



Universidade de Brasília  
Pós-Graduação em Biologia Animal

**Análise peptidômica da secreção cutânea do  
anuro *Eupemphix nattereri* com ênfase na  
prospecção de peptídeos antimicrobianos**

Carla Tatiana de Miranda Honorato

**Orientadora:** Profa. Dra. Mariana S. Castro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

**Brasília/DF**

**2009**

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**

Dissertação de mestrado

**CARLA TATIANA DE MIRANDA HONORATO**

Título:

**ANÁLISE PEPTIDÔMICA DA SECREÇÃO CUTÂNEA DO  
ANURO *EUPHEMIX NATTERERI* COM ÊNFASE NA  
PROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

**Comissão Examinadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana de Souza Castro**  
Orientador  
UnB

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valdirene Moreira Gomes**  
Membro Titular  
UENF

**Prof. Dr. Antonio Sebben**  
Membro Titular  
UnB

**Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart**  
Membro Suplente  
UnB

"Se conservares o amor no coração, - obra divina do Universo, - nunca te perderás na sombra, porque terás convertido a própria alma em presença de luz."

Emmanuel

## Agradecimentos

À Profa. Dra. Mariana de Souza Castro pela orientação, incentivo, compreensão, paciência e amizade que permitiu a realização desse trabalho.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Wagner Fontes, Ricardo Bastos Cunha, Pedro Zanotta, Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima, Carlos André O. Ricart e Marcelo Valle de Sousa, por toda a colaboração.

Ao Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Junior, pela co-orientação, amizade, paciência, colaboração, sugestões, incentivo e conselhos sempre bem-vindos que enriqueceram essa dissertação.

Ao Prof. Dr. Eduardo Cilli, pela síntese de peptídeos.

À Prof Sônia Freitas pela colaboração nos experimentos de dicroísmo circular

Aos amigos Anne, Diana, Fabiane, Fábio, Gabriel, Jimmy, Liudy, Liz, Michelle, Rafael, Rayner e outros igualmente importantes por tornarem o ambiente de trabalho sempre agradável e pela ajuda sempre disponível em todos os momentos.

À Adriana, Aline, Carol e Oscar pelo bom humor constante, piadas, alegrias, dramas, e por serem amigas que levarei pra vida inteira.

Ao Carlos Locombia, pela disposição em ajudar nos assuntos mais tecnológicos.

À Elaine, por toda a ajuda prestada nos ensaios antimicrobianos e em discussões de grande importância nesse trabalho.

A Carla Simone e Sheila Rodrigues pelas conversas, apoio, desespos e companheirismo nas disciplinas.

Aos queridos amigos Andressa e David pelo grande incentivo, apoio e ajuda em todas as etapas desse trabalho.

Ao Antonio Rufino e Nuno Domingues pelo apoio técnico e constante disposição em ajudar.

À FUB/UnB e à CAPES que possibilitaram a realização desse trabalho.

Aos meus primos Marcelo, Karina, Fábio, Amanda, Tônico, Vitto, Léa e Rodrigo por serem pra mim como irmãos.

Ao Raí e ao Bono, pelo amor incondicional.

À minha amada família, em especial ao meu pai, à minha mãe e à minha madrinha, pelo apoio em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, por acreditarem no meu potencial e por serem tudo na minha vida.

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Agradecimentos.....	vi
Lista de abreviaturas.....	vii
Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	x
Resumo.....	xi
<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
o Peptídeos antimicrobianos de anuros.....	4
o Mecanismos de ação.....	10
o Aplicações.....	16
o <i>Eupemphix nattereri</i> (Steindachner, 1863).....	20
<b>Justificativa.....</b>	<b>23</b>
<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>24</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>25</b>
1. Reagentes químicos.....	25
2. Obtenção da secreção cutânea.....	25
3. Purificação dos peptídeos.....	25
4. Ensaio hemolítico.....	26
5. Ensaio antimicrobiano.....	27
6. Seqüenciamento N-terminal.....	27
7. Espectrometria de massa.....	28
8. Determinação da amidação C-terminal.....	28
9. Síntese química.....	28
10. Dicroísmo circular.....	29
11. Bioinformática.....	29

<b>Resultados</b> .....	31
1. Fracionamento da secreção cutânea.....	31
2. Ensaio preliminares antimicrobiano e hemolítico.....	32
3. Purificação dos peptídeos.....	33
4. Caracterização química dos peptídeos.....	35
5. Determinação de CIM e HC <sub>50</sub> .....	41
<b>Discussão</b> .....	42
<b>Conclusões</b> .....	48
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	49
<b>Anexos</b> .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

- [M+H]<sup>+</sup>** - Massa molecular monoisotópica.
- <μH>** - Anfipaticidade.
- <H>** - Hidrofobicidade média.
- CFU** - Unidade formadora de colônia.
- CIM** - Concentração inibitória mínima.
- DNA** - Ácido desoxoribonucléico.
- DST** - Doença sexualmente transmissível.
- HC<sub>50</sub>** - Concentração capaz de promover 50% de hemólise.
- HCCA** - Ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico.
- HIV** - Vírus da imunodeficiência humana.
- LPS** - Lipopolisacarídeos.
- MALDI-TOF** - *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*.
- MS** - *Mass spectrometry*.
- pI** - Ponto isoelétrico.
- RP-HPLC** - *Reversed-phase high performance liquid chromatography*.
- TFA** - Ácido trifluoroacético.
- TFE** - Trifluoroetanol.

# LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Estruturas simplificadas de peptídeos antimicrobianos lineares e cíclicos.....	3
<b>Figura 2.</b> Modelo de interação entre peptídeos antimicrobianos e membranas celulares bacteriana e eucariótica .....	11
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do modelo <i>barrel-stave</i> .....	12
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do modelo do poro toroidal .....	13
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do modelo <i>carpet-like</i> .....	14
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática do modelo <i>Shai-Matsuzaki-Huang</i> .....	15
<b>Figura 7.</b> Exemplar de <i>Eupemphix nattereri</i> .....	22
<b>Figura 8.</b> Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção bruta de <i>Eupemphix nattereri</i> .....	31
<b>Figura 9.</b> Composição peptídica da secreção cutânea de <i>E. nattereri</i> , apresentada em intervalos de massas moleculares monoisotópicas obtidas por espectrometria de massa MALDI-TOF das frações provenientes de uma corrida de RP-HPLC.....	32
<b>Figura 10.</b> Recromatografias dos peptídeos de interesse.....	33
<b>Figura 11.</b> Espectros de massa dos peptídeos.....	35
<b>Figura 12.</b> Alinhamento comparativo entre as estruturas primária das nattererinas.....	36
<b>Figura 13.</b> Alinhamento comparativo entre as estruturas primária dos peptídeos nattererina-1 com gaegurina-2, ranatuerina-1T, ranatuerina-2BYa, syphaxina e fallaxina.....	37
<b>Figura 14.</b> Alinhamento comparativo entre as estruturas primária dos peptídeos nattererina-2 com gaegurina-2, ranatuerina-1T, ranatuerina-2BYa, syphaxina e fallaxina.....	37
<b>Figura 15.</b> Alinhamento comparativo entre as estruturas primária dos peptídeos nattererina-3 com gaegurina-2, ranatuerina-1T, ranatuerina-2BYa, syphaxina e fallaxina.....	38
<b>Figura 16.</b> Árvore filogenética dos alinhamentos entre as nattererinas e peptídeos similares.....	38
<b>Figura 17.</b> Projeção em $\alpha$ -hélice do peptídeo nattererina-1.....	39
<b>Figura 18.</b> Projeção em $\alpha$ -hélice do peptídeo nattererina-2.....	39
<b>Figura 19.</b> Projeção em $\alpha$ -hélice do peptídeo nattererina-3.....	39
<b>Figura 20.</b> Espectro de dicroísmo circular da nattererina-1.....	40



**Figura 21.** Espectro de dicroísmo circular da nattererina-2..... 41

# LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Comparação entre as nattererinas isoladas.....	40
<b>Tabela 2.</b> Atividade antimicrobiana das nattererinas 1, 2 e 3 sintéticas.....	41

## Resumo

As secreções cutâneas dos anfíbios são reconhecidas como uma rica fonte de peptídeos biologicamente ativos há bastante tempo. Devido as suas propriedades antimicrobianas e ao seu mecanismo de ação que independe da interação com um receptor específico, cada vez mais, os peptídeos isolados dessas secreções vêm sendo considerados como uma opção alternativa aos antibióticos disponíveis comercialmente. Muitas linhagens bacterianas têm apresentado resistência a tais drogas e o fato dos peptídeos antimicrobianos de anuros estarem disponíveis em quantidades satisfatórias na natureza tem facilitado a pesquisa nessa área. O presente estudo teve como objetivo geral proceder à análise peptidômica da secreção cutânea do anuro *Eupemphix nattereri* com ênfase na prospecção de peptídeos antimicrobianos para aplicações terapêuticas. Como resultados do presente estudo, foram isolados e caracterizados três peptídeos antimicrobianos, denominados nattererinas. As nattererinas identificadas foram sintetizadas quimicamente e apresentaram atividade citolítica contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e baixa atividade hemolítica. Dentre suas propriedades estruturais, podemos ressaltar tratar-se de peptídeos catiônicos (com 30 resíduos de aminoácidos) que adquirem conformação em  $\alpha$ -hélice na presença de TFE 50% (v/v). A pesquisa nessa área é de extrema importância, visto que a caracterização dos componentes presentes na secreção