986).

1.2.4. Atividade imunomoduladora dos AMPs

Na imunidade, os AMPs não só têm efeito direto sobre as membranas bacterianas, como também podem ser capazes de modular outros componentes da resposta imune inata. A modulação da imunidade inata tem algumas das características básicas de uma terapia antimicrobiana ideal, na medida em que está agindo rapidamente (em horas) e envolve vários mecanismos efetores tornando improvável o desenvolvimento da resistência desses compostos. Os peptídeos de defesa do hospedeiro mostraram ter uma ampla gama de propriedades imunomoduladoras, incluindo a modulação da expressão de genes em monócitos, células epiteliais, quimioatração direta de células imunitárias, indução de quimocinas, indução na respostas de diferenciação, respostas de cicatrização de feridas e ampliação da resposta contra infecções. Algumas destas propriedades seriam consideradas pró-inflamatórias, mas nestes peptídeos igualmente foi observado a capacidade suprimir a respostas de sinalização via TLR (Hancock & Sahl, 2006).

Um exemplo amplamente estudado, são as defensinas, um grupo de peptídeos imunomoduladores secretados por células fagocíticas e linfócitos, esses peptídeos modulam diretamente a produção de citocinas como TNF e IL-1, promovendo a migração e recrutamento de fagócitos em caso de infecção (Ganz, 2003; Schneider et al., 2010). Scott et al. demonstraram que IDR-1, um peptídeo sintético, que *in vitro* não apresentou atividade antimicrobiana, é um protetor *in vivo* de infecção bacteriana em modelos animais, mediante a estimulação na produção de quimocinas, enquanto suprime os níveis de moléculas pró-inflamatórias (Scott et al., 2007).

1.3. O processamento enzimático de AMPs e a atividade proteolítica da secreção cutânea de anuros

A síntese de peptídeos pela via ribossômica é um mecanismo altamente conservado nos vertebrados, já é bem conhecido que na pele de humanos e anfíbios a modulação da transcrição ocorre pela via TLR e pelo fator nuclear kappa B. Geralmente, os AMPs são produzidos como pro-peptídeos, que em alguns casos precisam mais de uma clivagem proteolítica para sua ativação (Hancock & Sahl, 2006). Este processamento proteolítico é específico para cada peptídeo e é amplamente descrito para AMPs de mamíferos como as catelecinas humanas, que são processadas pela protease 3 nos neutrófilos ou em caso de resposta imune imediata podem ser ativadas pelo citocromo P450 (Lai & Gallo, 2009).

Em anfíbios a produção e processamento de AMPs epiteliais é comumente nas glândulas granulares (Simmaco, Mignogna, & Barra, 1998). No entanto, as enzimas envolvidas no processamento dos peptídeos em anuros não são ainda conhecidas.

Como caractere filogenético conservado, se associa a ativação destes peptídeos biotivos com serino-proteases como as convertases, que foram identificadas nas secreções cutânea de alguns anfíbios (Braks, Guldemond, van Riel, Coenen, & Martens, 1992; Vieau, Gangnon, Jégou, Danger, & Vaudry, 1998). Em anuros, identificou-se várias convertases pró-hormônios associadas principalmente no processamento de neuropeptídios (Vieau et al., 1998). Em *Leptodactylus labyrinthicus* mediante zimografia revelou a presença de três bandas com atividade gelatinase de aproximadamente 60 kDa, 66 kDa e 80 kDa que foram caracterizadas como metalopeptidases (da Silva Libério et al., 2014a).

1.4. Estudos proteômicos do tipo *shotgun* das secreções cutâneas de anuros

São poucos os estudos proteômicos abrangentes de alta acurácia de secreções cutâneas de anuros. Em *Rana dybowskii* foram coletadas secreções de pele não infectadas e infectadas por *E. coli* e *S. aureus*, e foi comparada a expressão de proteína por eletroforese bidimensional. As proteínas que demonstraram expressão diferencial foram analisadas por espectrometria de massa. As proteínas anexina A1, superóxido dismutase A, histona H4, pro-hormônio convertase 1, carbonil reductase 1 foram identificadas e associadas à resposta de defesa contra infecção bacteriana (Xiao et al., 2014).

Na análise proteômica de secreções da pele de *Bufo asper*, utilizando SDS-PAGE seguido de LC-MS / MS, foi possível identificar 50 proteínas com um peso molecular entre 20 e 250 kDa, como actina, histona H4 e proteínas de choque térmico (HSP90, HSP70 e HSC70) (Dahham, Hew, Jaafar, & Gam, 2016).

Em *Lithobates spectabilis* as secreções cutâneas foram fracionadas por RP-HPLC e, posteriormente, analisada por espectrometria de massas de alta resolução usando dois protocolos diferentes: (1) utilizando coquetel de inibidores enzimáticos e 2) sem inibidores de protease. Os resultados do procedimento 1 revelaram 122 massas moleculares, enquanto o procedimento 2 permitiu a identificação de 253 massas moleculares diferentes. Quinze proteínas, entre elas três peptidases foram identificadas usando eletroforese em gel de poliacrilamida e LC-MS/MS para sequenciamento "*de novo*" (Demesa-Balderrama et al., 2016).

Utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida e espectrometria de massas em tandem, na secreção parotóide da *Rhinella schneideri* foram identificadas 104 proteínas, incluindo actina, beta-actina, proteínas ribossômicas, catalase, galectina e proteínas não caracterizadas (Sousa-Filho et al., 2016).

1.4. *Dendropsophus columbianus* (Boettger, 1892)

Hylidae é uma ampla família de rãs arborícolas com mais de 870 espécies conhecidas. A maior subfamília é a Hylinae com 41 gêneros descritos, que estão distribuídos na Europa, África e principalmente na América (Faivovich et al., 2009). O gênero *Dendropsophus* é endêmico da América e ainda pouco estudado. *D. columbianus* é uma espécie colombiana, distribuída nos departamentos de Cauca, Risaralda, Caldas e Valle del Cauca (figura 2) (Bolívar-G, Giraldo, & Mendez, 2011).



Figura 2. Macho adulto de *Dendropsophus columbianus* (foto, cortesia de: Gustavo Pisso).

D. columbianus são rãs pequenas, com 25 a 36 mm de comprimento e, comumente, as fêmeas são as de maior porte. As zonas úmidas são os habitats prediletas, já que a reprodução ocorre em corpos de água permanente. Entretanto, por sua grande capacidade de adaptação, esta espécie pode ser encontrada em áreas com uma forte influência urbana e em ecossistemas entre 650-2200 metros acima do nível do mar. A região dorsal é de cor amarelo com suaves linhas no tom café, sendo a parte ventral mais clara em machos (Rivera-Correa & Gutiérrez-Cárdenas, 2012). Até a momento, os estudos têm sido focados em questões ecológicas, taxonômicas e, recentemente, na capacidade de adaptação à zonas antrópicas, o que poderia estar relacionado com os componentes de defesa do

sistema imune do animal até o momento desconhecido (Méndez-Narváez & Bolívar-G, 2016).

2. Justificativa

A pele dos anfíbios constitui uma ampla fonte de compostos bioativos. Nesta perspectiva, os AMPs surgem atualmente como uma alternativa na busca por novos fármacos em resposta à resistência aos antibióticos e antiparasitários convencionais. Até à data, mais de 100 famílias de AMPs foram descritas, as quais compreendem numerosas moléculas antimicrobianas altamente seletivas (Konig & Bininda-Emonds, 2011). Além dos peptídeos, a secreção cutânea de anuros apresenta uma extraordinária gama de moléculas de origem proteica com tamanho, carga e hidrofobicidade específicas para cada espécie (Konig et al., 2015).

Neste contexto, o conhecimento do sistema da secreção das proteínas e peptídeos encontrados na secreção cutânea da espécie *Dendropsophus columbianus* (Boettger 1892), junto ao entendimento do sistema de resposta do animal contra microrganismos, apresenta relevância científica na busca por novos agentes terapêuticos, bem como no estudo da biologia dessa espécie até agora não estudada.

3. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar peptídeos e proteínas presentes na secreção cutânea do anfíbio *Dendropsophus columbianus* (Boettger 1892).

Para alcançar este objetivo, foram realizadas as seguintes etapas:

- Isolamento e purificação de peptídeos com atividade bactericida presentes na secreção cutânea de *D. columbianus*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Determinação das atividades antifúngica, antiplasmodial, tripanicida e anti-giardial do peptídeo purificado e de dois de seus análogos;
- Avaliação dos efeitos citotóxicos e citolíticos sobre células de mamíferos do peptídeo purificado e de dois de seus análogos;
- Identificação dos compostos peptídicos e proteicos presentes na secreção de *D. columbianus* mediante estratégia proteômica do tipo *shotgun* (nanoLC-MS / MS), correlacionando os compostos identificados com os mecanismos de defesa contra patógenos.

4. Materiais e Métodos

Com o intuito de realizar o primeiro estudo bioquímico avaliando a composição peptídica e proteica da secreção cutânea de *D. columbianus*, com foco na identificação de novos AMPs e proteínas relacionadas ao mecanismos de defesa contra patógenos, duas estratégias foram empregadas.

A primeira estratégia, etapa I no fluxograma da figura 3, envolveu o uso de uma abordagem clássica de identificação, purificação e caracterização de novos AMPs. A secreção cutânea bruta foi fracionada por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa e a única fração cromatográfica que apresentou atividade antibacteriana foi isolada e caracterizada química e biologicamente. O peptídeo selvagem (Dc 1) e dois análogos (que foram idealizados com o fim de otimizar a atividade contra microrganismos) foram sintetizados quimicamente e avaliados quanto às suas propriedades antimicrobianas e antiparasitárias, bem como submetidos a estudos conformacionais empregando-se a técnica de dicrosímio circular.

A segunda estratégia, etapa II no fluxograma da figura 3, foi a análise proteômica e peptidômica do tipo *shotgun* em sistema nanoLC-MS/MS, com o objetivo de identificar as proteínas e peptídeos presentes nessa secreção e buscando correlacionar tais moléculas com mecanismos de defesa contra microrganismos.

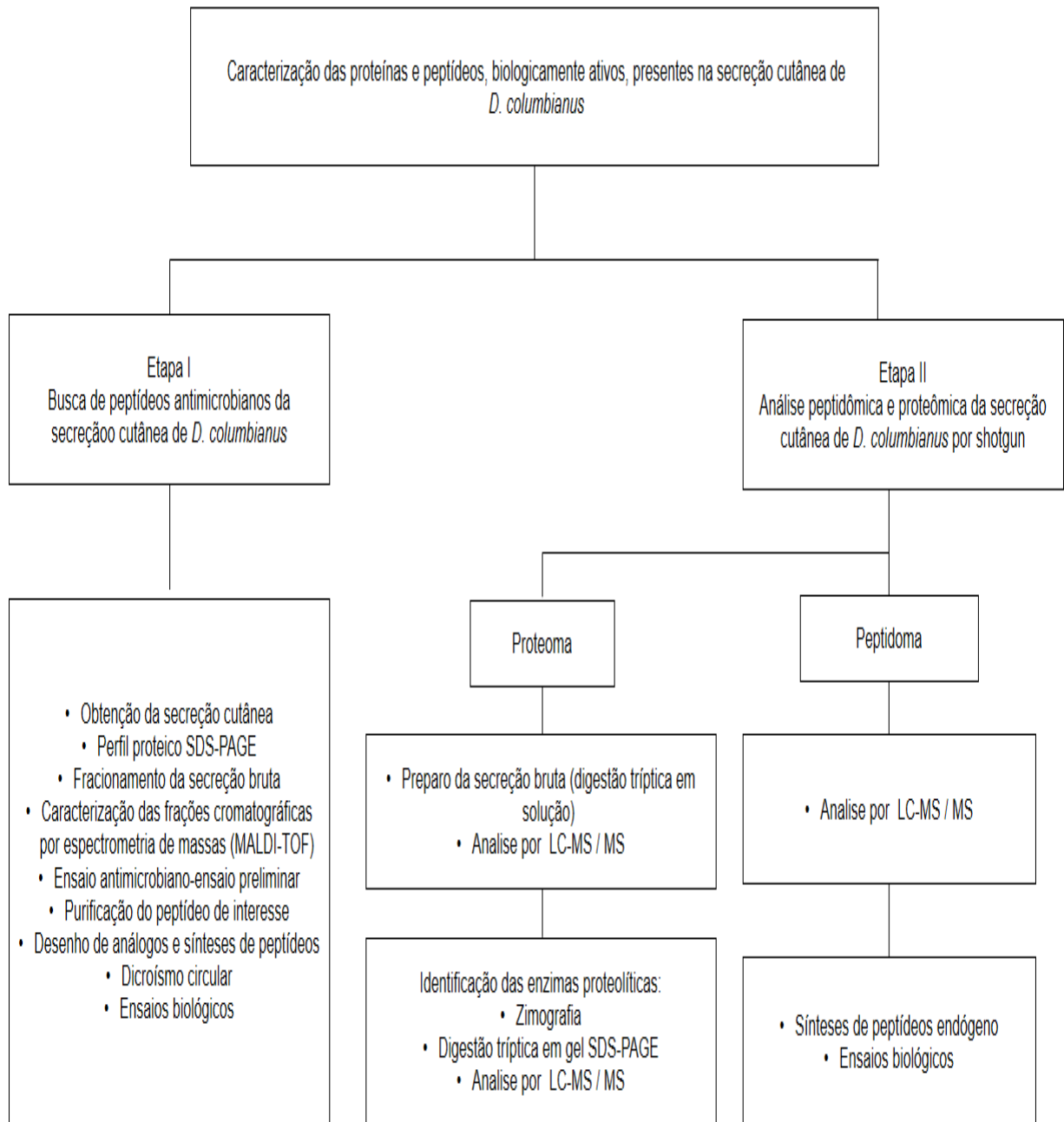


Figura 3. Fluxograma da metodologia usada na caracterização das proteínas e peptídeos, biologicamente ativos, presentes na secreção cutânea de *D. columbianus*.

4.1. Etapa I, busca de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de *D. columbianus*

4.1.1. Obtenção da secreção cutânea

Machos de *D. columbianus* foram coletados em dezembro de 2012 na cidade Popayán-Cauca, Colômbia. A secreção cutânea foi obtida mediante estimulação elétrica, usando uma corrente alternada de 120 mV. Os indivíduos adultos estimulados foram lavados com água esterilizada, e a secreção cutânea coletada em tubos Falcon de 15 mL. Seguidamente a amostra foi congelada e liofilizada. As alíquotas foram armazenadas à -20 °C. A quantificação da amostra liofilizada foi realizada usando o kit Quant Plus One 2D (GE Healthcare, Uppsala, Escócia), seguindo as instruções do fabricante.

4.1.2. Perfil proteico: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970; Shi & Jackowski, 1998), utilizando mini-gels 10cm x 8cm x 1mm em um sistema de cuba miniVe. Foi usado o marcador de peso molecular da Amersham Pharmacia-Biotech (fosforilase b (94 kDa), albumina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), e lactalbumina (14,4 kDa)) e o tampão Tris-HCl 0,55 mol/L - Glicina 1,92 mol/L pH 8,3, sob corrente constante de 25 mA por 60 min. Após a eletroforese, o gel foi corado com azul de Coomassie (Phastgel Blue R-350) por 6 horas e descorado na solução metanol/ácido acético/água (50:10:40, v/v/v).

4.1.3. Fracionamento da secreção bruta

Cada alíquota de 1 mg de secreção liofilizada foi dissolvida em 200 µL de 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) em água Milli-Q (solvente A) e

centrifugada durante 15 minutos a 15.000 g. O sobrenadante foi injetado em uma coluna analítica de fase reversa C18 (Phenomenex 00G4252E0, 4,6 × 250 mm), previamente equilibrada com o solvente A. A eluição foi feita usando um gradiente linear de 0-50% de 0,1% (v/v) de TFA em acetonitrila (solvente B), durante um tempo total de corrida de 70 min. O fluxo utilizado foi 1 mL / min e a absorbância monitorada a 216 nm. Todas as frações foram coletadas individualmente em tubos Eppendorf, secadas a vácuo e armazenadas a -20 °C (Libério et al., 2011).

4.1.4. Caracterização das frações cromatográficas por espectrometria de massas (MS)

A determinação das massas moleculares das frações cromatográficas e re-cromatográficas obtidas da secreção total de *D. columbianus* foi feita usando o espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (Autoflex II; Bruker Daltonics, Leipzig, Alemanha) em modo linear ou refletor positivo. Um µL de cada fração foi dissolvido em 0,12% (v/v) de TFA/água e misturado com 1 µL da matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 20 µg/µL) ou ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico (ácido sinapínico - SA 20 µg/µL) ressuspendidas em 50% (v/v) acetonitrila/0,1% (v/v) TFA, na proporção 3:1 (matriz: amostra). A solução PeptideMix (*Bruker Daltonics*) foi utilizada para a calibração externa em matriz HCCA, em uma faixa m/z analisada de 500 a 4000 Da. Cada amostra foi aplicada sobre uma placa AnchorChip tipo (600 mm) para MALDI / TOF e cristalizada à temperatura ambiente. Os espectros foram obtidos usando o programa FlexControl 3.0 e analisados com o programa FlexAnalysis 3.0 (Libério et al., 2011).

4.1.5. Screening antimicrobiano

Inicialmente, foi feito um *screening* da atividade antimicrobiana das 93 frações cromatográficas obtidas de uma corrida da RP-HPLC. As linhagens bacterianas utilizadas foram *Escherichia coli* (ATCC 25322) e *Staphylococcus*

aureus (ATCC 25923). As bactérias foram cultivadas em 5 mL de meio *Mueller-Hinton* sob agitação a 37 °C até a densidade óptica igual a 1 a 595 nm. As culturas de bactérias, em fase logarítmica de crescimento, foram diluídas, utilizando o mesmo meio de cultura nas proporções 1:50 para as Gram-negativas e 1:100 para as Gram-positivas.

Em placas de 96 poços, foram cultivados 50 µL de cada cultura bacteriana junto com 50 µL de amostra ressuspendida em água Milli-Q estéril (incubada por 22 h a 37°C). A inibição do crescimento foi determinada pela leitura da densidade óptica a 595 nm em uma leitora de placas Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). Formaldeído 0,4% (v/v) e água Milli-Q estéril foram usados como controle positivo e negativo, respectivamente (Castro et al., 2009).

4.1.6. Purificação do peptídeo de interesse

A fração com atividade antibacteriana foi purificada por RP-HPLC em uma coluna C18 (Phenomenex 00G4252E0, 4.6 × 250 mm), usando um gradiente linear de 45-50 % de solvente B, durante um tempo total de corrida de 45 min. O gradiente foi programado da seguinte maneira: 0-40% de B em 10 min, 45-50% de B em 25 min, 50-100% de B em 5 min, 100-0% B em 5 min, em um fluxo de 1 mL/min. A absorbância foi monitorada a 216 nm e as frações foram manualmente coletadas, secadas a vácuo e armazenadas a -20°C (Libério et al., 2011).

4.1.7. Determinação da estrutura primária de peptídeo

A estrutura primária do peptídeo nativo foi determinada por degradação de Edman em sequenciador automático de proteínas e peptídeos modelo PPSQ-31^a (Shimadzu Co, Japan) seguindo as instruções do fabricante.

4.1.8. Desenho racional de análogos e síntese de peptídeos

Baseado na estrutura primária do peptídeo nativo (NLLNDALGTVNGLLGRS) foram desenhados, manualmente, dois peptídeos análogos (NLLNKALGTVNGLLGRS e NLLKSALKTVNKLLAAS-CONH₂). Esses peptídeos foram sintetizados usando o método de sínteses em fase sólida por GenOne Biotechnologies Ltd. (Rio de Janeiro, Brasil). A pureza maior a 98% foi confirmada por RP-HPLC e MALDI-TOF.

4.1.9. Dicroísmo circular

O ensaio de dicroísmo circular (CD) foi realizado usando um espectrômetro Jasco J-815, equipado com um suporte térmico de cuveta tipo Piltier (Jasco, Japão). Os peptídeos (0.2 mg/mL) foram analisados em água e 10, 30 e 50% (v/v) de trifluoretanol (TFE) a 25°C. Cinco medidas consecutivas foram realizadas e o espectro final foi a média das medidas com a correção da linha base do TEF.

A estabilidade térmica dos peptídeos foi analisada em TFE 30% (v/v) com uma flutuação de temperatura de 25 a 95 °C. A renaturação dos peptídeos foi monitorada às temperaturas 95, 75, 55 e 25 °C. A elipticidade observada foi transformada em valores de elipticidade molar ($[\theta]$) baseada na massa molecular por resíduo de 115 Da e a detecção feita a 208 nm. A α -helicidade foi estimada considerando os valores de $[\theta]$ 208nm a diferentes temperaturas usando a equação (Greenfield & Fasman, 1969):

$$f_H = \frac{([\theta]_{208} - 4000)}{(33000 - 4000)}$$

As projeções em hélice foram feitas usando o software desenvolvido por nosso grupo, NetWheels (<http://lbqp.unb.br/NetWheels>). Apresentam cada resíduo da espiral com um ângulo de 100° por cada três resíduos.

4.2. Ensaio biológicos

4.2.1. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica

Os ensaios antibacterianos e antifúngicos foram realizados conforme descrito em (Castro et al., 2009). As bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25322, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603) foram cultivadas em meio de cultura Mueller-Hinton (MH) e os fungos (*Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019) foram cultivados em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) durante 24 h a 37 °C sob agitação. Quando a OD (densidade óptica) foi atingida (leitura a 590 nm = 1.0), as suspensões bacterianas e fúngicas foram diluídas utilizando meio de cultura. Para as bactérias Gram-negativas foi realizada uma diluição na proporção de 1:50 e para as bactérias Gram-positiva e fungos na proporção de 1:100. As concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos peptídeos sintéticos foram determinadas pelo método de microdiluição padrão. Após incubação durante 20-24 h a 37 °C, as placas de 96 poços foram analisadas a 595 nm em uma leitora de placas Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). Cada ensaio foi realizado em triplicata. Como controle foram usados água Milli-Q e 0,4% (v / v) de formaldeído. O MIC foi definido como a concentração mais baixa do peptídeo ou outro agente antimicrobiano na qual não ocorre crescimento detectável após incubação a 37 °C durante 20-24 h.

4.2.2. Determinação da atividade antiparasitária

Os ensaios antiparasitários foram realizados no laboratório de *Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes (MCAM)* do *Muséum National d'Histoire Naturelle*, em Paris, França, durante estágio doutoral de 3 meses que realizei sob a supervisão do Prof. Philippe Grellier.

Inicialmente, os peptídeos foram testados contra parasitas em cultura *in vitro*, usando três concentrações fixas: 50, 10 e 1 µg/mL, com o objetivo de estimar a porcentagem de inibição. Unicamente os peptídeos que mostraram atividade inibidora sobre o crescimento do parasita $\geq 60\%$, na concentração de 10 µg/mL, foram testados para se determinar a concentração que inibia 50% do crescimento do parasita (IC₅₀).

Usando placas de 96 poços, a dose letal 50 (IC₅₀) foi determinada a partir de diluições seriadas feitas a partir de uma concentração inicial de 10 µg/mL no primeiro poço. Os ensaios foram feitos em triplicata, O valor de IC₅₀ é a média dos experimentos.

4.2.2.1. Ensaio *In vitro* contra *Plasmodium falciparum*

Os peptídeos foram testados contra a cepa de *P. falciparum* FcB1 (Colômbia) resistente à cloroquina na fase intra-eritrocitária. Os peptídeos foram preparados em DMSO a 10 mg/mL. Foi feita uma diluição seriada em meio RPMI suplementado com 8,5% de soro humano. Em placas de 96 poços, 100 µL de amostra foram adicionados a 100 µL de cultura do parasita assincronizada (1% de parasitemia e 2% de hematócrito final) e mantidas a 37 °C. Às 24 h, foi adicionado 0,5 µCi de hipoxantina tritiada (GE Healthcare, 1 to 5 Ci·mmol/mL) em 50 µL de RPMI a cada poço e incubados por mais 24 horas. Posteriormente, as placas foram congeladas por 18 horas. Após os parasitos descongelados, os lisados foram recolhidos em filtros de vidro e contados em um espectrômetro de cintilação líquida. A inibição do crescimento para cada concentração do peptídeo foi determinada por comparação da radioatividade incorporada na cultura tratada e na cultura controle. O experimento foi realizado em triplicata (Charneau et al., 2016). A solução estoque de cloroquina foi preparada em água purificada (grau MQ) a 10 mM e utilizada como fármacos controle.

4.2.2.2. *Ensaio In vitro contra Trypanosoma brucei brucei*

Os peptídeos foram preparados em DMSO a uma concentração 10 mg/mL e foram diluídos em meio de cultura HMI9 (suplementado com soro fetal bovino 10%). Em placas de 96 poços, 100 µL de amostra foram adicionados a 100 µL de cultura axênica do parasita (concentração de 2×10^4 parasitas/mL). As placas foram incubadas a 37 °C. Após 72 h, 25 µL de resazurina (45 µM concentração final) foram adicionados a cada poço. Após 4 horas de incubação, a fluorescência da resorufina foi medida a 528 nm de excitação e emissão a 590 nm. O experimento foi realizado em triplicata (Charneau et al., 2016).

4.2.2.3. *Ensaio in vitro contra Trypanosoma cruzi*

Os peptídeos foram testados contra a cepa Tulahuen (lacZ, clone 4) de *T. cruzi* (que expressa beta-galactosidase). Formas tripomastigotas foram obtidas a partir de cultura de células L6 infectadas. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Células L6 foram preparadas na concentração de 10^3 células / poço e incubadas durante 24h. Após tempo de incubação, foram removidos 100 µL de meio de cultura e adicionados 100 µL de suspensão de 1×10^5 tripomastigotas / mL e 100 µL de peptídeos diluídos. Depois de 5 dias, a proliferação de amastigotas intracelulares foi avaliada pela medição da atividade de β - galactosidase usando vermelho de clorofenol e D-galactopiranosídeo como substrato. A citotoxicidade sobre as células L6 foi avaliada visualmente estabelecendo uma pontuação de citotoxicidade: 0 (nenhuma toxicidade), 1 (50% das células vivas), 2 (10% das células vivas) e 3 (90-100% células mortas) (Charneau et al., 2016). A Solução estoque de nifurtimox foi preparada em DMSO a 10 mM e utilizada como fármacos controle.

4.2.2.4. Atividade *in vitro* contra *Giardia lamblia*

Cultura axênica de *G. lamblia*, cepa WB foi cultivada em meio de cultura TYI-S33 Keiser (KM), em atmosfera de oxigênio reduzida. Os ensaios foram realizados em tubos Eppendorf de 500 µL. A cada tubo foram adicionados 224 µL de suspensão de parasitas a uma concentração de $2 \cdot 10^5$ células/mL e 224 µL de peptídeo diluído em meio KM. Os tubos foram incubados a 37 ° C durante 72 h. Os parasitas foram fixados usando formaldeído a 37%. A atividade antiparasitária foi medida por contagem do número de parasitas, utilizando câmara de Malassez (Räz, Iten, Grether-Bühler, Kaminsky, & Brun, 1997).

4.3. Atividade hemolítica *in vitro*

Eritrócitos humanos foram separados do plasma por sedimentação e lavados três vezes com uma solução de Tris-HCL 0,01 M pH 7,4/ NaCl 0,15 M / CaCl₂0,01 M. As amostras foram solubilizadas na solução anteriormente descrita. Em tubos eppendorf de 1.5 mL, 100 µL de amostra e 100 µL de hemácias foram incubadas, à temperatura ambiente durante 60 min. Após do tempo de incubação, os tubos foram centrifugados a 729 g por 2 min. Uma alíquota de 100 µL de cada sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços. A leitura da absorbância foi realizada a 405 nm, usando uma leitora BioRad (Modelo 3550-UV, Hercules, CA, USA). Triton X-100 1% (v/v) e o tampão de amostra foram usados como controle positivo e negativo respectivamente.

4.4. Atividade citotóxica *in vitro*

Células L6 derivadas de mioblasto de rato foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 5% de soro fetal bovino e 100 µg/mL de gentamicina, a uma concentração de $2 \cdot 10^4$ células/poço em placas de 96 poços. Após 24 h,

foram removidos 100 μ L de meio de cultura e adicionados 100 μ L dos peptídeos diluídos em meio de cultura a distintas concentrações. As placas foram incubadas a 37 °C durante 72 h. Depois do tempo de incubação, foram adicionados 20 μ L de resazurina e as placas incubadas por mais de 4 h. A fluorescência foi medida pela formação de resorfurina a 528 nm de excitação, 590 nm de emissão, usando uma leitora BioRad 3550-UV (Ráz et al., 1997).

4.5. Etapa II, análise peptidômica e proteômica da secreção cutânea de *D. columbianus* por *shotgun*

4.5.1. Identificação de proteínas presentes na secreção cutânea de *D. columbianus*

4.5.1.1. Digestão tríptica em solução

Um mg de secreção bruta liofilizada foi dissolvida em 100 μ L de uma solução de ureia 8 M em TEAB 200 mM (triethylamônio bicarbonato). As proteínas em solução foram reduzidas adicionando 100 μ L de DTT 20mM (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente durante 60 min. Foram adicionados 100 μ L de iodoacetamida 20 mM (Sigma-Aldrich) e a solução mantida no escuro por 1 h a 37 °C. A amostra foi diluída em TEAB 20 mM para obter uma concentração final 1 M de ureia. A digestão foi realizada usando tripsina (Sigma) na proporção 1:100 tripsina:amostra (μ g/ μ g), por 18 horas a temperatura ambiente (León, Schwämmle, Jensen, & Sprenger, 2013).

A dessalinização da amostra foi feita em uma ponteira com resina C18 e os peptídeos foram eluídos em diferentes concentrações de acetonitrila. A acetonitrila foi evaporada em um sistema speed vac vácuo (Savant, Farmingdale, NY, EUA). Finalmente, os peptídeos trípticos resultantes foram ressuspensos em 15 μ L (por amostra) de ácido fórmico 0.1% (v/v) para posterior análise por LC-MS / MS (León et al., 2013).

4.5.1.2. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS / MS)

Quatro µg de peptídeos (quantificados pelo kit Qubit assay da invitrogen, seguindo as instruções do fabricante) foram reconstituídos em 5 µL de ácido fórmico 0,1% (v/v) para as análises por sistema LC-MS/MS com colunas capilares em Dionex Ultimante™ 3000 RSLCnano system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) diretamente acoplada ao espectrômetro de massas híbrido do tipo iontrap-orbitrap, Orbitrap Elite™ ETD (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Os peptídeos foram injetados em uma coluna analítica (75 µm x 35cm) preenchida com resina de fase reversa ResiproSil-Pur C18-AQ utilizando um fluxo de 230 nL/min. O gradiente de eluição linear da amostra usado foi de 15 a 45 % do solvente B (acetoneitrila 95% (v/v), AC. Fórmico 0,1% (v/v)) durante 160 minutos.

A voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 2,5 kV e 275 °C, respectivamente. O espectrômetro foi operado no modo positivo, data-dependent acquisition MS scan e a aquisição de espectros de massas em tandem (MS/MS) pelo software Xcalibur 2.2 SP 1.78 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Os espectros MS foram adquiridos em um intervalo de massa de 350 a 1500 m / z, com uma resolução de $r = 120000$. Foram selecionados os 20 íons mais intensos para a fragmentação por CID. Para a obtenção da sequência dos íons foi utilizado um tempo de exclusão dinâmica de 90 segundos.

4.5.1.3. Identificação de proteínas

A análise dos dados foi realizada usando o software PEAKS V6 (Ma et al., 2003). A identificação das proteínas foi feita por homologia dos peptídeos identificados, usando os bancos de dados para *Amphibia* da NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e Uniprot (www.uniprot.org). Os critérios de busca foram: 1) até duas perdas na clivagem da tripsina, 2) tolerância de até 10 ppm para o precursor e 0,5 Da de tolerância para os fragmentos e 3) oxidação, acetilação e

deamidação como modificações variáveis. Foi aceito para as identificações um *false-discovery rate* (FDR) de 1% e um mínimo de 2 peptídeos únicos identificados por proteína.

4.6. Identificação das enzimas proteolíticas

4.6.1. Zimografia

A zimografia foi realizada a partir da secreção cutânea total de *D. columbianus*. Foi utilizado o método descrito por Heussen and Dowdle (Heussen & Dowdle, 1980) com algumas modificações. Para este ensaio foram utilizados géis de SDS e poliacrilamida (10cm x 8 cm x 1mm) na concentração de 8%, SDS-PAGE, contendo gelatina (na concentração final 0,1%). A amostra foi dissolvida em DMSO 10% para aumentar a solubilidade e agitada em vortex até obter uma mistura homogênea e aplicada no gel sem prévio aquecimento. A eletroforese foi feita a 4 °C, voltagem de 250 V e corrente de 25 mA. Após a corrida, os géis foram lavados em solução de Tris-HCl 100 mM, pH 7,5 contendo 2,5% de Triton X-100 durante 2 horas a fim de extrair o SDS. Os géis foram incubados 72 h a 37 °C e em Tris-HCl 100 mM a pH 7,5. Os géis foram corados usando Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) e descorados na solução metanol/ácido acético/água (50:10:40, v/v/v). A determinação da atividade proteolítica foi avaliada pela presença de regiões mais claras no gel que contrastaram com o fundo azul escuro (ressaltando a digestão da gelatina presente na matriz de policrilamida).

4.6.2. Digestão em gel SDS-PAGE

As proteínas de interesse detectadas no gel SDS-PAGE foram extraídas segundo o protocolo de Hanna et al (Hanna, Sherman, Kinter, & Goldberg, 2000). Os fragmentos de interesse foram excisados e subsequentemente lavados com 100 µL de NH₄HCO₃ 40 mM e ACN 30% (Sigma-Aldrich), três vezes, durante 10

minutos a temperatura ambiente. Essa solução foi retirada e posteriormente as proteínas nos fragmentos foram reduzidas adicionando 100 µL de DTT 20 mM (Sigma-Aldrich) a 60 °C durante 60 min.

Após esta etapa, a solução foi retirada e aos fragmentos foram adicionados 100 µL de iodoacetamida 20 mM (Sigma-Aldrich) e mantidos no escuro a 37 °C durante 1 hora. A solução alquilante foi removida e os fragmentos lavados (três vezes) com 100 µL de NH_4HCO_3 40 mM durante 10 minutos. As amostras foram desidratadas usando 100% ACN por 10 minutos. Este procedimento foi repetido três vezes. A acetonitrila foi evaporada em um sistema de vácuo do tipo speed vac (Savant, Farmingdale, NY, EUA).

Os fragmentos do gel foram reidratados em uma solução de tripsina 0,1 µg/µL (sigma) em NH_4HCO_3 40 mM e mantidos em banho de gelo, por 30 minutos. Em seguida, a tripsina foi retirada e adicionada uma solução de NH_4HCO_3 40 mM. Os tubos contendo os fragmentos do gel foram incubados a 37 °C por 18 horas. Os peptídeos trípticos foram extraídos do gel com 50% (v/v) ACN, duas vezes e secados em *speed vac*. Finalmente, os peptídeos trípticos resultantes foram ressuspensos em 15 µL (por amostra) de ácido fórmico 0,1% (v/v) para posterior análises por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

4.6.3. Análise por (LC-MS / MS)

Cinco µg dos peptídeos (quantificados pelo kit Qubit assay da invitrogen, seguindo as instruções do fabricante) foram reconstituídos em 5 µL de ácido fórmico 0,1% (v/v) para as análises no espectrômetro de massas Orbitrap Elite (Thermo Scientific) acoplado a um sistema de cromatografia líquida Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific). Os peptídeos foram injetados em uma coluna analítica (75 µm x 35cm) preenchida com resina de fase reversa ResiproSil-Pur C18-AQ utilizando um fluxo de 250 nL/min. O gradiente de eluição linear da

amostra usado foi de 15 a 45 % do solvente B (acetonitrila 95% (v/v), ácido fórmico 0,1% (v/v)) durante 55 minutos.

A voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 2,5 KV e 275 °C, respectivamente. O espectrômetro foi operado no modo positivo, data-dependent acquisition MS scan e aquisição de espectros de massas em tandem (MS/MS). Os espectros MS foram adquiridos em um intervalo de massa de 350 a 1500 m / z, com uma resolução de $r = 120000$. Foram selecionados os 20 íons mais intensos para a fragmentação por CID e HCD. Para a obtenção da sequência dos íons foi utilizando um tempo de exclusão dinâmica de 90 seg.

A análise dos dados foi realizada usando o software PEAKS V6 (Ma et al., 2003). A identificação das proteínas foi feita por homologia dos peptídeos identificados, usando os bancos de dados para a classe Amphibia da NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e Uniprot (www.uniprot.org). Os critérios de busca foram: 1) até duas perdas da clivagem pela tripsina, 2) tolerância de até 10 ppm para o precursor e 0,5 Da de tolerância para os fragmentos e 3) oxidação, acetilação e deaminação como modificações variáveis. Foi aceito para as identificações um *false-discovery rate* (FDR) de 1% e um mínimo de 2 peptídeos únicos identificados por proteína.

4.7. Identificação dos peptídeos não trípticos presentes na secreção cutâneo de *D. columbianus*

Um mg de amostra foi dissolvido em 500 µL de TFA 1%. A dessalinização foi realizada em uma resina C18 e os peptídeos foram eluídos em diferentes concentrações de acetonitrila. A acetonitrila foi evaporada em um sistema speed vac (Savant, Farmingdale, NY, EUA). Finalmente, os peptídeos trípticos resultantes foram ressuspensos em 15 µL (por amostra) de ácido fórmico 0,1%

(v/v) para posterior análise por LC-MS/MS. A na análise LC-MS/MS foi realizada como foi descrito no item **4.6.3**.

A sínteses dos peptídeos endógenos e os ensaios biológicos foram realizados seguindo os itens **4.1.8**. e **4.2.1**.

4.8. Avaliação da ativação de neutrófilos

O ensaio foi adaptado do protocolo descrito por Neves, em 2011 (Neves, 2011). Neste ensaio, foram avaliados 2 indivíduos com idade de 28 e 27 anos, sem histórico de doenças crônicas, não alcoólatras, não fumantes, sem resposta inflamatória evidente e que não faziam uso de medicamentos. O sangue foi coletado em tubos heparinizados e a coleta do sangue venoso foi feita em material plástico estéril para evitar a ativação precoce dos polimorfonucleares (PMN).

Vinte mL de sangue foram coletados de cada indivíduo dos quais 12 mL foram destinados à separação dos neutrófilos dos outros tipos celulares sanguíneos e o restante foi centrifugado em outro tubo para obtenção de plasma.

Para separação dos PMN, os 12 mL de sangue foram depositados sobre um gradiente de densidade ascendente constituído por Percoll®, Solução Salina de Hanks (HBSS 10X) e Água purificada (grau Milli-Q) em tubo Falcon de 50 mL em concentração de 60% e 70%. O Tubo então foi centrifugado em ROTOFIX 32 a 1300 RPM por 15 min à temperatura ambiente (P. M. Santos, Teixeira, & Sá-Correa, 2004).

Após a primeira centrifugação, apenas a parte do gradiente correspondente aos PMN foi transferida para outros dois tubos Falcon 15 mL com no máximo 7 mL em cada. Para lavar o Percoll da solução, foram adicionados 7 mL de HBSS 1X e centrifugados a 300 g por 5 min a 4 °C. Após a segunda centrifugação todo o

sobrenadante foi descartado para uma segunda lavagem com mais 7 mL de HBSS 1X e centrifugado a 300 g por 5 min a 4 °C.

Todo o sobrenadante foi retirado e os pellets visualizados ao fundo dos dois tubos correspondiam aos neutrófilos contaminados por eritrócitos. Os dois pellets foram reunidos em um único tubo. A hemólise consistiu na adição de 3mL de água milli-Q filtrada seguida por mais 3 mL de HBSS 2X após 25 segundos e centrifugação a 300 g por 5 min a 4 °C. Para todas as amostras, a hemólise foi realizada duas vezes. Todo o sobrenadante foi descartado.

Duas alíquotas foram retiradas para contagem/viabilidade (5 µL) e preparo da lâmina de morfologia/pureza (6 µL), enquanto o restante foi mantido em gelo. A alíquota de 5 µL de PMN foi misturada com 45 µL de Azul de Tripán em um microtubo, do qual foram retirados 10 µL e analisados por microscopia óptica em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi calculada durante esse mesmo ensaio em câmara de Neubauer. Para continuidade do experimento só foram aceitas amostras apresentando mais de 96% de células vivas.

A estimulação e ativação dos neutrófilos foi feita com o peptídeo ativador fMLP (como controle positivo de ativação química), e os peptídeos a duas concentrações 5 µg/mL e 15 µg/mL e o controle negativo (sem ativador, apenas com o tampão).

Para o teste do NBT (nitroazul de tetrazólio, em inglês Nitro-blue tetrazolium), usou-se em um microtubo estéril 0,0005 g de NBT dissolvido em 10 µL de DMSO e submetido à agitação em vortex por 1 minuto para cada condição. Após a solubilização do NBT em DMSO, 1 µL de cada ativador correspondente mais HBSS com Ca^{2+} e Mg^{2+} (89 µL para o controle fMLP e 90 µL para a condição tratamento com peptídeos) foi adicionado aos seus respectivos microtubos e submetidos a 10 min de VORTEX com pausa de 1 min após os primeiros 5 min (Pinto, 2006).

A quantidade de células obtida na separação e estimada na contagem foi dividida entre os ativadores de modo que cada condição tivesse 6667 células/ μL em um volume proporcional a 495 μL de plasma (50% v/v) e HBSS com Ca^{2+} e Mg^{2+} , adicionados à suspensão. Estes microtubos contendo as células+ ativador+ plasma+ HBSS foram chamados Sistemas de ativação, foram incubados à 37 °C por 10 min.

Para a análise por espectrofotometria, de cada Sistema de ativação (6600 células/ μL + plasma + ativador), foram retirados 36 μL e adicionados mais 50 μL de NBT/ativador. Os microtubos foram incubados por mais 20 min a 37 °C sob agitação de 300 rpm em Thermomixer. Após a incubação, a reação foi parada com 50 μL de ácido acético glacial e sonicada por 2min em banho de ultrassom. Mais 50 v de etanol absoluto foram adicionados seguido de 2min de banho de ultrassom, de vortex de 1 min e centrifugação de 2 min à 300 g.

De cada condição, pipetou-se 180uL em um único poço de ELISA identificado e lido em uma faixa de espectro de 350 a 790nm com intervalos de 5 nanômetros em espectrofotômetro SPECTRAMAX e analisado pelo programa SoftMax Pro 6.3.

O preparo para a análise em lâmina consistiu em incubar as lâminas contendo 3 poços com 2 μL em cada retirados do Sistema de ativação respectivo após o tempo de incubação e da adição do NBT previamente preparado. As quatro lâminas foram postas em banho-maria por 5 min a 37 °C. Após esta incubação as lâminas foram invertidas, para retirar o excesso de HBSS, secas e fixadas com metanol por 1min.

Novamente as lâminas foram secas e coradas com Safranina por 5 min. Em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada e deixadas a temperatura ambiente para secar e, depois observadas ao microscópio ótico.

5. Resultados

5.1. Etapa I, busca de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de *D. columbianus*

Visando a identificação e o isolamento de novos peptídeos com atividade antimicrobiana, uma estratégia experimental foi adotado como ilustrado no fluxograma apresentado na figura 4.

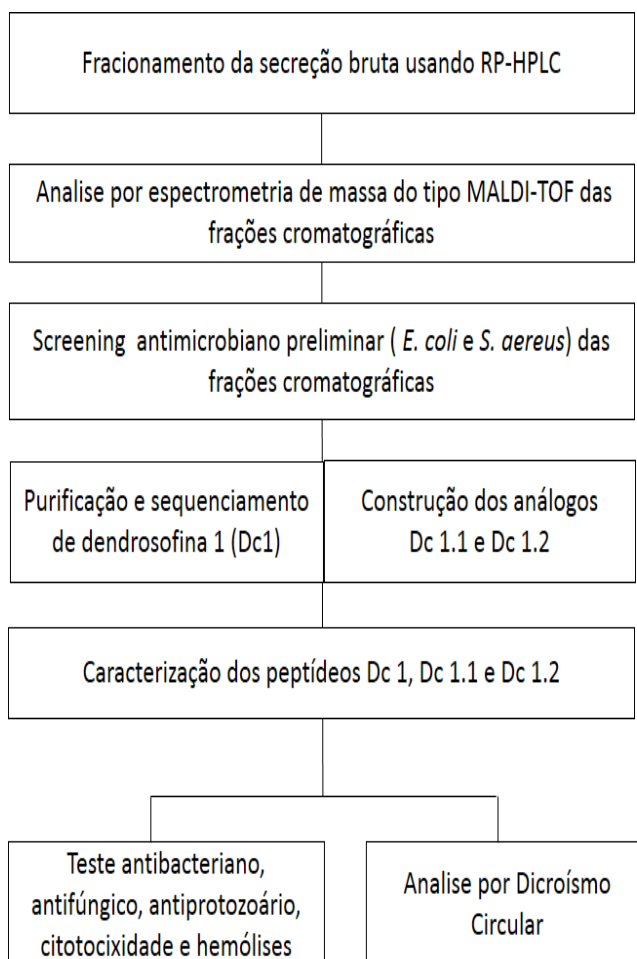


Figura 4. Fluxograma adotado na caracterização química e biológica de peptídeos de *D. colombianus* e seus derivados.

5.1.1. Perfil proteico em SDS-PAGE

Com o objetivo de se determinar a qualidade e composição em termos proteicos da amostra biológica em estudo foi realizada a separação eletroforética empregando-se gel SDS-PAGE 12% de 50 µg de secreção bruta liofilizada de *D. columbianus*, após fervura e preparada segundo Santos (K. Santos, 2007). Pode-se observar a presença de bandas definidas em uma janela ampla entre 14,4 e 97 kDa, o que descarta a ocorrência de degradação (figura 5).

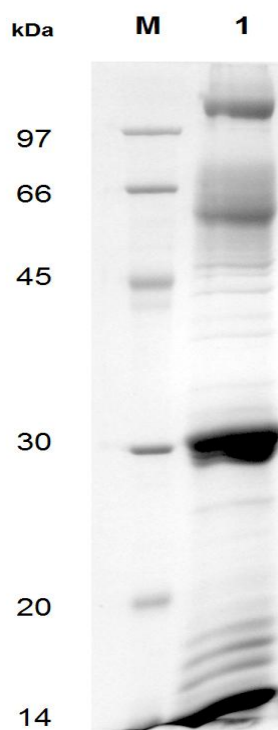


Figura 5. Perfil eletroforético da secreção bruta liofilizada de *D. columbianus*. 1: 50 µg de secreção seca e M: marcador de baixa massa molecular (da Amersham Pharmacia-Biotech). Gel SDS-PAGE 12%, corado com azul de Coomassie (Blue R-350).

5.1.2. Fracionamento de secreção bruta por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C₁₈

Alíquotas de 1,0 mg da secreção bruta liofilizada foram inicialmente fracionadas em coluna analítica C₁₈ por RP-HPLC com um fluxo de 1 mL/min. Foi obtido um perfil cromatográfico de alta resolução e reprodutibilidade (Figure 6), tendo sido coletadas manualmente 93 frações no total.

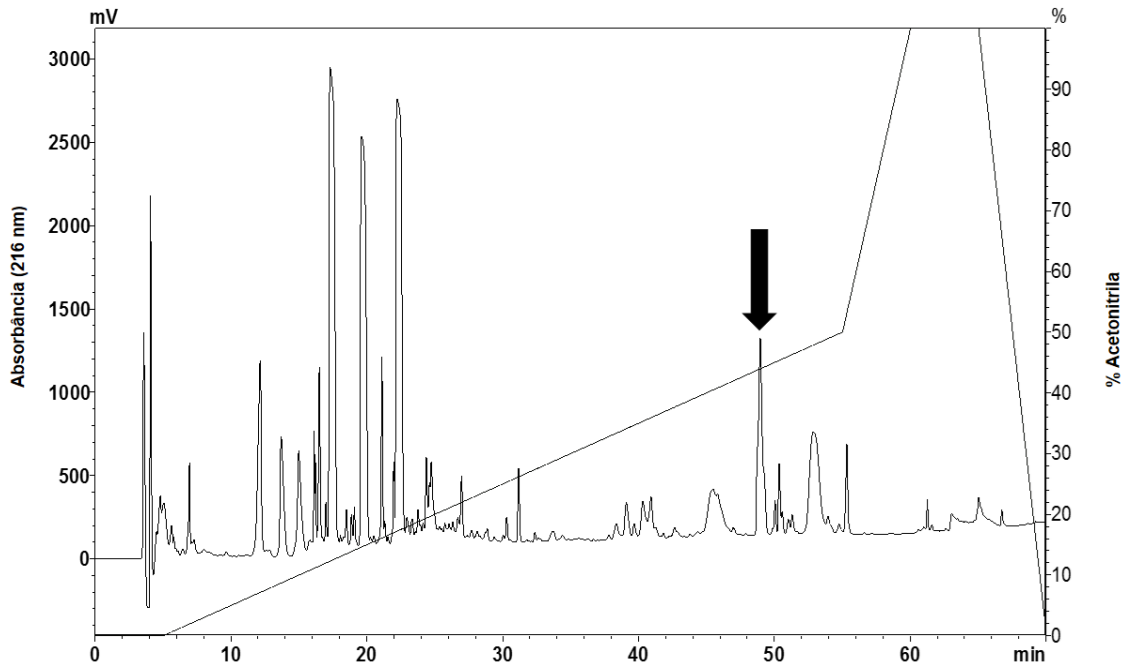
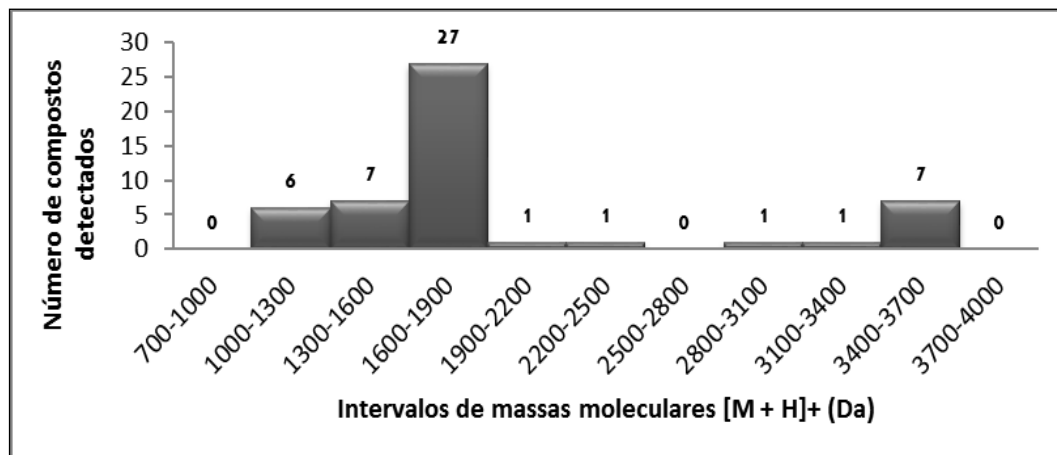


Figura 6. Perfil cromatográfico do fracionamento da secreção cutânea de *D. columbianus* empregando-se coluna C₁₈ (Phenomenex 00G4252E0, 4,6 × 250 mm) em sistema HPLC. A eluição foi realizada acetonitrila em TFA 0.1% com fluxo de 1 mL/min. A seta indica a única fração que apresentou atividade antiproliferativa sobre as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Nessa fração foi identificado um único peptídeo com massa molecular de 1726,517 Da.

5.1.3. Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF

As 93 frações cromatográficas obtidas foram analisadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF usando uma faixa de m/z de 700 a 20.000. Foi observada a presença de componentes com massa molecular até 12.900 Da (figura 7). A maioria dos componentes detectados no espectro de íons positivos eluíram dentro do intervalo de 20 a 61 min da corrida cromatográfica. Só duas frações eluídas nos primeiros 20 min de corrida cromatográfica apresentaram componentes moleculares detectados (Tabela 1).

A



B

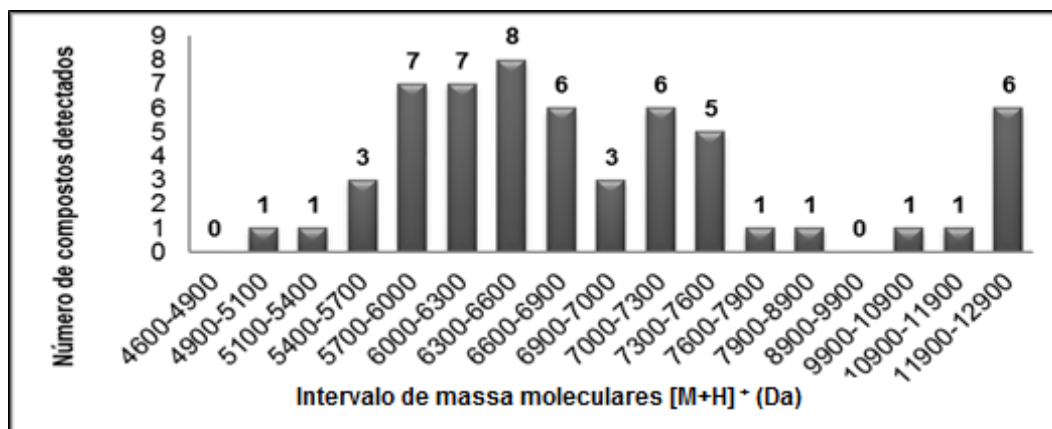


Figura 7. Massas moleculares (MM) dos componentes moleculares detectados na secreção cutânea de *D. columbianus*. Os dados foram agrupados em intervalos de massas moleculares monoisotópicas.

(A) Número de compostos presentes na secreção que possuem MM até 4 kDa.

(B) Número de compostos com MM entre 4 e 12,9 kDa.

Tabela 1. Número da fração cromatográfica, tempo de retenção e massas moleculares dos íons peptídicos [M+H]⁺ (Da) presentes na secreção cutânea de *D. columbianus* e detectados por meio das matrizes HCCA e SA.

Fração	Tempo de retenção	HCCA	SA
5	3,77	3179,93	
6	4,08		
7	5,64		
8	6,19		
9	6,47	1059	
11	9,18		
12	10,78	643	
48	24,48	1270	
49	24,57	1270	
50	24,79	2314	
51	25,11		5733, 6093, 6494
52	25,64		6457
53	25,83		
54	26,11		6231
55	26,39		5400
56	26,7	1464	
57	26,97	1731, 1425	
58	27,6		7939
59	27,91		5911
60	28,08	1162, 1476	
62	28,83	1229	
63	30	1759, 1789	
64	30,32	1284	
65	31,17	1418	
69	36,13	2858, 2938	
70	36,64	3627, 3645, 3676, 3760, 3986	
72	38,16	1400, 3348, 6695	
73	38,87	3550, 6701	5877, 6084
74	39,64		6091, 10295, 1356, 6696, 6711, 6903, 6921, 8633, 9544, 10354, 6694, 7105, 7121, 7278, 7294, 7327, 7344, 9469
75	40,23	7372, 6339	6334, 7397, 7425, 7497, 7575
76	40,5	3281, 3319, 6564, 6639, 7357	6559, 6574, 6634, 6655, 39390, 17427
78	42,3	1628	12513
79	43,93	1708	12690, 1634
82	45,34	1721, 1641	6285, 13420
83	46,54		5914
84	47,47	1728	
85	48,48	1890	
86	49,07	1483, 1506, 1521, 1060	
87	49,62	1485, 1505, 1521, 1727, 1742	6457, 5176, 6905
88	49,98	1727	
89	50,16	1639, 1649, 1665, 1727	
90	50,64		
91	50,88	1740	6145, 6733, 6138, 12692, 12359
92	51,06	1060, 1654, 1742	
93	52,48	1654, 1742, 1724	12384, 12481, 12603, 12695
94	53,27		5966, 5825, 11654, 12482
95	53,55		59671
96	54,14	6012	6011
97	54,87	1675, 1653, 1691	5968, 6013, 6071, 6658, 1380, 14300
98	60,9		
99	61,62	1681, 1703, 1719	

Na Tabela 1 pode se observar que maior porcentagem de componentes moleculares detectados se encontra entre o intervalo de 28 a 50 minutos da corrida cromatográfica. As frações cromatográficas correspondentes aos primeiros 8 minutos de corrida não apresentaram componentes moleculares detectáveis, o que sugere a presença de compostos altamente hidrofílicos, de origem não proteica e de baixa massa molecular.

5.1.4. Screening antimicrobiano preliminar

A atividade antimicrobiana (contra *E. coli* e *S. aureus*) das 93 frações obtidas de uma corrida cromatográfica foi avaliada preliminarmente. Somente a fração 76, com tempo de retenção de 50,16 minutos apresentou ação microbicida contra as bactérias testadas. A massa molecular monoisotópica $[M+H]^+$ do peptídeo com atividade antiproliferativa foi de 1726,517 Da (figura 9).

5.1.5. Purificação, determinação da estrutura primária da dendropsofina 1 (Dc 1) e construção dos análogos Dc 1.1 e Dc 1.2

As frações referentes ao peptídeo antiproliferativo foram reunidas em um *pool* e recromatografadas em coluna C_{18} (Phenomenex 00G4252E0, 4,6 × 250 mm) (Figura 8). Todas as frações da recromatografia foram coletadas e analisadas quanto ao seu grau de homogeneidade por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF no modo refletor de íons positivos na faixa de m/z de 500 a 4.000.

O peptídeo de massa molecular protonada de 1726,517 Da, indicado por uma seta na figura 8, foi nomeado dendropsofina 1 (Dc 1). A Dc 1 foi submetida a sequenciamento químico por degradação de Edman resultando na estrutura primária: $^1\text{NLLNDALGTVNGLLGRS}^{17}$. Sua estrutura primária permite evidenciar uma composição rica em resíduos hidrofóbicos ou não-carregados, com carga líquida de zero (Tabela 2). Usando os programas BLASTP e MS-BLAST foi determinado que Dc 1 não apresenta nível de similaridade com as sequências de peptídeos antimicrobianos identificados e disponíveis no banco de dados NCBI *non-redundant*. Assim, pode-se sugerir que a Dc 1 é um novo peptídeo antimicrobiano presente na secreção cutânea de *D. columbianus*.

Dc1 apresenta uma razão de hidrofobicidade total de 41% e sua carga líquida é nula, devido ao balanço entre um resíduo positivo, a arginina presente na posição 16, e um resíduo negativo, resíduo de ácido aspártico na posição 5 da cadeia peptídica (Tabela 2).

Com o objetivo de aumentar a atividade antimicrobiana, dois análogos foram propostos, denominados Dc1.1 e Dc1.2 (Tabela 2). O análogo Dc1.1 apresenta uma única substituição: o resíduo de ácido aspártico na posição 5 foi substituído por um resíduo de lisina, de modo a aumentar a cationicidade do peptídeo favorecendo as interações eletrostáticas com as membranas aniônicas dos patógenos.

O análogo Dc1.2 foi desenhado com múltiplas substituições, incluindo três resíduos catiônicos (N4K, G8K, G12K), um resíduo polar não-carregado (D5S) e dois resíduos de ácido aspártico (G15A, R16A) sendo que todas essas modificações foram feitas com o intuito de melhorar as características anfipáticas do peptídeo e prevenir citotoxicidade de amplo espectro. Finalmente uma amidação na porção carboxi-terminal foi incluída, a qual acredita-se ser capaz de estabilizar a α -hélice anfipática aumentando a eficácia dos AMPs (R Dennison, HG Morton, & A Phoenix, 2012).

Tais modificações permitiram um aumento na carga líquida para +2 no caso do análogo Dc1.1 e +4 para Dc1.2 (Tabela 2). Outras propriedades biofísicas alteradas no análogo Dc 1.2 foram a razão de hidrofobicidade total de 41% para 51% e o momento anfipático médio que aumentou de 0.492 em Dc1 para 0.540 em Dc1.2 (Tabela 2).

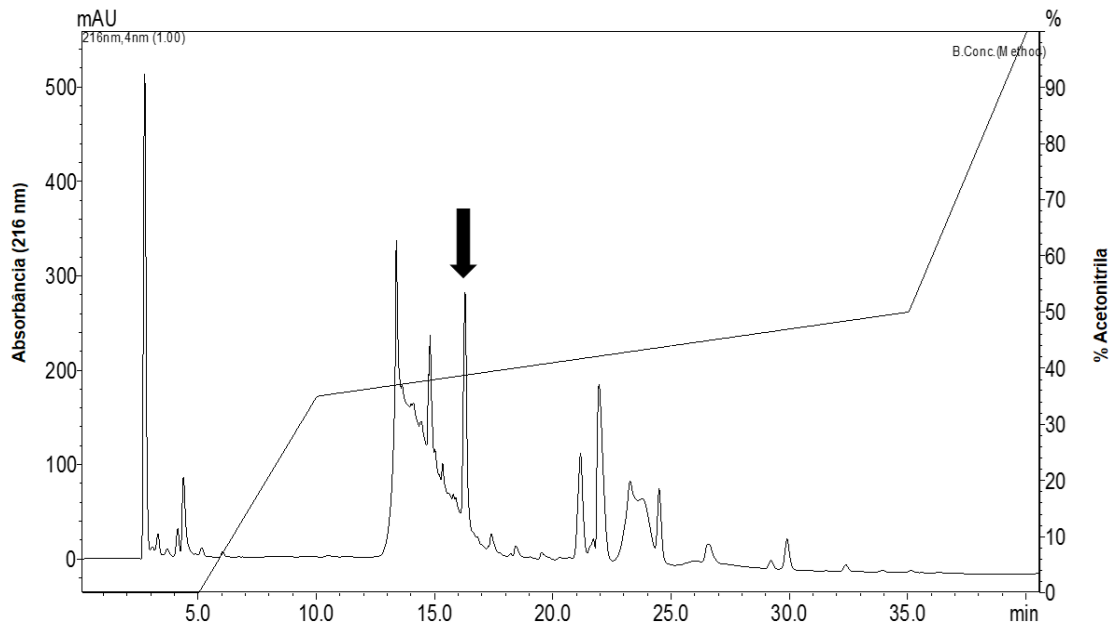


Figura 8. Purificação do peptídeo de interesse. As recromatografias do peptídeo de massa molecular monoisotópica de 1726,517 Da foram realizadas por RP-HPLC em uma coluna C₁₈ (Phenomenex 00G4252E0, 4,6 × 250 mm).

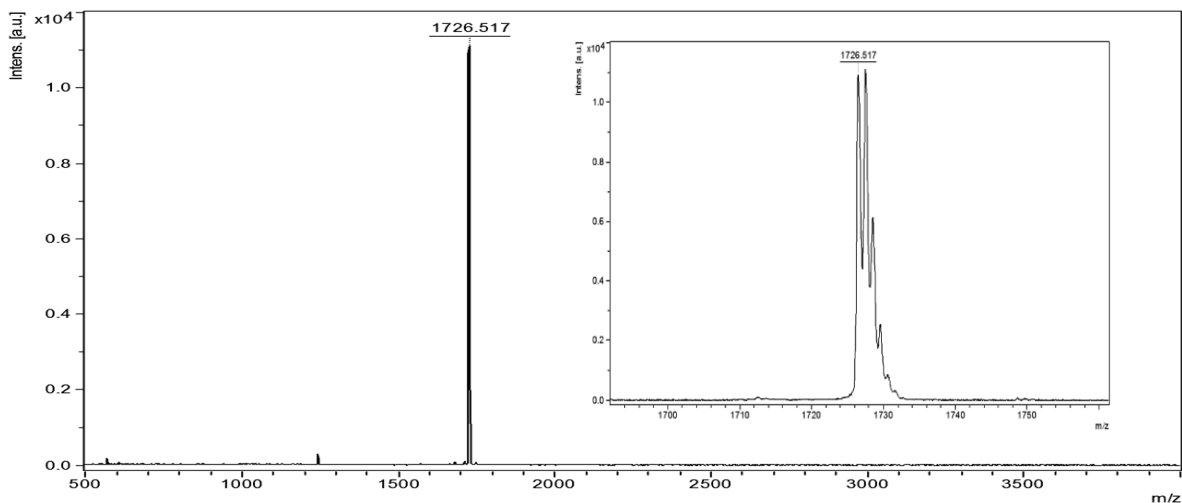


Figura 9. Espectro de massas do peptídeo de 1726,517 Da. Os espectros foram obtidos usando uma placa com 20 µg/µL de HCCA e analisados na faixa m/z de 500 a 4000 no modo refletor de íons positivos calibrado com uma mistura padrão de peptídeos comercial PepMix™.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos peptídeos Dc 1, Dc 1.1 e Dc 1.2

Peptídeo	Estrutura Primária	Massa Molecular Teórica (Da) ^a	Carga Líquida	Razão de Hidrofobicidade Total (%) ^b	□H ^c
Dc1	NLLNDALGTVNGLLGRS.COOH	1725.94	0	41	0.492
Dc1.1	NLLNKALGTVNGLLGRS.COOH	1740.05	2	41	0.502
Dc1.2	NLLKSALKTVNKLLAAS.CONH ₂	1783.14	4	52	0.540

^aMassa Molecular Monoisotópica.

^bRazão de Hidrofobicidade Total (%) determinada com o uso de: http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php

^cμH, momento anfipático médio determinado com o uso de: <http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParamsV3.py>.

5.1.6. Caracterização estrutural dos peptídeos Dc 1, Dc 1.1 e Dc 1.2

Como a função biológica de um AMP é relacionada a sua estrutura, efetuamos uma caracterização estrutural dos 3 peptídeos.

5.1.6.1. *Projeção tridimensional das sequências primárias dos peptídeos*

As projeções em hélice para os peptídeos Dc 1, Dc 1.1 e Dc 1.2 estão representadas na figura 10. Nesta representação pode se observar que a distribuição anfipática foi mantida nos três peptídeos.

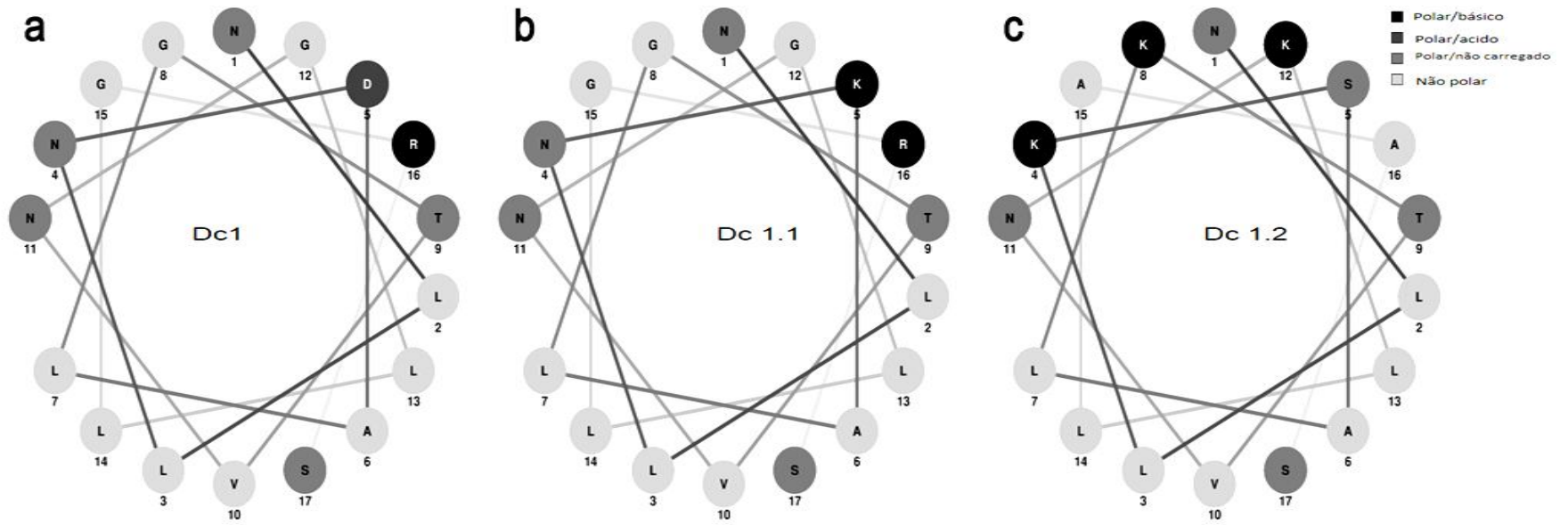


Figura 10. Comparação entre as projeções em hélice dos peptídeos antimicrobianos Dc 1 (A), Dc 1.1 (B) e Dc 1.2 (C), usando o programa NetWheels (<http://lbqp.unb.br/NetWheels>).

5.1.6.2. Análise por dicroísmo circular

Os espectros obtidos em água a 25 °C mostram as características típicas de moléculas com estrutura não ordenada padrão (figura 11. A, B e C).

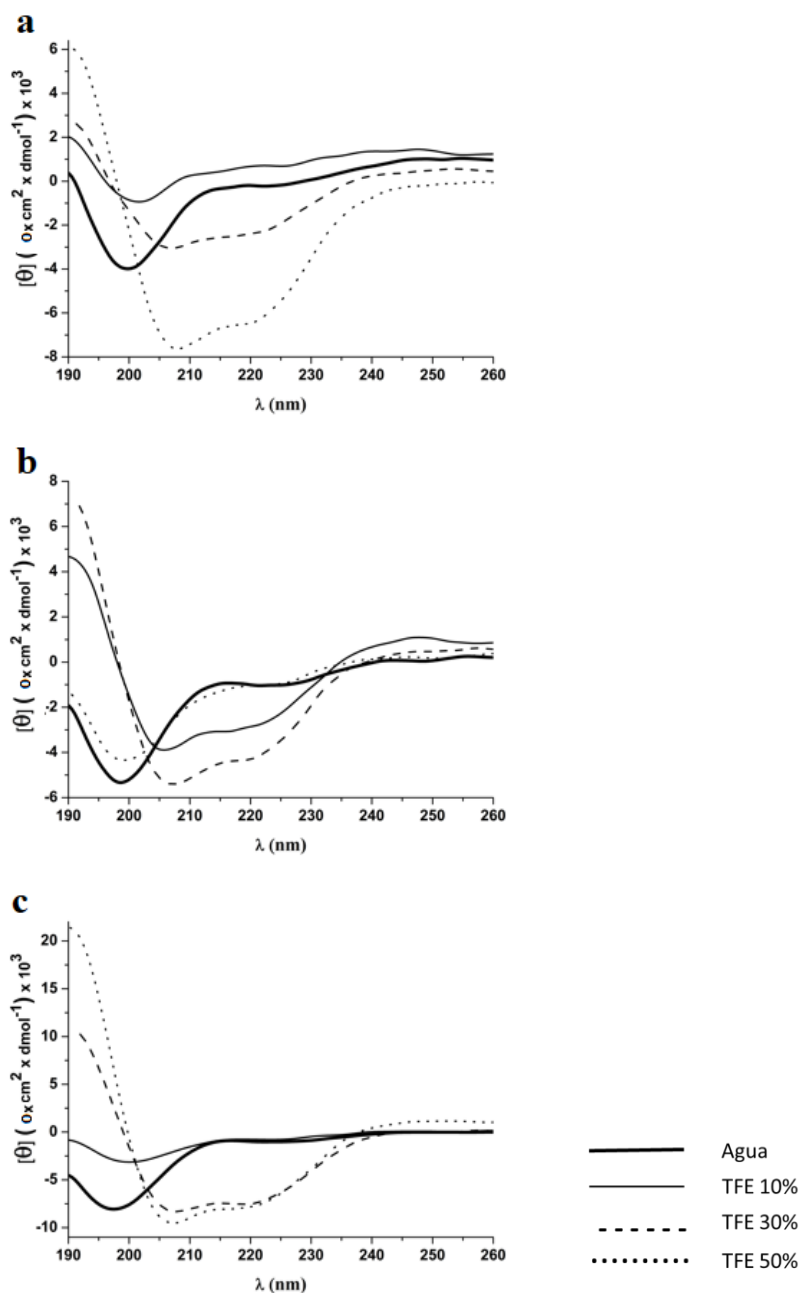


Figure 11. Espectro de FAR-UV CD dos peptídeos sintéticos em água (linha grossa sólida), TFE 10% (v/v) (linha sólida), TFE 30% (v/v) (linha de traços) e 50% (v/v) (Linha de pontos) **(A)** Dc 1; **(B)** Dc 1.1; **(C)** Dc 1.2.

Ao aumentar a concentração de TFE de 10 para 30 (v/v) pode-se observar uma tendência à formação de estrutura em α -hélice, indicada pelo aumento nos sinais dicróicos negativos registrados a 208 e 222 nm (figura 11C). Estes resultados sugerem a tendência do peptídeo para adoptar uma conformação α -hélice a partir do 30% de TFE.

A helicidade dos peptídeos foi calculada considerando-se a elipticidade molar a 208 nm em água e na presença de TFE (Tabela 3).

Tabela 3. Helicidade calculada dos peptídeos Dc 1, Dc 1.1 e Dc 1.2 em aumento da concentrações de TFE.

Peptídeo	Água	TFE 10%	TFE 30%	TFE 50%
Dc 1	13,28	10,80	15,50	22,67
Dc 1.1	14,28	14,49	16,59	19,17
Dc 1.2	15,53	13,79	25,54	23,72

A estabilidade térmica dos peptídeos foi testada por meio do estabelecimento de uma curva de desnaturação no intervalo de temperatura 25 °C a 95 °C (figura 12 A, B, C). Os espectros resultantes mostram uma estabilidade no sinal dicróico perto de zero a 208 nm. Igualmente, no processo de renaturação de 95 °C a 25 °C (figura 12 D, E, F) foi observado a capacidade de retornar a conformação inicial.

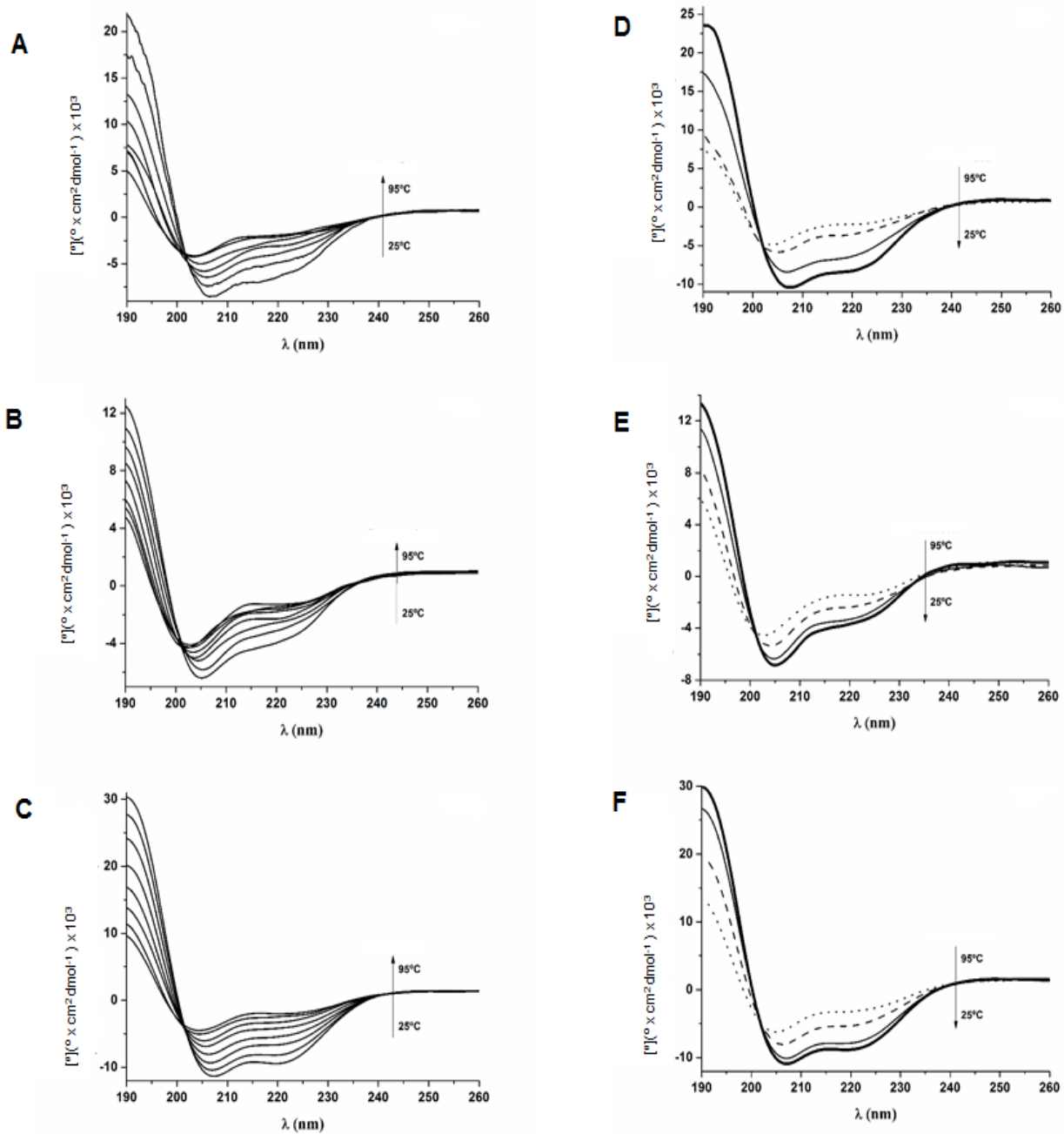


Figura 12. Espectro CD dos peptideos Dc 1 (A), Dc 1.1 (B) e Dc 1.2 (C) no intervalo de temperatura 25 °C a 95 °C e espectro CD dos peptideos Dc1 (D), Dc 1.1 (E) e Dc 1.2 (F) no intervalo de temperatura 95 °C 25 °C.

5.1.6.3. Representação preliminar da estrutura em α -hélice do Dc 1 nativo

A representação alfa hélice do peptídeo Dc 1 foi feita usando o software NAMD (Nanoscale Molecular Dynamics). Esta simulação preliminar foi feita em uma caixa de água durante 100 ns. A imagem captada aos 100 ns de simulação mostra uma alfa-hélice estável apresentando a distribuição anfipática corroborando os resultados das análises por dicroísmo circular (figura 10).

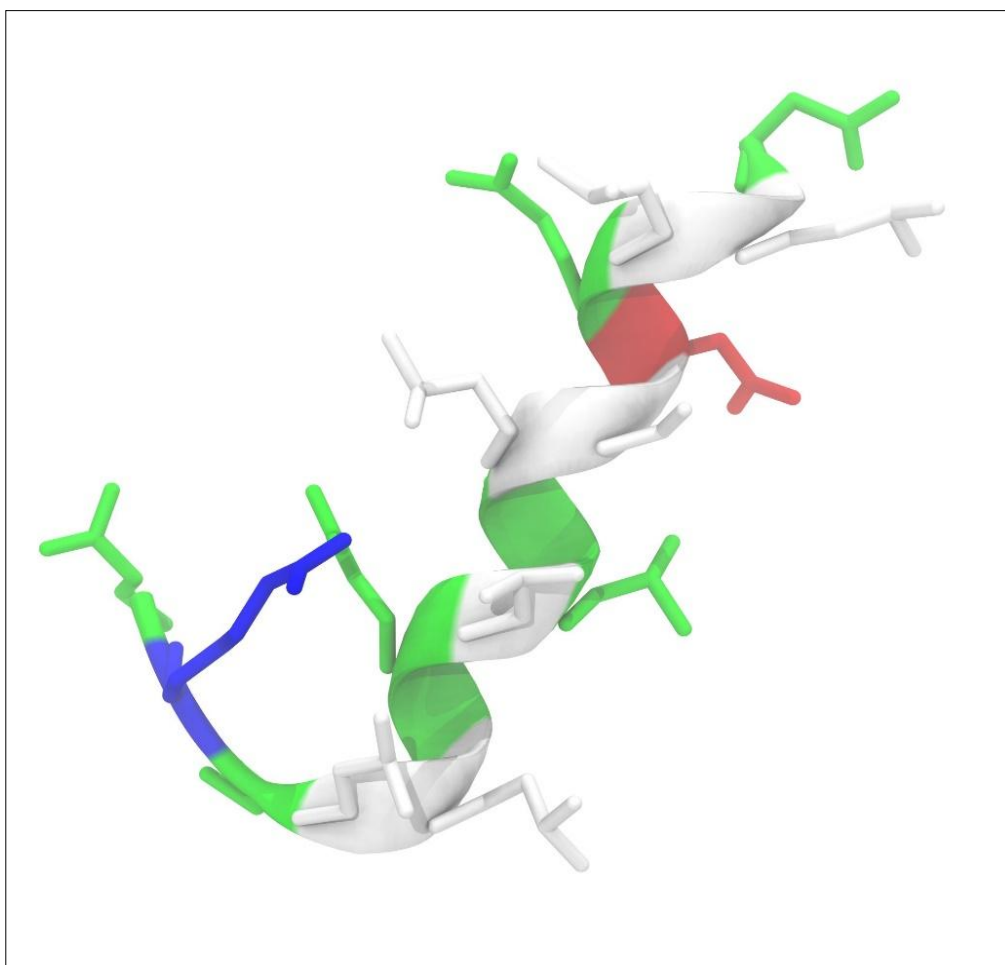


Figura 13. Representação da estrutura em α -hélice do peptídeo nativo Dc 1. Em azul e vermelho estão representados os resíduos de aminoácidos carregados (ASP e ARG respectivamente).

5.1.7. Testes antimicrobianos

A atividade antiproliferativa dos três peptídeos foi testada em triplicata contra bactérias, fungos e protozoários, assim como a atividade hemolítica e a citotoxicidade foram avaliadas contra eritrócitos humanos e células de mioblasto de rato L6, respectivamente. Na tabela 4, pode-se observar que esses peptídeos possuíram atividade bactericida moderada e sem atividades antiprotozoal e antifúngica. O análogo Dc 1.2 apresentou uma maior atividade bactericida com maior espectro de atividade, principalmente sobre bactérias Gram-negativas

Dc1 and Dc1.1 apresentaram atividade antimicrobiana semelhante sobre *E. coli* (MIC = 64 μ M) e *S. aureus* (MIC = 32 μ M), não sendo ativos sobre os demais microrganismos avaliados. Dc1.2 exibiu atividade antimicrobiana sobre todas as bactérias patogênicas testadas: *E. coli* (MIC = 32 μ M), *P. aeruginosa* (MIC = 64 μ M), *K. pneumonia* (MIC = 64 μ M), *S. epidermidis* (MIC = 128 μ M) e *S. aureus* (MIC = 64 μ M) (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade antimicrobiana, citotóxica e hemolítica de Dc 1, Dc 1.1 e Dc 1.2.

Microrganismos	Dc 1	Dc 1.1	Dc 1.2
Bactéria Gram-negativa		MIC (μM)	
<i>Escherichia coli</i>	64	64	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA ^a	NA ^a	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NA ^a	NA ^a	64
Bactéria Gram-positiva		MIC (μM)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	32	32	128
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NA ^a	NA ^a	64
Protozoários		IC₅₀ (μM)	
<i>Plasmodium falciparum</i>	NA ^b	NA ^b	NA ^b
<i>Trypanosoma cruzi</i>	NA ^b	NA ^b	NA ^b
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	NA ^b	NA ^b	NA ^b
<i>Giardia lamblia</i>	NA ^b	22,17	ND
Fungo		MIC (μM)	
<i>Candida albicans</i>	NA ^a	NA ^a	NA ^a
<i>Candida parapsilopsis</i>	NA ^a	NA ^a	NA ^a
Células de mamíferos		HC₅₀ (μM)	
Eritrócitos humanos	>256	>256	>256
		IC₅₀ (μM)	
Células L6	>256	105 \pm 14	174 \pm 9.64

NA= não ativo. a: não ativo a 128 μM . b: porcentagem de inibição <60% a 10 $\mu\text{g/ml}$. ND = não determinado.

5.2. Etapa II, análise peptidômica e proteômica da secreção cutânea de *D. columbianus* por *shotgun*

5.2.1. Identificação de proteínas presentes na secreção cutânea de *D. columbianus*

Por ser o primeiro estudo bioquímico da secreção cutânea dessa rã e sabendo da presença de proteínas secretadas de alta massa molecular, observadas no perfil eletroforético da figura 5, realizamos um estudo abrangente proteômico segundo o fluxograma apresentado na figura 14.

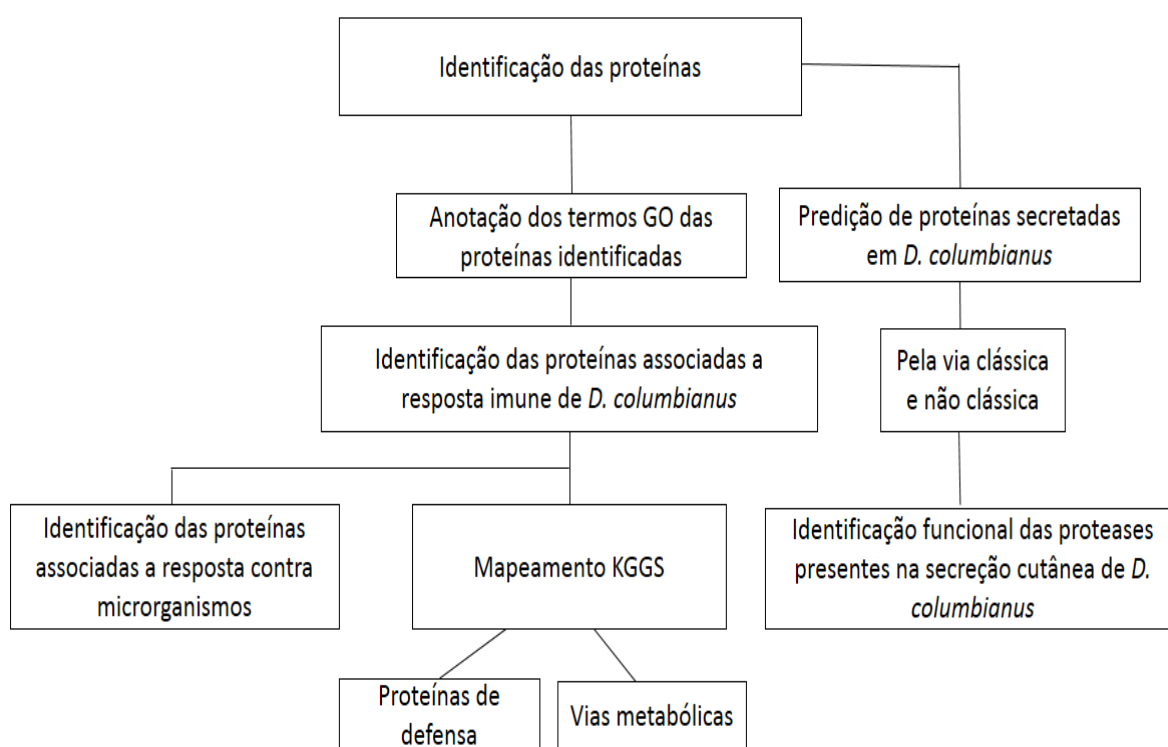


Figura 14. Fluxograma de resultados da identificação de proteínas e peptídeos da secreção cutânea de *D. columbianus* por LC-MS/MS.

5.2.2. Análise qualitativa das proteínas identificadas por LC-MS/MS

De forma geral, a partir de 114739 espectros MS/MS obtidos e usando como banco de dados a classe amphibia da NCBI *non-redundant* o NCBI *non-redundant* limitado à classe amphibia, foram identificadas 1231 proteínas por meio

do programa PEAKS. Foram estabelecidos como critérios de estringência 1 peptídeo único e FDR (false discovery rate) de 1 %. Os resultados da análise estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5. Análise qualitativa dos dados proteômicos da secreção de *D. columbianus*.

Análise qualitativa da secreção de <i>D. columbianus</i>	
Dados	
Número de MS Scans	23864
Número de MS/MS Scans	114739
Estatística dos resultados filtrados	
Concordância entre peptídeos -espectros	5037
Sequência de peptídeos	1328
Grupo de proteínas	357
Número de proteínas	1231
Proteínas (número de peptídeos únicos)	257 (>2); 268 (=2); 706 (=1);
Sequências de <i>Novo</i> não identificadas	34217

5.2.3. Anotação das proteínas identificadas

Utilizando o *software* Blast2GO, foram realizadas a anotação e a classificação dos termos GO (*Gene Ontology*) das 1231 proteínas. A figura 15 mostra o número de sequências catalogadas por processos biológicos, a figura 16 apresenta o número de sequências distribuídas por componentes celulares, e a figura 17 indica o número de sequências classificadas por funções moleculares.

Número de sequencias relacionadas em processos biológicos

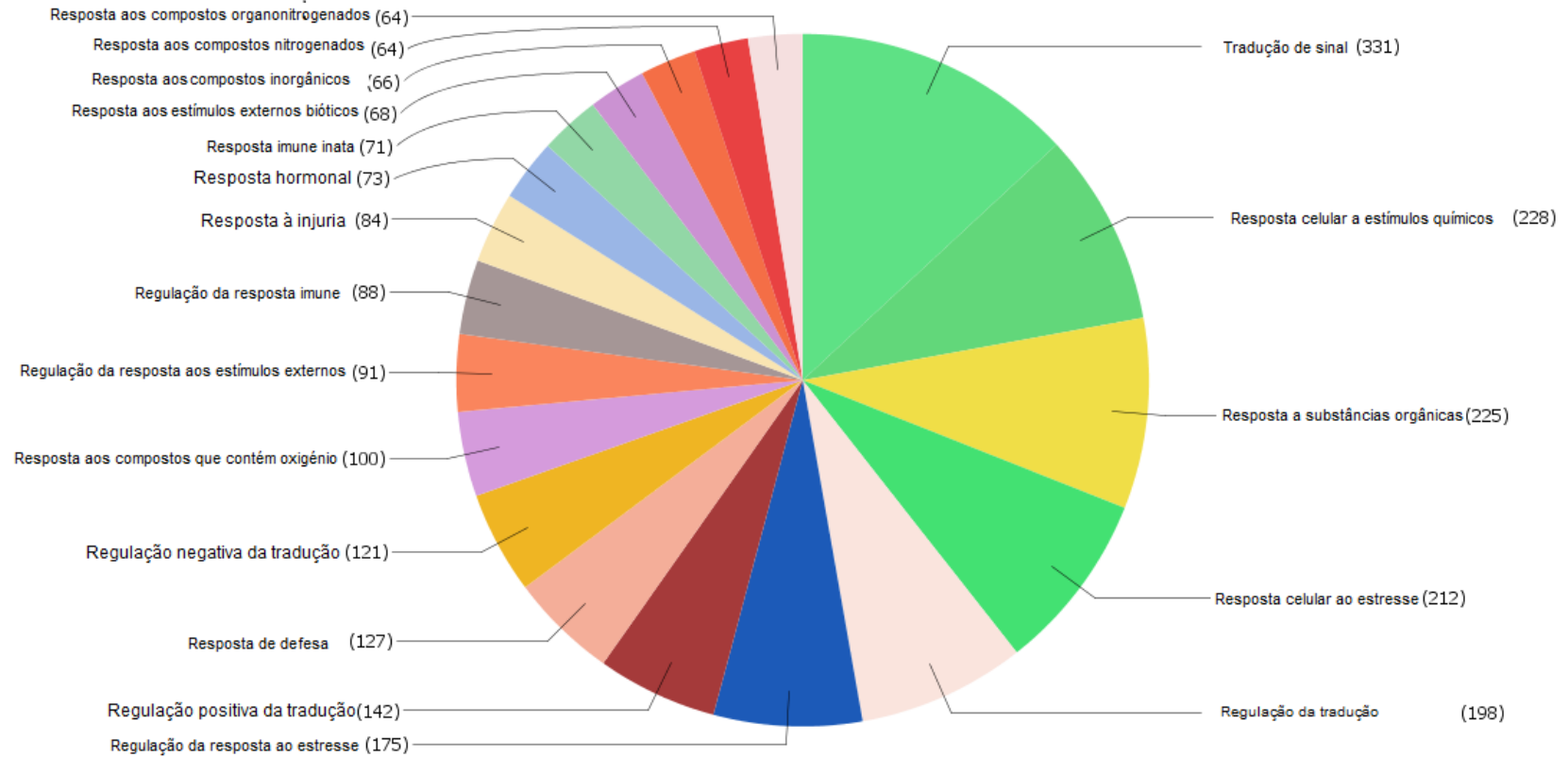


Figura 15. Classificação funcional das proteínas identificadas na secreção cutânea de *D. columbianus* segundo o termo 'processo biológico' do *Gene Ontology*.

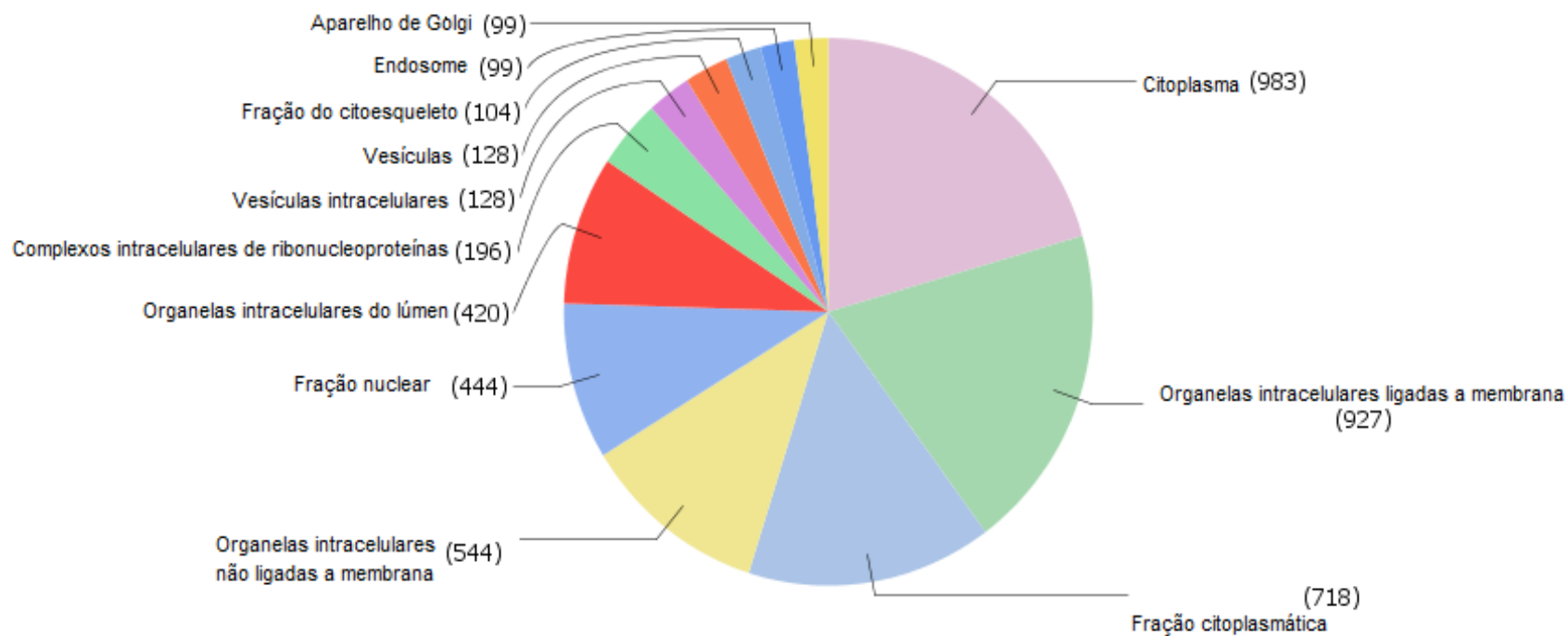


Figura 16. Classificação funcional das proteínas identificadas na secreção cutânea de *D. columbianus* segundo o termo 'componente celular' do *Gene Ontology*.

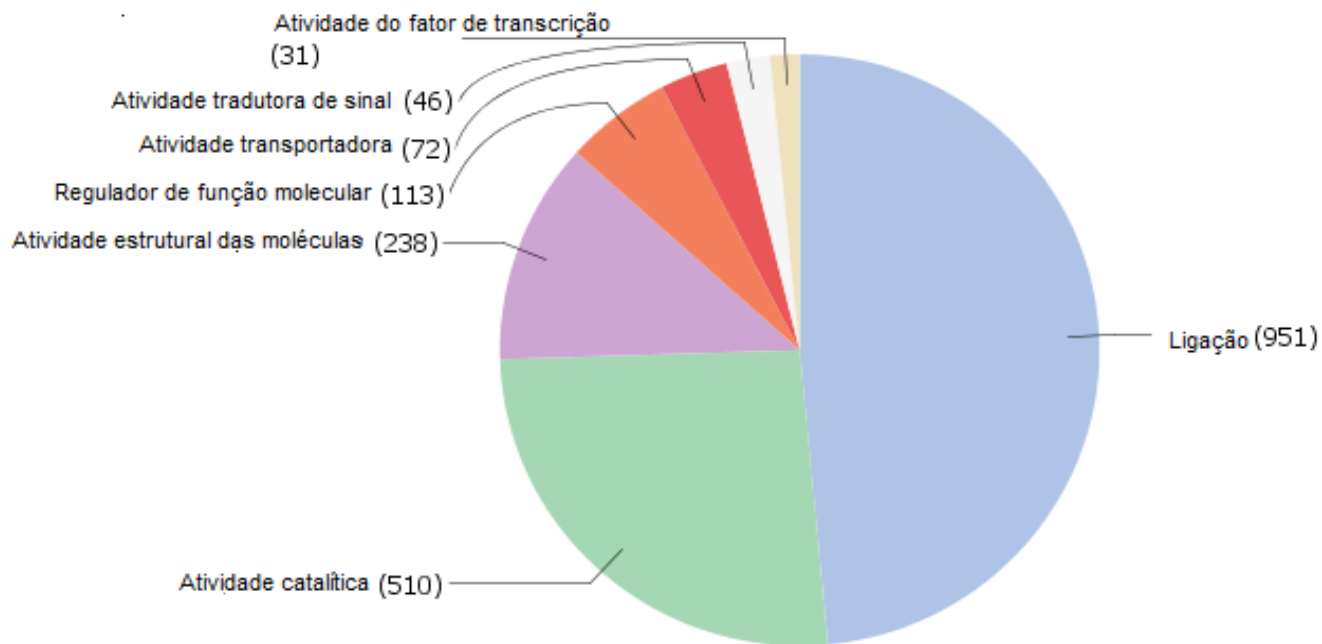


Figura 17. Classificação funcional das proteínas identificadas na secreção cutânea de *D. columbianus* segundo o termo 'função molecular' do *Gene Ontology*.

5.2.4. Proteínas na secreção cutânea de *D. columbianus* associadas à resposta contra microrganismos

A partir das sequências proteicas na categoria “**resposta de defesa, regulação de resposta ao estresse e resposta celular ao estresse**” do termo GO ‘processo biológico’ (figura 15), foi obtida a subclassificação GO das proteínas em resposta contra fungos, resposta contra vírus, resposta contra bactérias e resposta contra outros microrganismos (Tabela 6).

Tabela 6. Proteínas identificadas aos termos resposta contra bactérias, fungos e outros microrganismos

Número de acesso GI	Nome da proteína	Espécie	-logP	Peptídeos únicos	Massa Molecular (Da)
Termo GO: resposta contra bactérias					
122034	Histone H2B 1.2	<i>X. laevis</i>	157,5	9	13905
27924279	Rab1-prov	<i>X. laevis</i>	103,6	3	22662
49117950	MGC80326	<i>X. laevis</i>	84,6	2	35799
49250530	RAB1A	<i>X. laevis</i>	84,6	2	35799
117557991	RAB1A	<i>X. tropicalis</i>	103,6	3	22662
Termo GO: resposta contra fungos					
148223025	Annexin A3	<i>X. laevis</i>	84,6	2	35799
27924246	Psm14-prov protein	<i>X. laevis</i>	113,9	2	34567
49258176	MGC80929	<i>X. laevis</i>	113,9	2	34567
60688345	MGC97603	<i>X. tropicalis</i>	113,9	2	34566
71895967	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	<i>X. tropicalis</i>	113,9	2	34566
301624810	glucose-regulated protein	<i>X. tropicalis</i>	185	9	72496
Termo GO: resposta contra outros microrganismos					
288992	Histone H3	<i>X. laevis</i>	80,21	2	15388
89269516	Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion	<i>X. tropicalis</i>	95,84	3	14728
89269517	Histone 2, H3c	<i>X. tropicalis</i>	80,21	2	15388
89270410	Histone 2	<i>X. tropicalis</i>	80,21	2	15388
113707410	ubiquitin/ribosomal protein L40 fusion protein	<i>B. gargarizans</i>	95,84	3	14742
206984527	Unnamed protein	<i>X. laevis</i>	80,21	2	14374
226372118	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	<i>R. catesbeiana</i>	76,8	2	36405
311815134	Unnamed protein	<i>X. laevis</i>	80,21	2	15374

As identificações foram feitas pelo software PEAKS.

5.2.5. Mapeamento das proteínas encontradas na secreção cutânea associadas à resposta de defesa de *D. columbianus*

Para determinar o componente celular das proteínas relacionadas com o sistema de defesa e elucidar as vias imunológicas utilizadas pelo animal, foi realizado o mapeamento KEGG das 127 proteínas com anotação BLAST2GO “resposta de defesa”. A figura 18 apresenta o complexo proteico do ribossomo, o qual foi mapeado no KEGG ao maior número de proteínas associadas ao termo GO descrito. A cor rosa representa as proteínas presentes na secreção de *D. columbianus* e que foram associadas ao ribossomo. Mesmo que este complexo proteico não esteja diretamente relacionado com o processamento de peptídeos antimicrobianos, chama a atenção que seja a estrutura celular com o maior número de proteínas associadas.

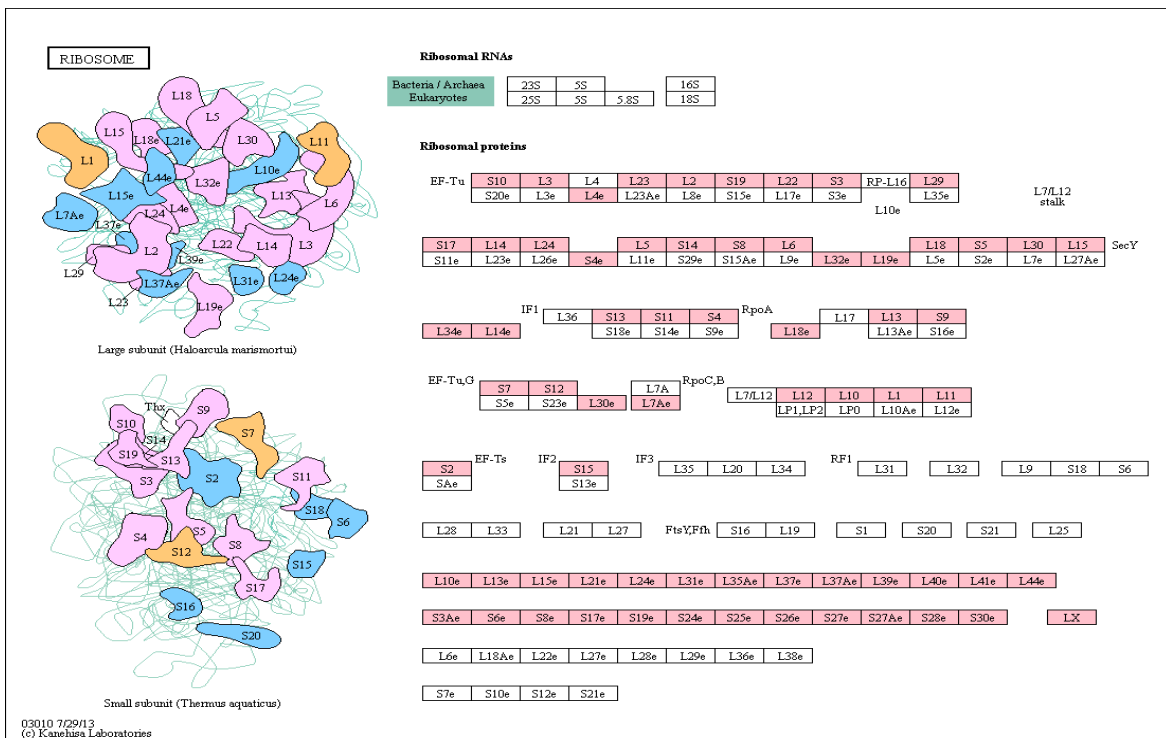


Figura 18. Mapeamento KEGG do ribossomo, baseado nas 127 proteínas com anotação BLAST2GO “resposta de defesa” presentes na secreção cutânea de *D. columbianus*.

Na figura 19 pode se observar o mapeamento da unidade catalítica do proteossoma e imunoproteossoma o que poderia relacionar-se com a produção de peptídeos envolvidos na resposta de defesa na cutânea.

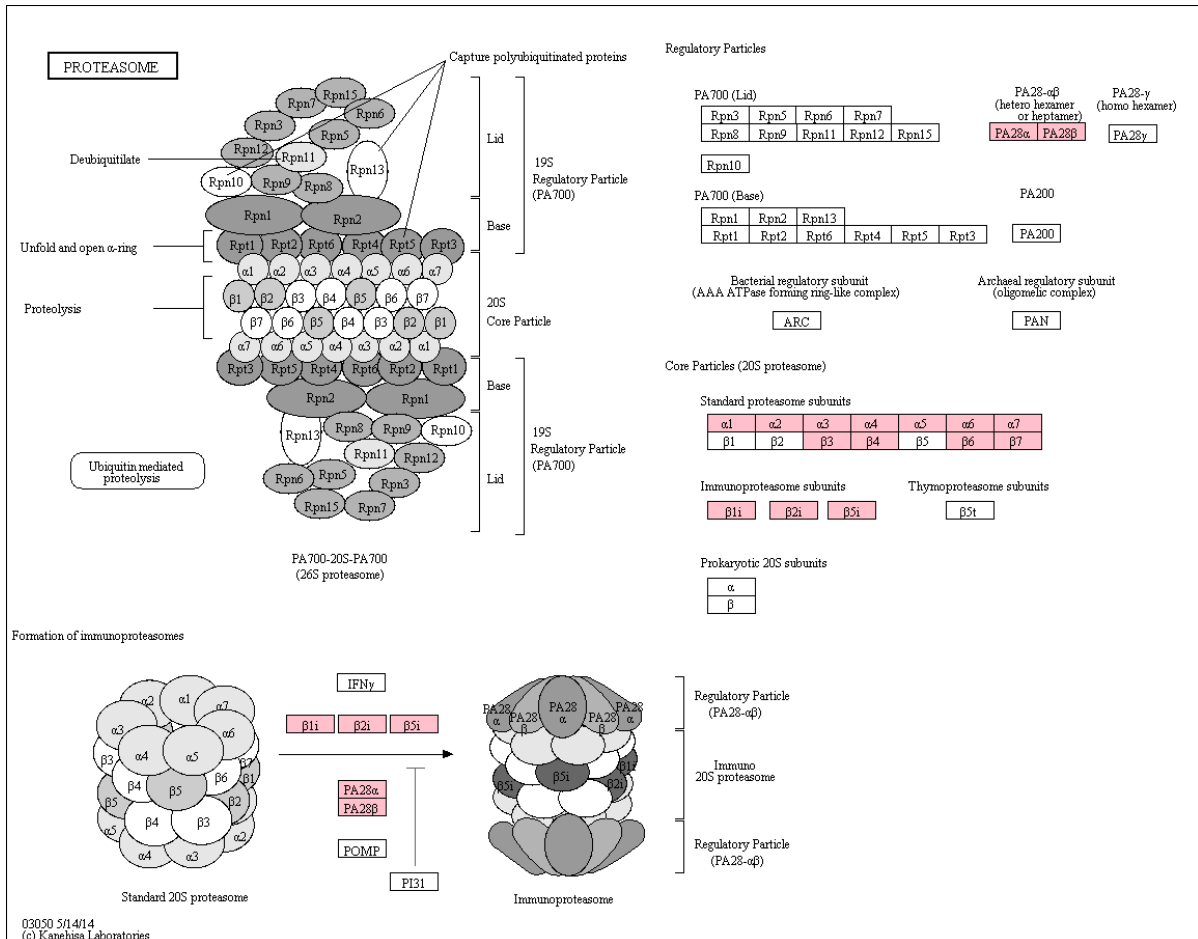


Figura 19. Mapeamento KEGG do proteossoma e imunoproteossoma, baseado nas 127 proteínas com anotação BLAST2GO “resposta de defesa” presentes na secreção cutânea de *D. columbianus*.

5.2.6. Mapeamento das vias metabólicas a partir das proteínas identificadas na secreção cutânea de *D. columbianus*

Adicionalmente for realizada a análise KEGG das 1231 proteínas identificadas. As vias relacionadas com o sistema de defesa foram as vias de formação do fagossomo e a endocitose (figuras 20, 21).

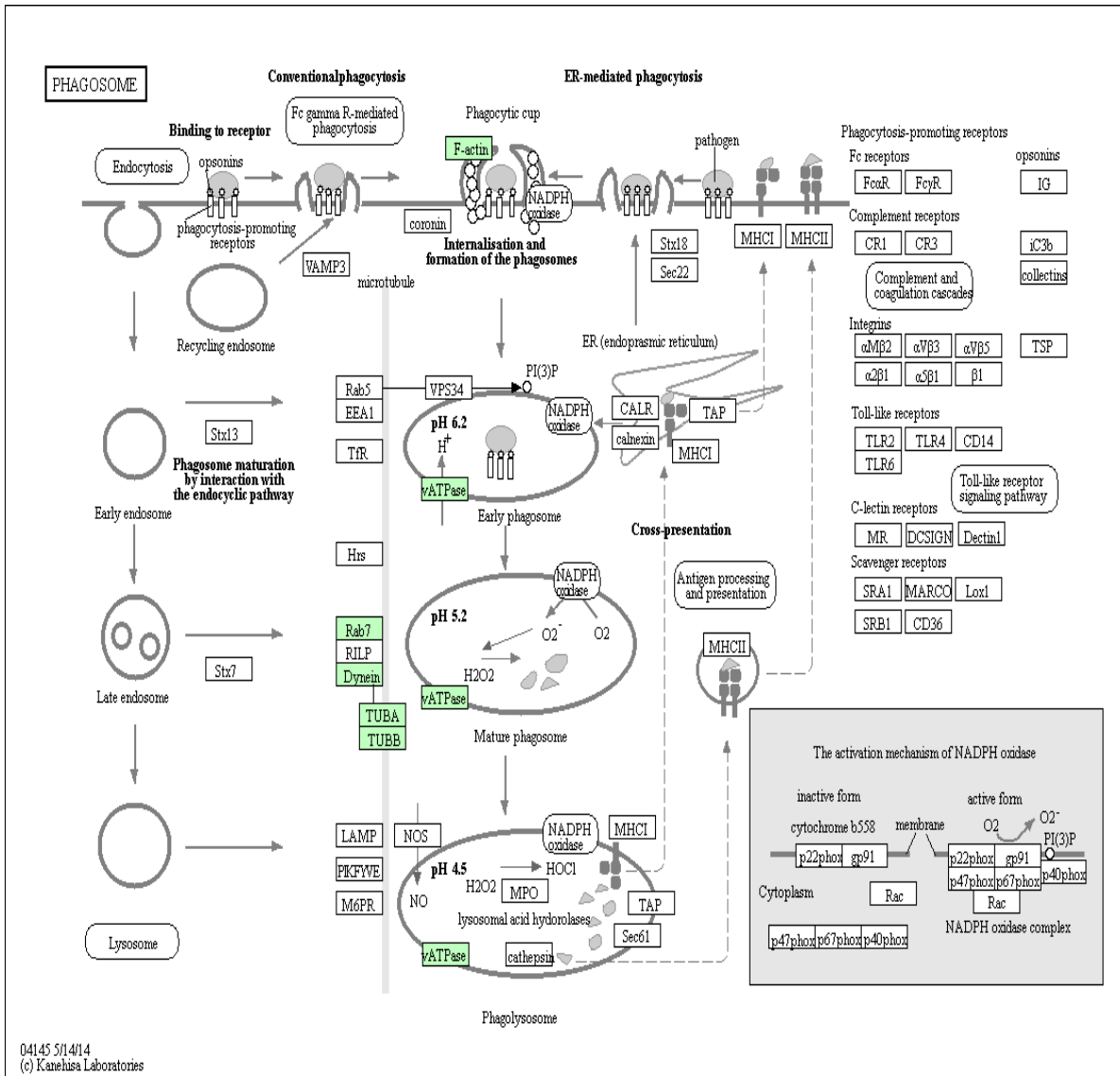


Figura 20. Mapeamento KEGG do fagossomo, baseado nas 1231 proteínas identificadas na secreção cutânea de *D. columbianus*.

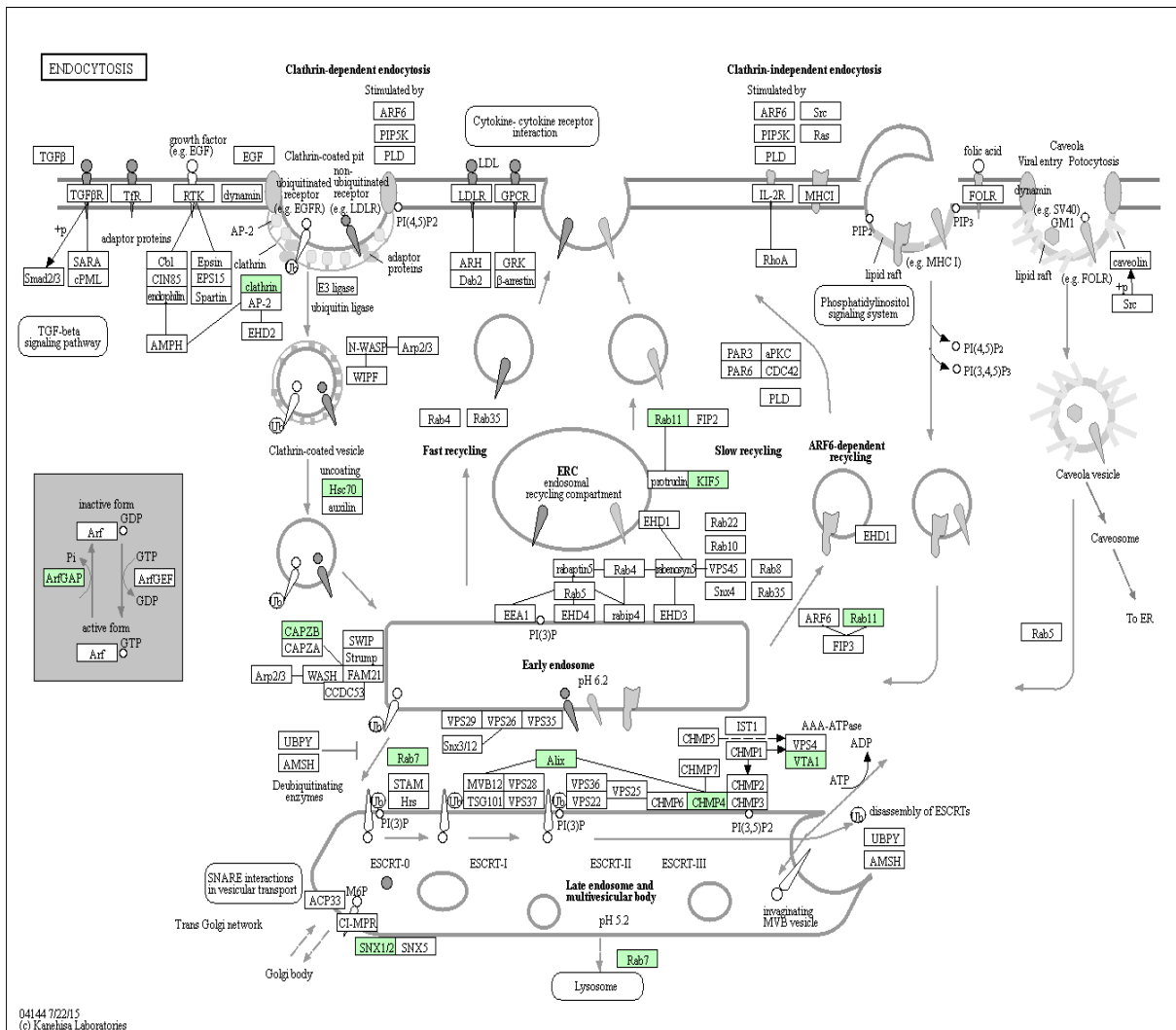


Figura 21. Mapeamento KEGG da endocitose, baseado nas 1231 proteínas identificadas na secreção cutânea de *D. columbianus*.

5.2.7. Predição de proteínas secretadas pela pele de *D. columbianus*

Com objetivo de discriminar as proteínas de fato secretadas da categoria “resposta de defesa”, foi realizada a predição das proteínas secretadas pela via clássica e não clássica pelo programa SignalP visando identificar a presença de peptídeo sinal nas sequências proteicas.

5.2.8. Predição de proteínas com peptídeos sinal secretadas pela via clássica usando o servidor SignalP 4.1

A Tabela 7 descreve as 14 proteínas que apresentaram um peptídeo sinal e os termos GO (processos celulares) associados.

Tabela 7. Proteínas identificadas a partir da secreção cutânea de *D. columbianus* preditas como secretada por via clássica

Número de acesso GI	Nome da proteína	Espécie	Peptídeos únicos	Massa Molecular (Da)	-logP	Termos GO associados a processos celulares
77748117	Unknown protein for MGC	<i>X. leavis</i>	1	24679	81,49	Organização de membrana, Transporte mediado por vesículas, Montagem de complexos proteicos
3694874	Prohormone convertase 1 precursor	<i>P. ridibundus</i>	2	82966	167,9	Processos de biossínteses, Maduração de proteínas
468457438	Full Vesicle trafficking protein SEC22b	<i>X. leavis</i>	1	24709	81,49	Organização de membrana, Transporte mediado por vesículas, Montagem de complexos proteicos
89515096	phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	<i>B. gargarizans</i>	1	21017	80,67	Processos do sistema imune, Marcação de proteínas, Morte celular, Processos de homeostases, Tradução de sinal, Processos de modificação de proteínas celulares, Resposta ao estresse
148226947	protein disulfide isomerase family A, member 3 precursor	<i>x. leavis</i>	2	56122	75,39	Processos do sistema imune, Marcação de proteínas, Morte celular, Processos de homeostases, Tradução de sinal, Processos de modificação de proteínas celulares, Resposta ao estresse
28302197	Grp58 prov protein	<i>x. leavis</i>	2	56122	75,39	Processos do sistema imune, Marcação de proteínas, Morte celular, Processos de homeostases, Tradução de sinal, Processos de modificação de proteínas celulares, Resposta ao estresse
49119195	MGC80429 protein	<i>x. leavis</i>	1	15656	51,58	Processos de modificação de proteínas celulares
166157874	FK506 binding protein 2	<i>x. tropicalis</i>	1	15704	51,58	Processos de modificação de proteínas celulares
27694894	MGC53657 protein	<i>x. leavis</i>	1	15724	51,58	Processos de modificação de proteínas celulares
163916424	LOC100135178 protein	<i>x. tropicalis</i>	1	15704	51,58	Processos de modificação de proteínas celulares
512810630	neuroendocrine convertase 1 isoform X1	<i>x. tropicalis</i>	1	83531	127,40	Processos de biossínteses, Maduração de proteínas
148225919	FK506 binding protein 2, 13kDa precursor	<i>x. tropicalis</i>	1	15724	51,58	Processos de modificação de proteínas celulares

89268685	transmembrane emp24 protein tra	<i>x. tropicalis</i>	1	24988	45,44	Processos de catabolismo, Organização de membrana, Transporte mediado por vesículas, Montagem de complexos proteicos
28374307	Cmpk1 protein		1	25962	41,45	Processos metabólicos de moléculas pequenas, Processos de biossínteses

As identificações foram feitas pelo software PEAKS e a predição das proteínas com peptídeo sinal foram realizadas pelo servidor SignalP 4.1

5.3.9. Predição de proteínas com peptídeos sinal secretadas pela via não clássica usando o servidor SecretomeP 2.0

A Tabela 8 descreve a proteína secretada pela via não clássica, que não apresentou um peptídeo sinal e os termos GO associados.

Tabela 8. Predição de proteínas com peptídeos sinal secretadas pela via não clássica presentes na secreção cutânea de *D. columbianus*

Número de acesso GI	Nome da proteína	Espécie	Peptídeos únicos	Massa Molecular (Da)	-logP	Termos GO associados a processos celulares
122034	Histona H2B 1.2	<i>X. leavis</i>	9	13906	157,5	Resposta imune inata, Resposta humoral antibacteriana, Formação do nucleosome, Resposta contra bactérias gram-positivas

As identificações foram feitas pelo software PEAKS e a predição das proteínas com peptídeo sinal foram realizadas pelo servidor SecretomeP 2.0.

5.2.10. Identificação das hidrolases presentes na secreção cutânea de *D. columbianus*

Com o objetivo de identificar as proteínas com atividade catalítica que poderiam estar associadas ao processamento pós-traducional de maturação de peptídeos por proteólise, foi realizada inicialmente uma análise GO. Na figura 21 pode-se observar que dentro das 6 classes de enzimas, as proteínas que pertencem a classe hidrolase são as mais abundantes.

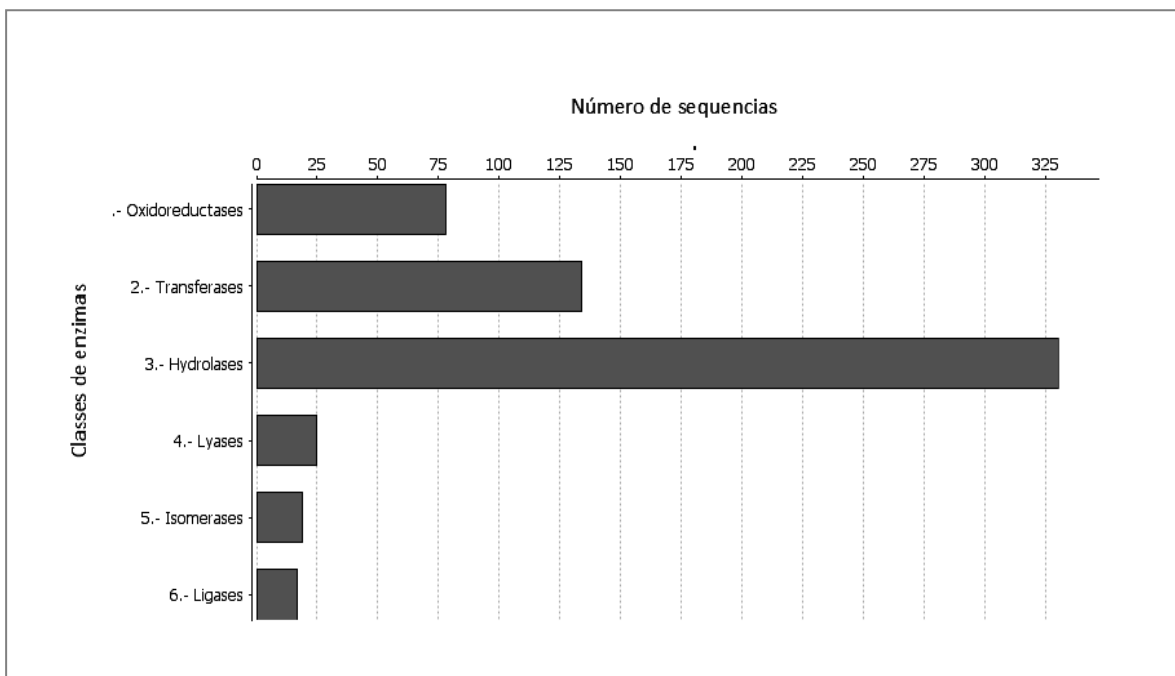


Figura 21. Distribuição das classes de enzimas anotadas com termos GO, presentes na secreção cutânea de *D. columbianus*.

Para verificar a presença de atividade proteolítica na secreção cutânea foi realizada uma análise funcional zimográfica com a secreção bruta em géis de eletroforese com gelatina em condição não desnaturante. A proteólise foi observada como uma mancha branca ao longo do gel, o que poderia indicar a presença de várias peptidases com diferentes massas moleculares ou a hidrólises enzimática do substrato durante a corrida eletroforética. No entanto, no zimograma a faixa entre 50 kDa e 70 kDa foi a que apresentou a maior atividade gelatinolítica (figura 22).

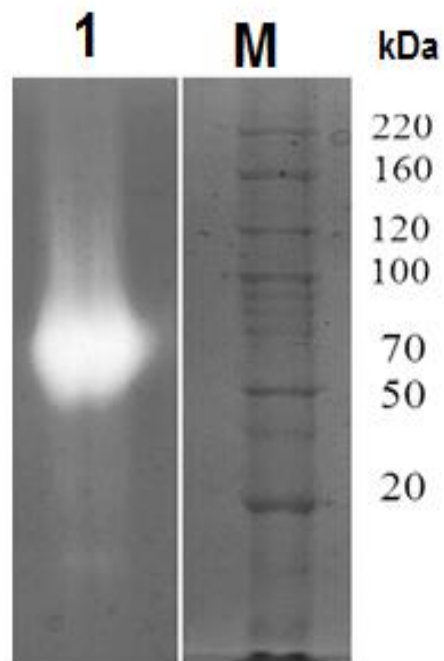


Figura 22. Atividade gelatinolítica da secreção cutânea de *D. columbianus*, 1: 50 µg de secreção seca e M: marcador de peso molecular (ColorBurst da SIGMA) em gel SDS-PAGE 8 % co-polimerizado com 0,1% (p/v) de gelatina. As bandas brancas são regiões com atividade. O gel foi corado com azul de Coomassie.

Para a identificação por espectrometria de massas das hidrolases presentes na faixa com atividade gelatinolítica, realizou-se um novo gel SDS-PAGE 10 % (sem gelatina) com 25 µg de secreção total. A amostra foi preparada em DMSO 10% e sem prévio aquecimento (mantendo as mesmas condições de preparo da amostra no ensaio de zimografia). Neste novo gel foram determinados e analisados três intervalos de massa molecular: [I: 97-66 kDa] [II: 66-45 kDa] e [III: 30-20 kDa] que continham a faixa de interesse (figura 23).

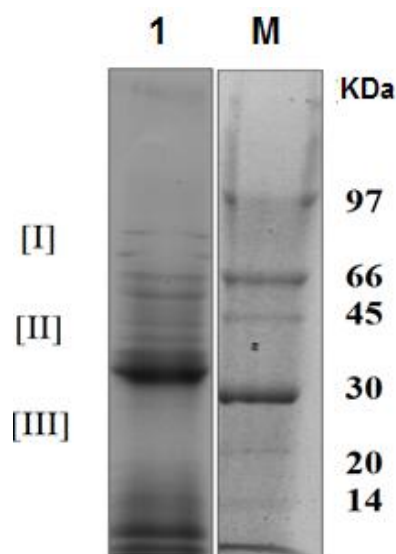


Figura 23. Gel SDS-PAGE 10% da secreção cutânea de *D. columbianus* corado com azul de Coomassie R-350. Foram determinados três intervalos de massa molecular, [I: 97-66 kDa] [II:66-30 kDa] e [III:30-20 kDa] que contém a faixa que apresentou atividade gelatinolítica.

As frações proteicas correspondentes aos intervalos I, II e III foram extraídas do gel e processadas no espectrômetro de massas tipo Orbitrap Elite™ da Thermo Scientific. Três proteínas conhecidas com atividade proteásica foram identificadas (Tabela 9). Essas enzimas estão categorizadas no GO nos processos de biossíntese, maturação de proteínas e processos de modificação de proteínas celulares.

Tabela 9. Hidrolases identificadas no gel SDS-PAGE 10% da secreção cutânea de *D. columbianus*.

GI	Nome da proteína	Espécie	Peptídeos únicos	Massa Molecular (Da)	-logP	Termos GO associados a processos celulares
512810630	neuroendocrine convertase 1 isoform X1	<i>X. tropicalis</i>	1	83531	127,40	Processos de biossínteses, Maturação de proteínas
3694874	Prohormone convertase 1 precursor	<i>P. ridibundus</i>	2	82966	167,9	Processos de biossínteses, Maturação de proteínas
12843541	calpain-8-like isoform X1	<i>X. tropicalis</i>	1	79356	97,86	Processos de modificação de proteínas celulares

As identificações foram feitas pelo software PEAKS.

5.2.11. Identificação de peptídeos endógenos presentes na secreção cutânea de *D. columbianus*

Por ser o primeiro estudo bioquímico da secreção cutânea dessa rã, realizamos um estudo abrangente peptidômico segundo o fluxograma apresentado na figura 24. Este estudo completamente novo permite a análise dos peptídeos não trípticos sequenciados *de novo*, com objetivo de identificar tanto AMPs como sequências não reportadas.

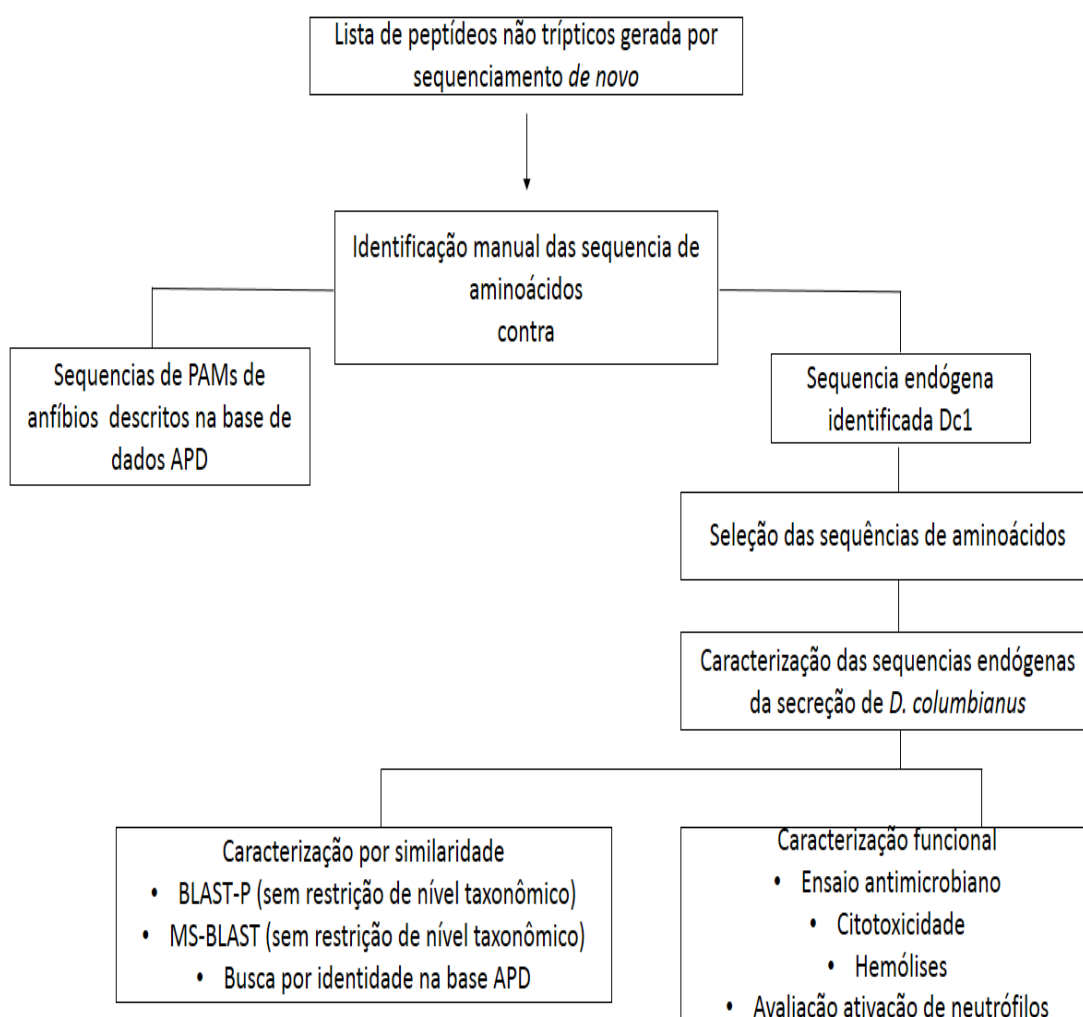


Figura 24. Fluxograma Identificação de peptídeos endógenos presentes na secreção cutânea de *D. columbianus*.

5.2.11.1. Busca por identidade de AMPs com atividade antimicrobiana descrita

Em uma primeira abordagem e com o objetivo de identificar peptídeos antimicrobianos descritos na secreção cutânea de *D. columbianus* foi realizada uma busca manual das 29 sequências (Tabela 10) com atividade antimicrobiana descrita, na lista de peptídeos não trípticos obtida. As sequências alvo foram escolhidas a partir das 1017 sequências de AMPs de anfíbios reportadas na base de dados ADP (da Universidade de Nebraska Medical Center) e seguindo a lista de AMPs isolados de pele de anfíbios de diferentes famílias, reportada por Conlon *et al.* (Conlon, 2004). Não foram encontradas sequências não trípticas idênticas às sequências já reportadas.

Tabela 10. Lista de AMPs com atividade antimicrobiana descrita.

AMPs	Sequências
Dermaseptin-B2	GLWSKIKEVKGEEAAKAAAKAAGKAALGAVSEAV
Dermaseptin-s1	ALWKTMLKKLGTMALLHAGKAALGAAADTISQGTQ
Aurein 1.1	GLFDIIKKIAESI
Aurein 1.2	GLFDIIKKIAESF
Aurein 2.1	GLLDIVKKVVGAFGSL
Aurein 2.2	GLFDIVKKVVGALGSL
Aurein 2.4	GLFDIVKKVVGTLAGL
Aurein 2.3	GLFDIVKKVVGAIKSL
Bombinin	GIGALSAKGALKGLAKGLAEHFAN
Bombinin H1	IIGPVLGMVGSALGGLLKKI
Bombinin H4	LIGPVLGLVGSALGGLLKKI
Maximin 1	GIGTKILGGVKTALKGALKELASTYVN
Brevinin-1	FLPVLGIAAKVVPALFCKITKCC
Brevinin-2	GLLDSLKGF AATAGKGV LQSL LSTASCKLAKTC
Esculentin-1	GIFSKLGRKKIKNLLISGLKNVKGVEGMDVVRTGIDIAGCKIKGEC
Temporin A	FLPLIGRVLGIL
Temporin B	LLPIVGNLLKSL
Temporin C	LLPILGNLLNGLL
Temporin E	VLPIIGNLLNSLL
Temporin F	FLPLIGKVLGIL
Temporin G	FLPLIGKVLGIL
Magainin-1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS
Magainin-2	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMNS

Uperin-3.6	GVIDAAKKVVNVLKNLF.NH2
Buforin-1	AGR GKQGGKVR AKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGN Y
Buforin-2	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK
Ranalexin	FLGGLIKIVPAMICAVTKKC
Ranatuerin-1	SMLSVLKNLGKVG LGFVACKINKQC
Caerin-1.1	GLLSVLGSAKHVLP HVVPVIAEHL.NH2

5.2.11.2. Identificação das sequências com similaridade à Dc 1

Através de uma busca manual na lista de peptídeos não trípticos foram identificadas 18 sequências peptídicas, nomeadas como Dc 2, Dc 3, Dc 4 Dc 5, Dc 6, Dc 7, Dc 8, Dc 9, Dc 10, Dc 11, Dc 12, Dc 13, Dc 14, Dc 15, Dc 16, Dc 17, Dc 18 e Dc19. A figura 24 apresenta o alinhamento das sequências encontradas junto à sequência nativa Dc 1. Em amarelo estão ressaltadas as regiões conservadas.

Dc19	N	L	L	N	N	A	L	G	V	T	K	-	-	-	-	-	-
Dc2	-	-	-	-	-	W	L	G	T	V	N	G	L	L	G	S	R
Dc3	N	L	L	N	D	A	L	G	-	-	-	-	L	S	G	R	-
Dc4	-	-	-	-	-	-	-	-	T	V	N	G	L	L	G	S	R
Dc5	-	-	-	D	N	A	L	G	T	V	N	G	L	L	G	S	R
Dc6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	N	G	L	L	G	S	R
Dc7	-	-	L	N	N	A	L	G	T	V	N	G	L	L	G	R	S
Dc8	N	L	L	N	N	A	L	G	T	V	N	G	L	L	G	N	K
Dc9	-	-	-	-	-	A	L	G	T	V	D	G	L	L	G	S	R
Dc10	Q	V	L	N	D	A	L	G	T	V	N	G	L	L	G	R	-
Dc11	L	N	L	N	E	A	L	G	T	V	N	G	L	L	G	N	K
Dc12	A	R	L	N	D	A	L	G	-	-	N	G	L	L	G	R	S
Dc1	N	L	L	N	D	A	L	G	T	V	N	G	L	L	G	R	S
Dc13	-	L	L	N	N	A	L	G	T	V	N	G	L	L	G	N	K
Dc14	N	L	L	N	D	A	L	G	T	V	N	G	L	L	G	R	S
Dc15	A	R	L	N	D	A	L	G	T	V	N	G	L	L	G	N	K
Dc16	N	L	L	N	D	A	L	G	T	V	N	G	L	L	G	D	K
Dc17	-	W	L	N	D	A	L	G	T	V	N	G	L	L	A	T	K
Dc18	N	L	L	N	N	A	L	Q	L	-	-	-	L	A	P	A	R

Figura 24. Alinhamento múltiplo das sequências não trípticas da secreção cutânea de *D. columbianus*. O alinhamento foi realizado usando o programa MEGA 7.

5.2.11.3. Um novo grupo de peptídeos: as dendropsofinas

Com a finalidade de determinar se as sequências não trípticas correspondiam à sequências endógenas do animal, foi realizada uma comparação por similaridade das sequências endógenas contra o banco de dados da NCBI *non-redundant*, sem restrição de nível taxonômico, usando os programas BLAST-P e MS-BLAST (esse último sendo especializado na identificação por similaridade de sequências pequenas de aminoácidos). Não foi encontrada sequência com homologia ou similaridade estatisticamente significativa. Igualmente a busca manual por identidade usando o banco de dados APD não reportou peptídeos antimicrobianos com similaridade maior que 60% com respeito às sequências não trípticas.

A sequência com maior similaridade (valor de 54,6%) reportada na base de dados APD, com respeito às sequências não trípticas foi a Frenatina 1. Com o objetivo de identificar se os peptídeos achados diferenciava-se da sequência reportada com maior similaridade foi feito um dendrograma, inferido usando o método baseado em distância UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages*) (figura 26).

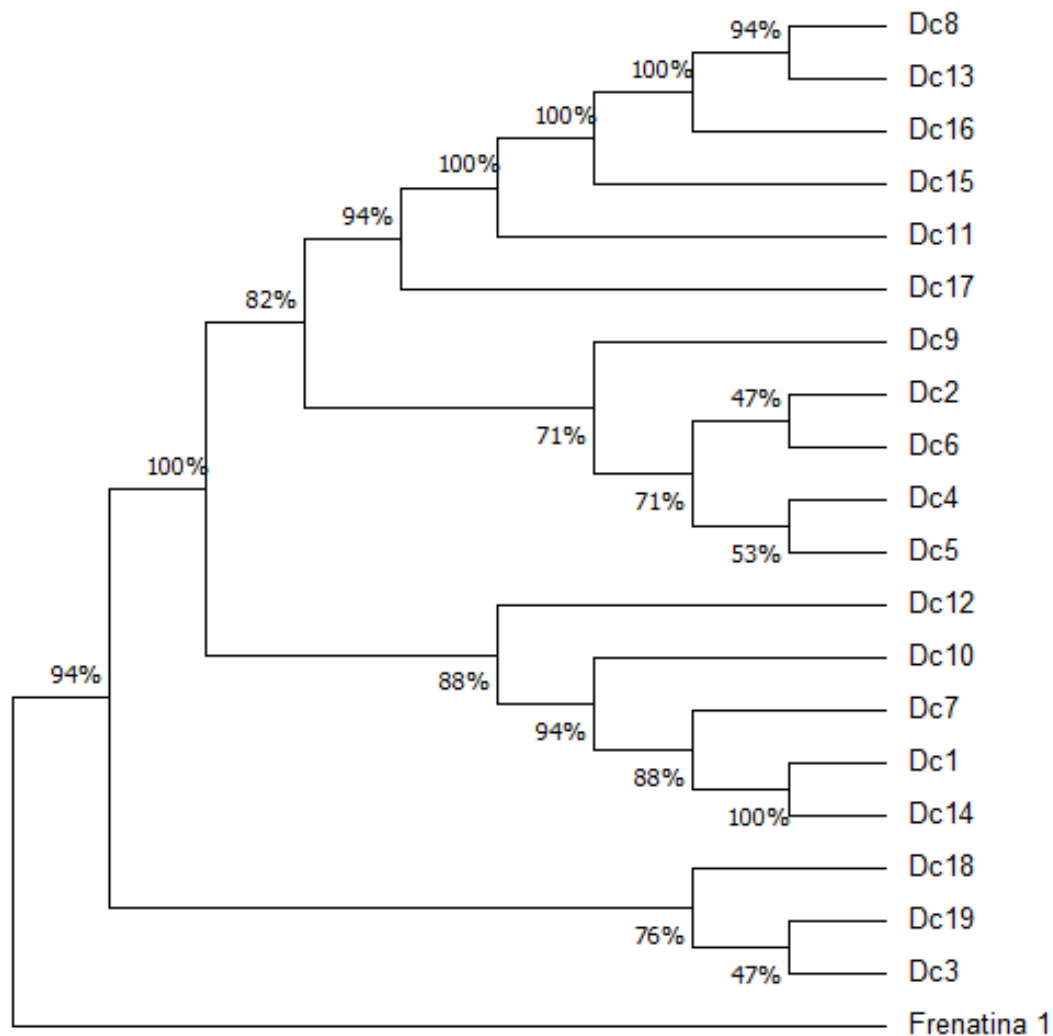


Figura 26. Dendrograma inferido usando o método UPGMA das sequências endógenas de *D. columbianus* e a Frenatina 1. São considerados nós consistentes com uma porcentagem maior que 90%. O dendrograma foi realizado usando o programa MEGA 7.

Em função dos resultados obtidos, estabeleceu-se que as sequências não trípticas reportadas neste trabalho são um novo grupo de peptídeos endógenos presentes na secreção cutânea de *D. columbianus*, nomeados como Dendropsifinas.

5.2.11.4. Caracterização funcional das Dendropsofinas Dc 2, Dc 7, Dc 13, Dc 17, Dc 18 e Dc 19

Foram selecionadas manualmente para sínteses e posterior avaliação contra microrganismos Dc2, Dc7, DC13, Dc 17, Dc 18 e Dc 19. Foram realizados os testes com a bactéria Gram-negativa *E. coli*, a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e o fungo *C. albicans*. Nenhum desses compostos proteicos apresentou atividade antimicrobiana nas condições testadas a uma concentração de 128 µM.

5.2.11.5. Avaliação da ativação de neutrófilos

No segundo momento, procuramos saber se esse novo grupo de peptídeos poderia influenciar a resposta imune por um mecanismo de ativação/desativação de neutrófilos. A ativação celular pelos peptídeos Dc 2, Dc 7, Dc 13, Dc 17, Dc 18 e Dc 19 foi testada mediante o ensaio colorimétrico de teste do nitroazul de tetrazólio (em inglês *Nitro-blue tetrazolium test*, NBT). O teste NBT tem como princípio a redução do tetrazólio (solúvel em água e incoloro) em formazan (insolúvel em água e de cor azul), na presença de superóxido produzido pelos neutrófilos ativados, a característica principal é a formação do formazan no citoplasma.

No gráfico da figura 27 pode-se observar que os peptídeos Dc 2 e Dc 18 apresentaram atividade ativadora superior ao controle positivo, fMLP, enquanto os outros peptídeos apresentaram valores de absorbância menores ou próximo ao controle negativo. A maior atividade foi observada nos neutrófilos tratados com o peptídeo Dc 18 a 15 µg/mL.

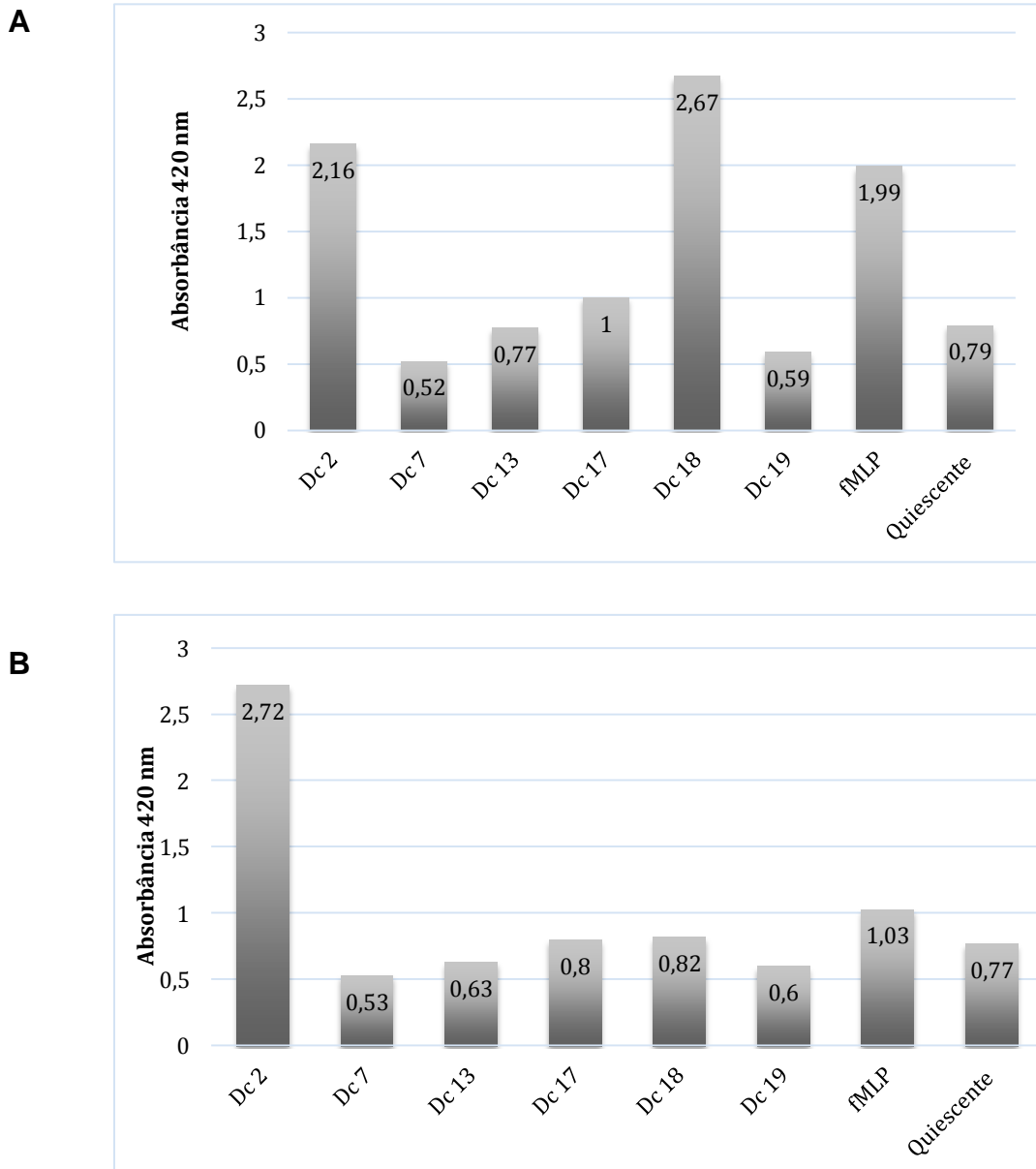


Figura 27. Avaliação da ativação dos neutrófilos tratados com os peptídeos Dc 2, Dc 7, Dc 13, Dc 17, Dc 18 e Dc 19. Duas concentrações de peptídeos foram testadas 15 µg/mL (**A**) e 5 µg/mL (**B**) mediante ensaio colorimétrico de NBT. Controle positivo: o peptídeo fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina); controle negativo: tampão HBSS (neutrófilos não estimulados).

As fotografias mostram uma clara diferença entre os neutrófilos não estimulados e tratados com o peptídeos D c2 e Dc 18.

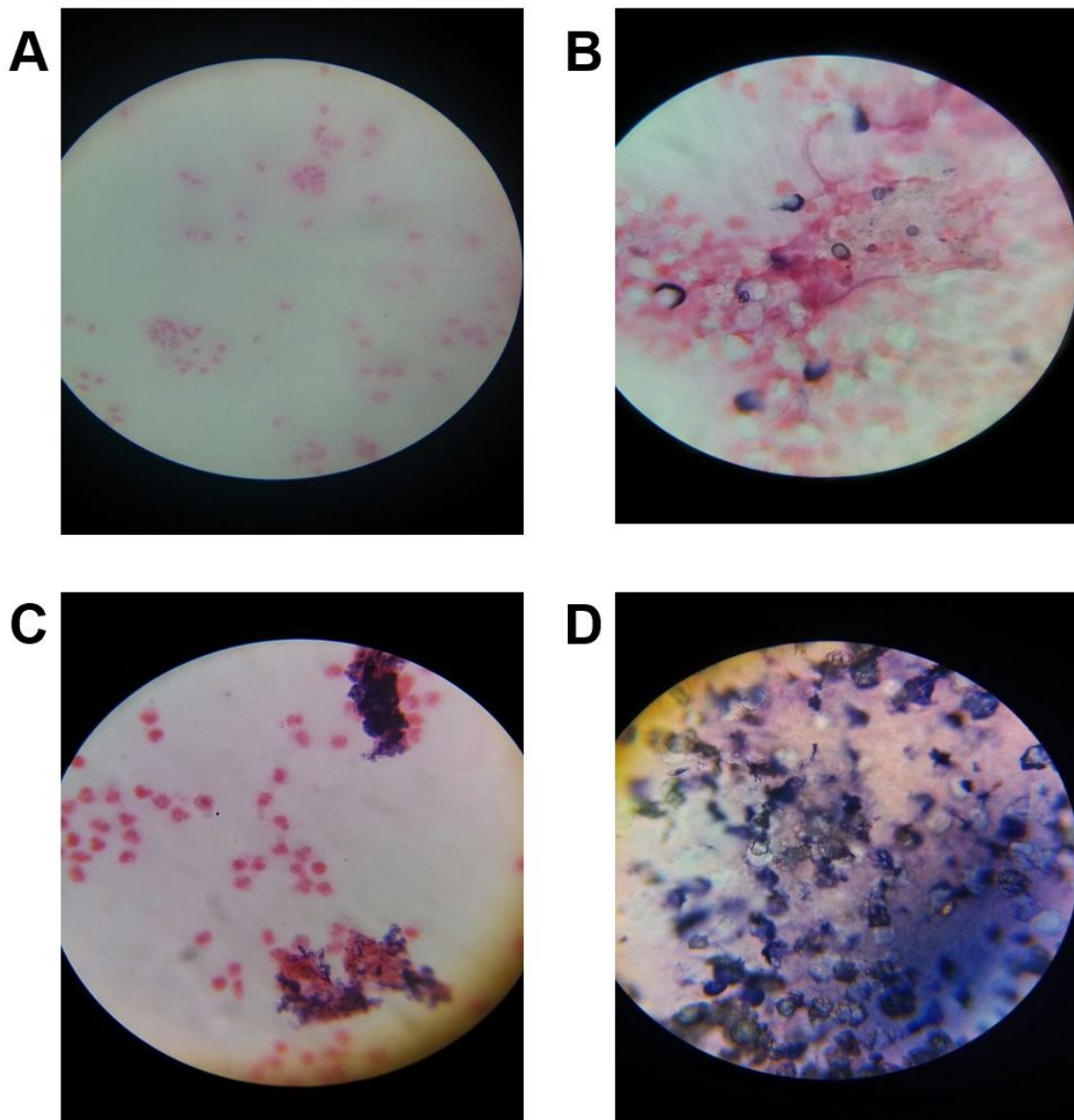


Figura 27. Fotos de lamina de neutrófilos do ensaio NBT. **(A)** neutrófilos não estimulados, **(B)** ativados com fMLP, **(C)** tratado com o peptídeo Dc 2 a 15 µg/mL, **(D)** tratado com o peptídeo Dc 18 a 15 µg/mL.

6. Discussão

6.1. Etapa I, busca de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de *D. columbianus*

A Colômbia é um dos países com maior diversidade de anfíbios. Até o momento, já foram caracterizadas 800 espécies; o que representa 10% das espécies descritas no mundo (Faivovich et al., 2009). A família Hylidae é o segundo grupo com maior abundância no país, com 142 espécies descritas e o gênero *Dendrosophus* se encontra amplamente distribuído no sul do território colombiano (Castro-Herrera & Vargas-Salinas, 2008). A espécie *D. columbianus* foi descrita ao nível taxonômico e ecológico, ressaltando seu alto grau de adaptação a ecossistemas antrópicos, o que poderia estar associado à composição química de sua pele (Castro-Herrera & Vargas-Salinas, 2008).

O presente trabalho é o primeiro estudo dedicado à caracterização bioquímica da secreção cutânea de *D. columbianus*. Empregando-se técnicas de cromatografia líquida em fase reversa, a secreção de *D. columbianus* foi fracionada e foram obtidas 93 frações cromatográficas que, após análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, contendo, pelo menos, 108 compostos de origem peptídico cujas massas moleculares se encontram no intervalo entre 1000-12000 Da. O perfil peptídico geral da secreção após fracionamento por RP-HPLC evidenciou uma baixa diversidade de compostos peptídicos em comparação aos perfis cromatográficos reportados para outros hílideos (Castro, Matsushita, Sebben, Sousa, & Fontes, 2005; Conlon et al., 2007), como é o caso da secreção cutânea da *Phyllomedusa distincta*, que apresentou duas frações cromatográficas ativas contra bactérias, das quais foram isolados cinco AMPs (Batista et al., 1999).

O ensaio de varredura para detecção de atividade antibacteriana nas 93 frações levou à identificação de uma única fração com atividade antiproliferativa. A partir da fração com atividade antibacteriana foi isolado e caracterizado o peptídeo Dc 1. Dc 1 apresenta uma distribuição anfipática definida, onde os

resíduos de asparagina e ácido aspártico, carregados negativamente, estão localizados na extremidade N-terminal enquanto os resíduos de lisina com carga positiva se encontram na extremidade C-terminal, esta estrutura adota geralmente uma estrutura estável de α -hélice, como se pode observar na projeção (figura 10). Do mesmo modo que a caerina-1, Dc 1 é um peptídeo anfipático, helicoidal, com uma moderada atividade antimicrobiana. Os autores sugerem que a presença do ácido aspártico, um aminoácido negativo, poderia influir na interação eletrostática do peptídeo com a membrana celular, o que refletiria na atividade bacteriana (Tossi et al., 2000).

Com o objetivo de otimizar a atividade biológica do peptídeo selvagem, foram desenhados dois análogos denominados Dc 1.1 e Dc 1.2. A substituição D5K feita em Dc 1.1 conduz a um aumento de duas vezes na sua carga líquida (+2), enquanto no caso de Dc 1.2 as múltiplas substituições (N4K, D5S, G8K, G12K, G15A e R16A) junto à amidação da extremidade carboxi-terminal geraram uma carga líquida igual a +4.

Neste trabalho foi de particular interesse realizar modificações que mantivessem a estrutura anfipática da sequência nativa. A construção dos análogos foi baseada principalmente na adição de lisina(s) na face polar do peptídeo, o que permitiu tanto o incremento da carga líquida como o aumento do espectro antimicrobiano. A lisina é um resíduo polar de carga líquida positiva que facilita a formação de estruturas helicoidais (Javadpour et al., 1996). Estudos prévios mostraram que peptídeos curtos podem ser melhorados com a adição de lisinas que favorece a interação iônica entre o AMP e o patógeno (Ahmad et al.).

Existem numerosos tipos de modificações que podem ser feitas as sequências nativas. Por exemplo, nas cecropinas e magaininas foram avaliadas modificações como: deleção e adição de um ou vários resíduos de aminoácidos, substituição de aminoácidos específicos, adição de fragmentos de outros peptídeos e amidação da extremidade carboxi-terminal, entre outras (Houghten et al., 1991; Pérez-Payá, Houghten, & Blondelle, 1995). As substituições específicas

podem resultar no incremento do efeito antimicrobiano ou na perda total da atividade biológica. Em alguns casos são necessárias mais de duas modificações para otimizar um determinado peptídeo. Os produtos finais tendem a ser análogos com uma maior cationicidade e anfipaticidade. No caso de magainina, o análogo MSI 78 foi obtido mediante o aumento da cationicidade e helicidade da sequência nativa (Houghten et al., 1991).

Outra modificação frequente no desenho de peptídeos antimicrobianos de anfíbios é a amidação da extremidade C-terminal que ocorre naturalmente nas dermasseptinas e polifemusinas (Conlon et al., 2004). Esta variação pode evitar a clivagem por carboxipeptidases, além de fornecer uma ligação de hidrogênio extra para a formação de α -hélices (Andreu & Rivas, 1998a). A correlação entre amidação e atividade biológica ainda não é clara, mas existem casos de análogos como a dermasseptina-(1-18)-NH₂, onde a amidação da extremidade C-terminal significou um aumento da atividade antimicrobiana (Mor & Nicolas, 1994).

Os resultados da análise por DC indicam a tendência dos três peptídeos a adotarem estrutura α -helicoidal em TFE, como pode ser observado nos padrões α -helicoidal que são detectados pelos sinais dicróicos negativos perto de 207 e 222 nm (figura 11). A estabilidade térmica em TFE a 30% (v/v) foi avaliada em temperaturas entre 25 °C e 95 °C. A figura 12 apresenta a ruptura da estrutura helicoidal, representada na redução do sinal dicróico perto a 203 nm. Todos os peptídeos voltaram à conformação da hélice inicial quando foram renaturados (figura 12). No entanto, Dc 1.2 apresentou maior grau helicoidal e estabilidade térmica em comparação com Dc 1 e Dc 1.1, o que poderia estar relacionado com o aumento da atividade antimicrobiana.

Os peptídeos Dc 1 e Dc 1.1 mostraram atividade antimicrobiana semelhante sobre *E. coli* (MIC = 64 μ M) e *S. aureus* (MIC = 32 μ M), enquanto Dc 1.2 exibiu atividade antimicrobiana contra todas as bactérias patogênicas testadas: *E. coli* (MIC = 32 μ M), *P. aeruginosa* (MIC = 64 μ M), *K. pneumonia* (MIC = 64 μ M), *S.*

epidermidis (MIC = 128 μ M) e *S. aureus* (MIC = 64 μ M) (Tabela 4). Dc 1.1 foi o único peptídeo que apresentou atividade anti-protozoária contra *G. lamblia* (22,17 μ M).

Dc 1.2 contém oito resíduos hidrofóbicos localizados no mesmo lado da projeção anfipática (figura 10), a carga positiva foi aumentada juntamente com o número total de resíduos hidrofóbicos, melhorando levemente a atividade contra quase todas as capas bacterianas testadas. As modificações de incremento de carga líquida mantendo a hidrofobicidade, como no caso de Dc 1.2, têm sido correlacionadas com a capacidade de permeabilizar as bicamadas lipídicas negativas em patógenos (Asthana, 2014).

O aumento na carga líquida do peptídeo pode favorecer na interação iônica entre o peptídeo com as diferentes membranas patogênicas. Em um primeiro momento, existe uma interação eletrostática de natureza iônica entre o peptídeo e a bicamada lipídica, seguida da inserção do AMP ao interior da membrana mediante forças hidrofóbicas (Epanand & Vogel, 1999). Zhao *et al.* encontraram que a adição de resíduos positivos e hidrofóbicos em posições específicas do peptídeo Bac2A resultavam numa diminuição do MIC (Zhao, Zhao, Liang, Zhang, & Zheng). Este comportamento é devido ao fato de que incrementos na cationicidade da molécula pode diminuir a barreira de energia livre que o peptídeo necessita para atravessar a fase hidrofóbica da bicamada lipídica

Os resultados referentes à atividade antimicrobiana dos análogos não foi o esperado, no entanto, além das características químicas do peptídeo, a atividade antimicrobiana depende de outros fatores como a resistência bacteriana e mecanismo de defesa intrínseco a cada espécie (Conlon *et al.*, 2004). Por exemplo, em bactérias Gram-negativas como *E. coli* a incorporação de aminoarabinose é um mecanismo de resistência frequente, que gera a repulsão eletrostática do AMP, mediante a incorporação de uma carga positiva na

superfície do patógeno (Li et al., 2007) o que é realmente um enorme desafio na construção de peptídeos realmente eficientes.

Conlon e colaboradores afirmam que esta distribuição dos AMPs entre as diferentes famílias de anuros é esporádica, como um caractere evolutivo adquirido, e pode-se considerar uma vantagem exclusiva pra cada espécie (Conlon, Iwamuro, & King, 2009). A moderada atividade antimicrobiana exibida pelo peptídeo selvagem Dc 1 poderia corresponder as características evolutivas da subfamília. Como é o caso das hiposinas, peptídeos isolados de hílídeos que não apresentam até agora atividade biológica descrita (Thompson, Bjourson, Orr, Shaw, & McClean, 2007).

Finalmente, as concentrações necessárias dos peptídeos para inibir completamente o crescimento bacteriano são inferiores aos valores de IC₅₀ observados no ensaio de citotoxicidade, o que significa que os peptídeos Dc 1, Dc 1.1 e Dc 1.2 exibiram uma seletividade por membranas patogênicas. Este resultado é interessante para o desenvolvimento de análogos (Powell, Catranis, & Maynard, 1995).

6.2. Etapa II, análises peptidômica e proteômica da secreção cutânea de *D. columbianus* por *shotgun*

As análises proteômicas das secreções cutâneas de anuro têm focado na procura de AMPs (Balderrama et al., 2011; Wang et al., 2007), sendo poucos os estudos que descrevem de forma global as proteínas presentes nestas amostras complexas. Em 2016, Dahham *et al.*, usando SDS-PAGE seguido de LC-MS/MS conseguiram identificar na secreção de *Bufo asper* quase de 50 proteínas entre 20 e 250 kDa. Os autores ressaltaram a presença de histonas, actina e proteínas de choque térmico (Dahham et al., 2016).

Neste mesmo ano, Valderrama *et al.* identificaram as proteínas presentes na secreção de *Lithobates spectabilis*. Utilizando SDS-PAGE seguido de LC-

MS/MS o maior número de proteínas identificadas foi de 253, usando inibidor de proteases. Esse trabalho ressalta a detecção de proteases, tanto em secreção bruta como em secreção com inibidores, o que poderia estar relacionado com o processamento de peptídeos antimicrobianos (Demesa-Balderrama et al., 2016).

No presente trabalho foram identificadas 1231 proteínas, o maior número de proteínas já identificadas em secreção cutâneas de anfíbios. Em geral, a partir das proteínas associadas ao sistema de defesa, foi possível a identificação de 19 proteínas envolvidas na resposta contra bactérias, resposta contra fungos e resposta contra outros microrganismos.

O sistema de defesa de anfíbios contra patógenos é composto tanto de mecanismos da resposta imune inata como adaptativa, que são considerados como caracteres filogenéticos conservados nos vertebrados (Andreu & Rivas, 1998b). O sistema imune inato fornece proteção rápida e inespecífica à medida que a resposta imune adaptativa se desenvolve. Esta primeira linha de defesa inclui células fagocíticas e peptídeos antimicrobianos que atuam contra os microrganismos. Na pele de *Xenopus laevis* e *Rana pipiens* já foram encontradas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade ou MHC (do inglês *major histocompatibility Complex*) de classe II de células de morfologia dentrítica (Rollins-Smith, 2001). Enquanto em rãs do gênero *phyllomedusa* por exemplo, tem-se isolado AMPs com potente ação bactericida (Leite et al., 2005). Outros mecanismos de defesa inata relatados são a ativação do complexo de ataque à membrana (MAC) e a ativação das células exterminadoras naturais (NK- do inglês *Natural Killer*) (Rollins-Smith, 2001).

Estudos acerca do sistema imune adaptativo em anfíbios estão descritos unicamente para *Xenopus laevis* e *Ambystoma mexicanum*, nos quais foram observados a produção de citosinas e anticorpos (Rollins-Smith, 2001).

Kawasaki et al. demonstraram que *Rhacophorus schlegelii*, um representante da família Rhacophoridae, não sintetiza peptídeos antimicrobianos alfa-helicoidais

anfipáticos, da mesma forma que outras espécies das famílias Bufonidae, Microhylidae e Pelobatidae (Kawasaki, Isaacson, Iwamuro, & Conlon, 2003). Nesta perspectiva surge a pergunta: quais seriam as estratégias de defesa alternativa destes grupos? Por exemplo, *Dyscophus guineti* (Microhylidae) secreta um inibidor de tripsina com atividade antimicrobiana (Conlon & Kim, 2000).

Nesta análise proteômica poderia evidenciar que as histonas 1.2, 2 e 3 estão associadas à a resposta de defesa de *D. columbianus*, como foram identificadas na rã *Rhacophorus schlegelii* (Kawasaki et al., 2003). Os autores sugerem que a morte celular gerada por invasão de patógenos ou por injúrias pode induzir a liberação de histonas que poderiam ter atividade antimicrobiana, como no peixe *Ictalurus punctatus*, onde a histona 2B é ativa contra fungos patogênicos (Robinette et al., 1998).

Além das histonas intactas, fragmentos destas proteínas com atividade antimicrobiana foram isolados dos tecidos de peixes e anuros. Um fragmento da parassina I, que apresenta os resíduos 1-19 da histona H2A, é liberado em resposta à lesão epidérmica no peixe *Parasilurus asotus* (I. Y. Park, Park, Kim, & Kim, 1998). Em anfíbios, foi identificado no extrato de tecido estomacal do sapo *Bufo bufo gargarizans* um potente peptídeo antimicrobiano, buforin I, que conserva os resíduos 1-39 da histona H2A (Kim, Park, Kim, & Kim, 1996).

Outra proteína identificada na secreção cutânea de *D. columbianus* e descrita em anuros, é a anexina A3 (ANXA3). As anexinas formam uma grande família de proteínas de ligação ao cálcio que se associam aos fosfolípidos da membrana celular e estão envolvidas em vários processos celulares incluindo endocitose, exocitose e a organização da membrana citoesquelética (Meadows & Cleaver, 2015). ANXA1 humana é de todas a mais caracterizada, através das suas propriedades de ligação a fosfolípídeos por meio do cálcio, pode estar envolvida em processos patofisiológicos tais como anti-inflamatório, bactericida, antitumoral, inibição da proliferação celular, regulação da migração celular,

diferenciação e morte celular (Hayes, Shao, Bailly, & Moss, 2006; Samy et al., 2017). Em comparação, a função da ANXA3 é pouco estudada. Em embriões de rã ANXA3 tem um papel crítico durante a morfogênese de vasos sanguíneos iniciais (Meadows & Cleaver, 2015). A anexina A2 purificada da pele de *Bombina maxima* (Bm-ANXA2) possui uma atividade inibidora da agregação plaquetária (Zhang et al., 2010). As plaquetas podem interagir com agentes patogênicos expressando receptores de complemento ou proteínas bactericidas como a trombocidina (Yeaman, 2010), Na secreção de *D. columbianus* a ANXA3 poderia ter um papel imunomodulador (D'acquisto, Perretti, & Flower, 2008).

6.2.1. Mapeamento das proteínas associadas à resposta de defesa de *D. columbianus*

Segundo as análises GO, a secreção cutânea contendo células do epitélio de *D. columbianus* apresentam em sua maioria proteínas intracelulares relacionadas na resposta de defesa. Então, a pergunta a responder foi: quais seriam essas vias alternativas de defesa do animal, que não estão relacionadas diretamente com a produção de AMPs? Para tentar, responder tal questão, foi realizado um mapeamento das proteínas classificada no termo “resposta de defesa”. A análise apresenta um enriquecimento nos complexos proteicos do ribossoma, proteassoma e imunoproteassoma. As vias de formação do fagossomo e a endocitose.

Os proteassomas são grandes complexos proteicos que desempenham papéis cruciais na regulação de muitas vias celulares, degradando proteínas no citosol e no núcleo (Rechsteiner & Hill, 2005). O núcleo catalítico é o 20S, o qual é altamente conservado desde levedura até humanos; é um conjunto de 28 proteínas em forma de barril, que possui três sítios proteolíticos distintos (Rechsteiner & Hill, 2005). Tokumoto *et al.* isolaram o proteassoma 20S de ovos de *Xenopus levis* e *Bufo japonicus* e o associaram à embriogênese e

termotolerância de anuros (Takahashi, Tokumoto, & Ishikawa, 1994; Tokumoto & Ishikawa, 1993; Tokumoto et al., 1999).

Neste estudo foram mapeadas 14 proteínas do proteassoma 20S presentes na secreção cutânea de machos adultos de *D. columbianus* e associadas a termo GO proteínas de defesa. Junto a este resultado, foram mapeadas as imunossunidades $\beta 1i$, $\beta 2i$ (complexo endopeptidase) e $\beta 5i$ encarregadas da apresentação de antígenos, controle de estresse oxidativo, moduladoras do sistema imune mediante a produção de citosinas e estão envolvidas na diferenciação, sobrevivência e proliferação de linfócitos T (Angeles, Fung, & Luo, 2012).

As proteínas Rab 7 e Rab 11 encontradas nas vias de formação do fagossomo e a endocitose estão relacionadas com ativação do sistema imune inato. As proteínas Rab7 estão localizadas em endossomas tardios, lisossomas e fagossomas, regulando o tráfico vesicular desde o endossomo até o vacúolo. Igualmente participam na fusão de endossomos tardios e lisossomos em macrófagos (Mackiewicz & Wyroba, 2009). As vias específicas de tráfico de vesículas, dependente de RAB-11, protegem a membrana plasmática contra um ataque das toxinas formadoras de poros (PFTs) secretadas por bactérias patogênicas em *Caenorhabditis elegans* (Los et al., 2011).

Os resultados obtidos do mapeamento dos complexos proteicos do ribossoma, proteassoma e imunoproteassoma, mais as vias de formação do fagossomo e a endocitose permitiram evidenciar que os mecanismos de resposta imune inata e adaptativa estão ativos na secreção de *D. columbianus*.

A análise GO mostrou que a maioria das proteínas de defesa identificadas são intracelulares. Como encontramos essas proteínas na secreção cutânea, o passo subsequente era tentar identificar proteínas secretadas pelas vias clássica e não clássica pelo animal e qual função de defesa poderia exercer.

Duas enzimas foram identificadas como secretadas pela via clássica de secreção, a neuroendocrine convertase 1 e a prohormone convertase 1, descritas como envolvidas na produção de peptídeos, hormônios e ativação de outras proteínas (Ukena et al., 2003). Surpreendentemente, a histona H2B 1.2 descrita anteriormente como uma proteína com atividade antimicrobiana é predita como secretada pela via não clássica, o que reforça nossa hipótese que a via de resposta inata em *D. columbianus* está associada com secreção da histona na pele.

6.2.2. Identificação de hidrolases potencialmente responsáveis no processamento de peptídeos bioativos presentes na secreção cutânea de *D. columbianus*

Em base na predição da presença de enzimas secretadas, avaliamos atividade de hidrolase da secreção, com o objetivo de detectar proteases ativas que poderiam estar relacionadas ao processamento de peptídeos ativos. Posteriormente, foi realizada a identificação das enzimas calpain-8-like, neuroendocrine convertase 1 e prohormone convertase 1 utilizando LC-MS/MS.

A identificação de peptidases mediante zimografia em anuros não é um campo muito estudado (da Silva Libério et al., 2014b), não obstante estas proteínas são de particular interesse já que podem estar diretamente envolvidas no processamento e regulação de peptídeos antimicrobianos (Di Cera, 2009). Neste trabalho, o zimograma revelou a maior atividade gelatinolítica entre 50 kDa e 70 kDa. Por outro lado e com menor intensidade, foram observadas atividades de maior massa molecular. Esta ampla faixa de atividade pode ser o resultado da proteólise de várias enzimas com diferentes massas moleculares, o que poderia ter relação com a identificação das três proteínas presentes nas bandas do gel com atividade gelatinolítica (Tabela 9).

Calpains consistem de uma superfamília de proteases cisteínicas, cálcio dependentes. Estas peptidases são expressas em todos os eucariotos e estão envolvidas em vários processos celulares. As calpains têm uma atividade

proteolítica limitada, já que atuam, principalmente, na regulação das vias metabólicas [51]. No anuro *X. laevis* foi identificada a capn-8b, uma proteína homóloga da calpaina-8 de mamífero. Esta enzima é auxiliar na transdução do sinal da apoptose e está envolvida nos processos de gastrulação e neurulação na embriogênese [51].

Em anuros, as prohormone convertases são serino-peptidases envolvidas no processamento de peptídeos biotivos presentes nas glândulas granulares, que estão relacionados com a resposta imunológica e pigmentação da pele [52]. Estas enzimas são de especial interesse porque parecem estar relacionadas com a resposta imune em alguns animais. Em 2014, Xiao *et al.* [53] investigaram a expressão diferencial de proteínas na *Rana dybowskii*, em resposta à exposição a *S. aureus* e *E. coli*. Eles identificaram a peptidase prohormone convertase 1 na secreção após exposição a estas bactérias. Igualmente, foi reportado que em *Anopheles gambiae* (vetor da malária) existem alterações significativas na expressão de RNA mensageiros, da Prohormone convertase 1, quando são infectados por *Plasmodium falciparum* [54].

O papel imune destas proteínas ainda não está esclarecido mas a identificação delas como proteínas secretadas poderia ser associados ao processamento de peptídeos bioativos presentes em *D. columbianus*.

6.2.3. Identificação de peptídeos endógenos na secreção cutânea de *D. columbianus*

Neste trabalho foram desenvolvidas duas metodologias no preparo da amostra pela análise de LC-MS/MS, com o fim de atingir dois objetivos diferentes. A identificação das proteínas presentes na secreção foi a partir de peptídeos trípticos que foram identificados na base de dados da classe Amphibia da NCBI. No caso da análise peptídica, foi implementada uma nova estratégia metodológica tanto no preparo da amostra como na análise bioinformática. No primeiro caso, a amostra não foi tratada com enzimas com objetivo de obter só peptídeos

processados naturalmente na secreção, e para responder à procura de peptídeo endógenos, a análise inicia com a lista de peptídeos sequenciados *de novo* que não foram identificados. Esta abordagem proteômica é particularmente desenvolvida neste trabalho e se apresenta como uma alternativa na pesquisa de novas sequências.

A procura de peptídeos bioativos presentes na secreção de anuros a partir de dados LC-MS/MS foi recentemente utilizada (Demesa-Balderrama et al., 2016; Proaño-Bolaños et al., 2016). Na secreção de *D. columbianus* foram sequenciados 682 peptídeos não trípticos, o maior número até o momento, em comparação com *Lithobates spectabilis* com 59 peptídeos reportados *de novo* (Demesa-Balderrama et al., 2016). Atualmente não existe um software especializado na identificação de peptídeos antimicrobianos a partir de uma lista *de novo*, assim sendo, a procura é realizada manualmente e validada com os algoritmos clássicos de alinhamento (Proaño-Bolaños et al., 2016). No caso de *D. columbianus* foi realizada a busca manual por identidade de peptídeos antimicrobianos já reportados. Não encontramos sequências não trípticas idênticas às sequências já reportadas.

A partir da sequência de Dc 1 (NLLNDALGTVNGLLGRS) foi feita uma procura manual por identidade na lista de sequenciamento *de novo*. Foram encontradas 18 sequências peptídicas que apresentavam regiões de aminoácidos conservadas com respeito ao peptídeo nativo (Tabela 11). Para determinar se este grupo de peptídeos estava reportado pra outras classes além de amphibia, foi realizada uma comparação das sequências endógenas contra a base de dado da NCBI, sem restrição de nível taxonômico, não obstante nenhuma das sequências foi identificada.

A partir de uma análise de similaridade realizada na base de dados APD (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) determinou-se que a sequência de AMPs com maior similaridade (54,6%), com respeito às sequências encontradas em *D. columbianus* foi a frenatina 1. É um peptídeo antimicrobiano isolado de pele de

Litoria infrafrenata um hílideo com uma distribuição na Austrália e na Ásia (Rafferty, Waugh, Bowie, Wallace, & Tyler, 1996). No entanto, confirmamos que os peptídeos encontrados em *D. columbianus* conseguem se agrupar e diferir da frenatina 1. Com base neste resultado, denominamos as sequências como Dendropsofinas, um novo grupo de peptídeos identificados na secreção cutânea de *D. columbianus*. Resulta interessante ressaltar que 12 das 18 sequências encontradas terminam nos aminoácidos R ou K, resíduos que são clivados pelas serino-proteases, o que reforça nossa hipótese que as convertases identificadas poderiam estar relacionadas no processamento destes peptídeos em *D. columbianus*.

Das 18 sequências identificadas foram selecionadas para síntese e posterior caracterização funcional as sequências Dc 2, Dc 7, DC 13, Dc 17, Dc 18 e Dc 1. A distribuição anfipática dos resíduos de aminoácidos foi a característica principal da seleção dos peptídeos, com o fim de avaliar a possível atividade antimicrobiana. No entanto não apresentaram atividade contra os patógenos testados.

Por meio da análise peptidômica da secreção cutânea de *D. columbianus* não foi possível a detecção de peptídeos com atividade antimicrobiana significativa, mas motivados pelos estudos que determinam atividade imunomoduladora das frenatinas (Conlon et al., 2014) avaliamos a capacidade das dendropsofinas de ativar neutrófilos humanos.

Não está muito claro como os peptídeos de anuros podem regular o sistema imune. Chen e colaboradores encontraram que a temporina A induziu a migração de monócitos humanos, neutrófilos e macrófagos em concentrações inferiores a 50 µM (Q. Chen et al., 2004). Igualmente foi encontrado que as frenatinas isoladas de *S. lacteus* estimulam a produção de TNF, I-17 e Il-23 em macrófagos. Os autores levantam a hipótese de que existem AMPs que podem agir na estimulação de macrófagos hospedeiros, incrementando a produção

principalmente de citocinas pró-inflamatórias que ativam o sistema de imunidade adaptativa. Embora os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias possam levar a toxicidade, uma liberação controlada representaria uma possível aplicação terapêutica destes peptídeos isolados de secreções cutâneas de anfíbios, na modulação da resposta imune em humanos (Conlon et al., 2014).

Sabendo que a resposta imune mediada por neutrófilos é altamente conservada, a ativação de neutrófilos influenciada por Dc 7 e Dc 18 poderia estar associada a uma modulação do sistema imune em *D. columbianus*, uma vez que nos tecidos os neutrófilos matam microrganismos por agentes microbicidas liberados ou direcionando a ativação de vias de sinalização em outras células do sistema imune como os macrófagos, células dendríticas, células NK e linfócitos (Silva, 2016). Os neutrófilos são capazes de atrair monócitos e promover a diferenciação dos macrófagos dependendo da fase em que se encontra o processo inflamatório (Borregaard, 2010); adicionalmente a fagocitose de neutrófilos apoptóticos aumenta o recrutamento de leucócitos o que se traduz em um aumento da atividade antimicrobiana (Borregaard, 2010). Estas vias de defesa que são pouco estudadas em anuros, abrem novas perspectivas para o uso de moléculas alternativas na terapia de doenças infecciosas.

7. conclusões

Embora a descoberta de AMPs seja uma área amplamente estudada, o conhecimento da diversidade bioquímica presente nos anfíbios latino-americanos é um campo que precisa ser mais investigado. Dado os desafios farmacológicos atuais, como a alta resistência aos antibióticos convencionais, os novos AMPs naturais são ferramentas alternativas para o desenho de medicamentos eficazes e seguros. Igualmente, análises proteômicas como as realizadas neste trabalho, serão de grande contribuição para a descoberta de peptídeos bioativos que com abordagens clássicas, não poderiam ser detectados.

O presente trabalho é o primeiro estudo da composição peptídica e proteica da secreção cutânea de *D. columbianus* e foi um dos primeiros estudos proteômicos em *highthroughput* de secreção de anuro. As principais contribuições deste trabalho são:

- O primeiro peptídeo antimicrobiano da secreção cutânea do gênero *Dendrosophus* foi reportado e nomeado Dc 1;
- Dc 1 possui uma sequência única e baixa citotoxicidade contra células de mamífero, assim Dc 1 poderia ser utilizado como *template* no desenho de novos AMPs;
- As enzimas calpain-8-*like*, neuroendocrine convertase 1 e prohormone convertase 1 são o primeiro relato de proteases presentes na secreção cutânea do gênero *Dendrosophus*;
- As enzimas neuroendocrine convertase 1 e prohormone convertase 1 foram preditas como potenciais proteínas envolvidas no processamento de peptídeos bioativos na secreção cutânea de *D. columbianus*;
- 1248 proteínas foram identificadas na secreção cutânea de *D. columbianus* pela análise proteômica qualitativa. Baseados na anotação *Gene Ontology*, 127 proteínas foram categorizadas como associadas ao sistema de defesa e 19 relacionadas à resposta contra microrganismos;

- A histona H2B foi identificada na secreção cutânea e predita como proteína secretada e de defesa contra microrganismos;
- A análise peptidômica permitiu determinar um novo grupo de peptídeos endógenos, similares a Dc1, que foram denominados Dendropsofinas;
- Dentro das dendropsofinas, mostramos que Dc 2 e Dc 18 são ativadores de neutrófilos humanos, potenciais moléculas alternativas na terapia de doenças infecciosas.

8. Perspectivas

Aqui mostramos que a proteômica é um passo importante para a ampliação do conhecimento sobre a biologia da secreção cutânea de anfíbios e, no futuro, a proteômica será combinada com metabolômica e lipidômica para compreender melhor a fisiologia deste riquíssimo tecido que é a pele de anfíbio.

A curto prazo, alguns dos seguintes experimentos poderão trazer informações importantes relativas a essa secreção cutânea e para o desenvolvimento de potenciais peptídeos bioativos:

- Desenhar novos análogos com potencial de alta atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade e testa-los;
- Avaliar a capacidade de Dc 1 e outras dendropofinas de ativar neutrófilos;
- Determinar o papel supressor da resposta imune dos peptídeos Dc7, DC13, Dc 17 e Dc 19.

8. Bibliografia

- Abrunhosa, F., Faria, S., Gomes, P., Tomaz, I., Pessoa, J. C., Andreu, D., & Bastos, M. (2005). Interaction and lipid-induced conformation of two cecropin-melittin hybrid peptides depend on peptide and membrane composition. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(36), 17311-17319.
- Ahmad, A., Ahmad, E., Rabbani, G., Haque, S., Arshad, M., & Hasan Khan, R. Identification and design of antimicrobial peptides for therapeutic applications. *Current Protein and Peptide Science*, 13(3), 211-223.
- Andreu, D., & Rivas, L. (1998a). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, 47(6), 415-433.
- Andreu, D., & Rivas, L. (1998b). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Peptide Science*, 47(6), 415-433.
- Angeles, A., Fung, G., & Luo, H. (2012). Immune and non-immune functions of the immunoproteasome. *Front Biosci*, 17, 1904-1916.
- Apponyi, M. A., Pukala, T. L., Brinkworth, C. S., Maselli, V. M., Bowie, J. H., Tyler, M. J., . . . Separovic, F. (2004). Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. *Peptides*, 25(6), 1035-1054.
- Asthana, N. (2014). Understanding the structure-function relationships in some naturally occurring anti-microbial peptides and design of novel peptides with anti-microbial activity.
- Balderrama, G. D., Meneses, E. P., Orihuela, L. H., Hernández, O. V., Franco, R. C., Robles, V. P., & Batista, C. V. F. (2011). Analysis of sulfated peptides from the skin secretion of the *Pachymedusa dactylos* frog using IMAC-Ga enrichment and high-resolution mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 25(8), 1017-1027.
- Ballweber, L., Jaynes, J., Stamm, W., & Lampe, M. (2002). In vitro microbicidal activities of cecropin peptides D2A21 and D4E1 and gel formulations containing 0.1 to 2% D2A21 against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(1), 34-41.
- Batista, C., da Silva, L. R., Sebben, A., Scaloni, A., Ferrara, L., Paiva, G., . . . Bloch, C. (1999). Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta* 1. *Peptides*, 20(6), 679-686.
- Bechinger, B., & Lohner, K. (2006). Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 1758(9), 1529-1539.
- Bolívar-G, W., Giraldo, A., & Mendez, J. (2011). Amphibia, Anura, Strabomantidae, *Pristimantis palmeri* Boulenger, 1912: Distribution extension for the Central Cordillera, Colombia. *CheckList*, 7(1).
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33(5), 657-670.
- Braks, J. A., Guldmond, K. C., van Riel, M. C., Coenen, A. J., & Martens, G. J. (1992). Structure and expression of *Xenopus* prohormone convertase PC2. *FEBS letters*, 305(1), 45-50.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250.
- Brown, K. L., & Hancock, R. E. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current opinion in immunology*, 18(1), 24-30.

- Castro-Herrera, F., & Vargas-Salinas, F. (2008). Anfibios y reptiles en el departamento del Valle del Cauca, Colombia. *Biota Colombiana*, 9(2), 251-277.
- Castro, M. S., Ferreira, T. C. G., Cilli, E. M., Crusca, E., Mendes-Giannini, M. J. S., Sebben, A., . . . Fontes, W. (2009). Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). *Peptides*, 30(2), 291-296.
- Castro, M. S., Matsushita, R. H., Sebben, A., Sousa, M. V., & Fontes, W. (2005). Hylins: bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the Brazilian tree-frog *Hyla biobeba*. *Protein and peptide letters*, 12(1), 89-93.
- Clarke, B. T. (1997). The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 72(03), 365-379.
- Conlon, J. M. (2004). The therapeutic potential of antimicrobial peptides from frog skin. *Reviews in Medical Microbiology*, 15(1), 17-25.
- Conlon, J. M. (2011). The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. *Cell and tissue research*, 343(1), 201-212.
- Conlon, J. M., Iwamuro, S., & King, J. D. (2009). Dermal cytolytic peptides and the system of innate immunity in anurans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163(1), 75-82.
- Conlon, J. M., & Kim, J. B. (2000). A protease inhibitor of the Kunitz family from skin secretions of the tomato frog, *Dyscophus guineti* (Microhylidae). *Biochemical and biophysical research communications*, 279(3), 961-964.
- Conlon, J. M., Kolodziejek, J., & Nowotny, N. (2004). Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1696(1), 1-14.
- Conlon, J. M., Mechkarska, M., Radosavljevic, G., Attoub, S., King, J. D., Lukic, M. L., & McClean, S. (2014). A family of antimicrobial and immunomodulatory peptides related to the frenatins from skin secretions of the Orinoco lime frog *Sphaenorhynchus lacteus* (Hylidae). *Peptides*, 56, 132-140.
- Conlon, J. M., Woodhams, D. C., Raza, H., Coquet, L., Leprince, J., Jouenne, T., . . . Rollins-Smith, L. A. (2007). Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). *Toxicon*, 50(4), 498-506.
- Chaly, Y. V., Paleolog, E., Kolesnikova, T., Tikhonov, I., Petratchenko, E., & Voitenok, N. (2000). Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *European cytokine network*, 11(2), 257-266.
- Charneau, S., de Mesquita, M. L., Bastos, I. M. D., Santana, J. M., de Paula, J. E., Grellier, P., & Espindola, L. S. (2016). *In vitro* investigation of Brazilian Cerrado plant extract activity against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei gambiense*. *Natural product research*, 30(11), 1320-1326.
- Chen, Q., Wade, D., Kurosaka, K., Wang, Z. Y., Oppenheim, J. J., & Yang, D. (2004). Temporin A and related frog antimicrobial peptides use formyl

- peptide receptor-like 1 as a receptor to chemoattract phagocytes. *The Journal of Immunology*, 173(4), 2652-2659.
- Chen, Y., Guarnieri, M. T., Vasil, A. I., Vasil, M. L., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (2007). Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(4), 1398-1406.
- D'acquisto, F., Perretti, M., & Flower, R. (2008). Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *British journal of pharmacology*, 155(2), 152-169.
- da Silva Libério, M., Bastos, I. M., Júnior, O. R. P., Fontes, W., Santana, J. M., & Castro, M. S. (2014a). The crude skin secretion of the pepper frog *Leptodactylus labyrinthicus* is rich in metallo and serine peptidases. *PloS one*, 9(6), e96893.
- da Silva Libério, M., Bastos, I. M., Júnior, O. R. P., Fontes, W., Santana, J. M., & Castro, M. S. (2014b). The crude skin secretion of the pepper frog *Leptodactylus labyrinthicus* is rich in metallo and serine peptidases.
- Dahham, S. S., Hew, C., Jaafar, I., & Gam, L. (2016). The Protein Profiling of Asian Giant Toad Skin Secretions And Their Antimicrobial Activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8, 88-95.
- Dathe, M., & Wieprecht, T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462(1), 71-87.
- Demesa-Balderrama, G., P Meneses, E., Hernández-Orihuela, L., Pando-Robles, V., C Rodriguez, M., Barrientos-Salcedo, C., . . . VF Batista, C. (2016). A Comprehensive Proteomic Study of the Skin Secretions of the Frog *Lithobates spectabilis*. *Protein and peptide letters*, 23(7), 597-611.
- Denning, D. W. (2003). Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet*, 362(9390), 1142-1151.
- Di Cera, E. (2009). Serine proteases. *IUBMB Life*, 61(5), 510-515.
- Epand, R. M., & Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462(1), 11-28.
- Faivovich, J., Haddad, C. F., Garcia, P. C., Frost, D. R., Campbell, J. A., & Wheeler, W. C. (2009). Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision.
- Friedrich, C., Scott, M. G., Karunaratne, N., Yan, H., & Hancock, R. E. (1999). Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(7), 1542-1548.
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 710-720.
- Ge, Y., MacDonald, D. L., Holroyd, K. J., Thornsberry, C., Wexler, H., & Zasloff, M. (1999). In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(4), 782-788.
- Giangaspero, A., Sandri, L., & Tossi, A. (2001). Amphipathic α helical antimicrobial peptides. *European Journal of Biochemistry*, 268(21), 5589-5600.

- Greenfield, N. J., & Fasman, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 8(10), 4108-4116.
- Hancock, R. E., & Sahl, H.-G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24(12), 1551-1557.
- Hanna, S. L., Sherman, N. E., Kinter, M. T., & Goldberg, J. B. (2000). Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Microbiology*, 146(10), 2495-2508.
- Harris, F., Dennison, S. R., & Phoenix, D. A. (2009). Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current Protein and Peptide Science*, 10(6), 585-606.
- Hayes, M. J., Shao, D., Bailly, M., & Moss, S. E. (2006). Regulation of actin dynamics by annexin 2. *The EMBO journal*, 25(9), 1816-1826.
- Helmerhorst, E. J., Breeuwer, P., van't Hof, W., Walgreen-Weterings, E., Oomen, L. C., Veerman, E. C., . . . Abee, T. (1999). The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 7286-7291.
- Heussen, C., & Dowdle, E. B. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry*, 102(1), 196-202.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., & Ezekowitz, R. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284(5418), 1313-1318.
- Houghten, R. A., Pinilla, C., Blondelle, S. E., Appel, J. R., Dooley, C. T., & Cuervo, J. H. (1991). Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature*, 354(6348), 84-86.
- Huang, H. W. (2006). Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1292-1302.
- Javadpour, M. M., Juban, M. M., Lo, W.-C. J., Bishop, S. M., Alberty, J. B., Cowell, S. M., . . . McLaughlin, M. L. (1996). De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39(16), 3107-3113.
- Jenssen, H. v., Hamill, P., & Hancock, R. E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491-511.
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 90(3), 369-383.
- Kawasaki, H., Isaacson, T., Iwamuro, S., & Conlon, J. M. (2003). A protein with antimicrobial activity in the skin of Schlegel's green tree frog *Rhacophorus schlegelii* (Rhacophoridae) identified as histone H2B. *Biochemical and biophysical research communications*, 312(4), 1082-1086.
- Kim, H. S., Park, C. B., Kim, M. S., & Kim, S. C. (1996). cDNA cloning and characterization of buforin I, an antimicrobial peptide: a cleavage product of

- histone H2A. *Biochemical and biophysical research communications*, 229(2), 381-387.
- Klich, M., Lax, A., & Bland, J. (1991). Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia*, 116(2), 77-80.
- Konig, E., & Bininda-Emonds, O. R. (2011). Evidence for convergent evolution in the antimicrobial peptide system in anuran amphibians. *Peptides*, 32(1), 20-25.
- Konig, E., Bininda-Emonds, O. R., & Shaw, C. (2015). The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides*, 63, 96-117.
- Laemmli, U. (1970). Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature*, 227, 680-685.
- Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology*, 30(3), 131-141.
- Latoud, C., Peypoux, F., Michel, G., Genet, R., & Morgat, J. (1986). Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 856(3), 526-535.
- Leite, J. R. S., Silva, L. P., Rodrigues, M. I. S., Prates, M. V., Brand, G. D., Lacava, B. M., . . . Bloch, C. (2005). Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides*, 26(4), 565-573.
- León, I. R., Schwämmle, V., Jensen, O. N., & Sprenger, R. R. (2013). Quantitative assessment of in-solution digestion efficiency identifies optimal protocols for unbiased protein analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(10), 2992-3005.
- Li, M., Lai, Y., Villaruz, A. E., Cha, D. J., Sturdevant, D. E., & Otto, M. (2007). Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(22), 9469-9474.
- Libério, M. S., Joanitti, G. A., Azevedo, R. B., Cilli, E. M., Zanotta, L. C., Nascimento, A. C., . . . Castro, M. S. (2011). Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. *Amino Acids*, 40(1), 51-59.
- Los, F. C., Kao, C.-Y., Smitham, J., McDonald, K. L., Ha, C., Peixoto, C. A., & Aroian, R. V. (2011). RAB-5-and RAB-11-dependent vesicle-trafficking pathways are required for plasma membrane repair after attack by bacterial pore-forming toxin. *Cell host & microbe*, 9(2), 147-157.
- Luca, V., Stringaro, A., Colone, M., Pini, A., & Mangoni, M. L. (2013). Esculentin (1-21), an amphibian skin membrane-active peptide with potent activity on both planktonic and biofilm cells of the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(15), 2773-2786.
- Ma, B., Zhang, K., Hendrie, C., Liang, C., Li, M., Doherty-Kirby, A., & Lajoie, G. (2003). PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 17(20), 2337-2342.
- Mackiewicz, P., & Wyroba, E. (2009). Phylogeny and evolution of Rab7 and Rab9 proteins. *BMC evolutionary biology*, 9(1), 101.

- Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. W. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), 468-472. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>
- Meadows, S. M., & Cleaver, O. (2015). Annexin A3 Regulates Early Blood Vessel Formation. *PLoS one*, 10(7), e0132580.
- Méndez-Narváez, J., & Bolívar-G, W. (2016). Complementary Ecological Approaches to Understand Decreases in Frog Diversity in Altered Andean Ecosystems. *South American Journal of Herpetology*, 11(1), 1-11.
- Mor, A., & Nicolas, P. (1994). The NH₂-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *Journal of Biological Chemistry*, 269(3), 1934-1939.
- Narayana, J. L., & Chen, J.-Y. (2015). Antimicrobial peptides: possible anti-infective agents. *Peptides*, 72, 88-94.
- Nascimento, A. C. C., Fontes, W., Sebben, A., & Castro, M. S. (2003). Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein and peptide letters*, 10(3), 227-238.
- Navon-Venezia, S., Feder, R., Gaidukov, L., Carmeli, Y., & Mor, A. (2002). Antibacterial properties of dermaseptin S4 derivatives with in vivo activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(3), 689-694.
- Neves, A. C. D. (2011). Análise proteômica comparativa entre neutrófilos quiescentes e neutrófilos ativo por n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP).
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464-472.
- Nicolas, P., & Mor, A. (1995). Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 277-304.
- Oren, Z., & Shai, Y. (1997). Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure-function study. *Biochemistry*, 36(7), 1826-1835.
- Park, C. B., Kim, H. S., & Kim, S. C. (1998). Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and biophysical research communications*, 244(1), 253-257.
- Park, I. Y., Park, C. B., Kim, M. S., & Kim, S. C. (1998). Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS letters*, 437(3), 258-262.
- Pérez-Payá, E., Houghten, R. A., & Blondelle, S. E. (1995). The role of amphipathicity in the folding, self-association and biological activity of multiple subunit small proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 270(3), 1048-1056.
- Pinto, O. (2006). *Influência, in vitro, da vancomicina, da anfotericina B desoxicolato e de ambas sobre a unção fagocitária, produção de radicais de oxigênio e fator de necrose tumoral por fagócitos de sangue periférico de indivíduos normais*. 135f. Brasília-DF. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical)

Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade de Brasília.

- Powell, W. A., Catranis, C. M., & Maynard, C. A. (1995). Synthetic antimicrobial peptide design. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 8(5), 792.
- Proaño-Bolaños, C., Zhou, M., Wang, L., Coloma, L. A., Chen, T., & Shaw, C. (2016). Peptidomic approach identifies cruzioseptins, a new family of potent antimicrobial peptides in the splendid leaf frog, *Cruziohyla calcarifer*. *Journal of Proteomics*, 146, 1-13.
- R Dennison, S., HG Morton, L., & A Phoenix, D. (2012). Effect of amidation on the antimicrobial peptide aurein 2.5 from Australian southern bell frogs. *Protein and peptide letters*, 19(6), 586-591.
- Raftery, M. J., Waugh, R. J., Bowie, J. H., Wallace, J. C., & Tyler, M. J. (1996). The structures of the frenatin peptides from the skin secretion of the giant tree frog *Litoria infrafrenata*. *Journal of Peptide Science*, 2(2), 117-124.
- Räsänen, K., Laurila, A., & Merilä, J. (2003). Geographic variation in acid stress tolerance of the moor frog, *Rana arvalis*. I. Local adaptation. *Evolution*, 57(2), 352-362.
- Räz, B., Iten, M., Grether-Bühler, Y., Kaminsky, R., & Brun, R. (1997). The Alamar Blue® assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*Tb rhodesiense* and *Tb gambiense*) in vitro. *Acta tropica*, 68(2), 139-147.
- Rechsteiner, M., & Hill, C. P. (2005). Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends in cell biology*, 15(1), 27-33.
- Rinaldi, A. C. (2002). Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario: Commentary. *Current opinion in chemical biology*, 6(6), 799-804.
- Rivas, L., Luque-Ortega, J. R. n., & Andreu, D. (2009). Amphibian antimicrobial peptides and Protozoa: lessons from parasites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(8), 1570-1581.
- Rivera-Correa, M., & Gutiérrez-Cárdenas, P. D. A. (2012). A new highland species of treefrog of the *Dendropsophus columbianus* group (Anura: Hylidae) from the Andes of Colombia. *Zootaxa*, 3486, 50-62.
- Robinette, D., Wada, S., Arroll, T., Levy, M., Miller, W., & Noga, E. (1998). Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(5), 467-475.
- Rollins-Smith, L. A. (2001). Neuroendocrine-immune system interactions in amphibians. *Immunologic research*, 23(2-3), 273-280.
- Sa'adedin, F., & P Bradshaw, J. A differential scanning calorimetry study of the effects and interactions of antimicrobial peptide LS3 on phosphatidylethanolamine bilayers. *Protein and Peptide Letters*, 17(11), 1345-1350.
- Samy, R. P., Foo, S. L., Franco, O. L., Stiles, B. G., Kumar, A. P., Sethi, G., & Lim, L. (2017). Identification of natural peptides as a new class of antimalarial drugs by in silico approaches. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 9, 88.
- Santos, K. (2007). Análise proteômica comparativa entre neutrófilos não ativados e neutrófilos ativados com PMA, um análogo do diacilglicerol. *Programa de*

- pós graduação em Patologia Molecular, Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.
- Santos, P. M., Teixeira, M. C., & Sá-Correa, I. (2004). A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microrganismos. *Lisboa: Boletim de Biotecnologia*, 6-17.
- Saravolatz, L. D., Deresinski, S. C., & Stevens, D. A. (2003). Caspofungin. *Clinical Infectious Diseases*, 36(11), 1445-1457.
- Scott, M. G., Dullaghan, E., Mookherjee, N., Glavas, N., Waldbrook, M., Thompson, A., . . . Hamill, P. (2007). An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. *Nature biotechnology*, 25(4), 465-472.
- Schneider, T., Kruse, T., Wimmer, R., Wiedemann, I., Sass, V., Pag, U., . . . Raventós, D. S. (2010). Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. *Science*, 328(5982), 1168-1172.
- Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 66(4), 236-248.
- Shen, D., & Wu, B. (2014). Structure, biological properties and utilities of marine-derived antimicrobial peptides. *Current Organic Chemistry*, 18(7), 793-803.
- Shi, Q., & Jackowski, G. (1998). One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*, 3rd ed. Oxford University Press, Oxford, 1-52.
- Shin, S., Yang, S. T., Park, E., Eom, S., Song, W., Kim, J., . . . Hahm, K. S. (2001). Antibacterial, antitumor and hemolytic activities of α -helical antibiotic peptide, P18 and its analogs. *The Journal of Peptide Research*, 58(6), 504-514.
- Silva, Í. C. (2016). NEUTRÓFILOS: ASPECTOS CLÁSSICOS, PLASTICIDADE E NOVAS FUNÇÕES IMUNORREGULATÓRIAS. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies*, 7(1).
- Simmaco, M., Mignogna, G., & Barra, D. (1998). Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Peptide Science*, 47(6), 435-450.
- Sousa-Filho, L. M., Freitas, C. D., Lobo, M. D., Monteiro-Moreira, A. C., Silva, R. O., Santana, L. A., . . . Pereira, A. C. (2016). Biochemical Profile, Biological Activities, and Toxic Effects of Proteins in the *Rhinella schneideri* Parotoid Gland Secretion. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 325(8), 511-523.
- Takahashi, M., Tokumoto, T., & Ishikawa, K. (1994). DFP-sensitive multicatalytic protease complexes (proteasomes) involved in the control of oocyte maturation in the toad, *Bufo japonicus*. *Molecular reproduction and development*, 38(3), 310-317.
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in lipid research*, 51(2), 149-177.
- Thompson, A. H., Bjourson, A. J., Orr, D. F., Shaw, C., & McClean, S. (2007). Amphibian skin secretomics: application of parallel quadrupole time-of-flight mass spectrometry and peptide precursor cDNA cloning to rapidly

- characterize the skin secretory peptidome of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*: discovery of a novel peptide family, the hyposins. *Journal of proteome research*, 6(9), 3604-3613.
- Tokumoto, T., & Ishikawa, K. (1993). 20S latent proteasomes isolated from the cytosol of *Xenopus* oocytes: purification and partial characterization. *Biomedical Research*, 14(6), 391-401.
- Tokumoto, T., Tokumoto, M., Seto, K., Horiguchi, R., Nagahama, Y., Yamada, S., . . . Lohka, M. J. (1999). Disappearance of a Novel Protein Component of the 26S Proteasome during *Xenopus* Oocyte Maturation. *Experimental cell research*, 247(2), 313-319.
- Tossi, A., Sandri, L., & Giangaspero, A. (2000). Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 55(1), 4-30.
- Ukena, K., Koda, A., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Iwakoshi-Ukena, E., Minakata, H., . . . Tsutsui, K. (2003). Novel neuropeptides related to frog growth hormone-releasing peptide: isolation, sequence, and functional analysis. *Endocrinology*, 144(9), 3879-3884.
- Urban, M. C., Richardson, J. L., & Freidenfelds, N. A. (2014). Plasticity and genetic adaptation mediate amphibian and reptile responses to climate change. *Evolutionary Applications*, 7(1), 88-103.
- Vieau, D., Gangnon, F., Jégou, S., Danger, J.-M., & Vaudry, H. (1998). Characterization of the cDNA encoding the prohormone convertase PC2 and localization of the mRNA in the brain of the frog *Rana ridibunda*. *Molecular brain research*, 63(1), 1-13.
- Wang, X., Song, Y., Li, J., Liu, H., Xu, X., Lai, R., & Zhang, K. (2007). A new family of antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana pleuraden*. *Peptides*, 28(10), 2069-2074.
- Wieprecht, T., Apostolov, O., Beyermann, M., & Seelig, J. (1999). Thermodynamics of the α -helix-coil transition of amphipathic peptides in a membrane environment: implications for the peptide-membrane binding equilibrium. *Journal of molecular biology*, 294(3), 785-794.
- Xiao, X.-H., Miao, H.-M., Xu, Y.-G., Zhang, J.-Y., Chai, L.-H., & Xu, J.-J. (2014). Analysis of skin and secretions of Dybowski's frogs (*Rana dybowskii*) exposed to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* identifies immune response proteins. *The Veterinary Journal*, 200(1), 127-132.
- Xu, X., & Lai, R. (2015). The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chemical reviews*, 115(4), 1760-1846.
- Yeaman, M. R. (2010). Platelets in defense against bacterial pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(4), 525-544.
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*, 55(1), 27-55.
- Yount, N. Y., Bayer, A. S., Xiong, Y. Q., & Yeaman, M. R. (2006). Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Peptide Science*, 84(5), 435-458.
- Zhang, Y., Yu, G., Wang, Y., Zhang, J., Wei, S., Lee, W., & Zhang, Y. (2010). A novel annexin A2 protein with platelet aggregation-inhibiting activity from amphibian *Bombina maxima* skin. *Toxicon*, 56(3), 458-465.

Zhao, J., Zhao, C., Liang, G., Zhang, M., & Zheng, J. Engineering Antimicrobial Peptides with Improved Antimicrobial and Hemolytic Activities. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(12), 3280-3296.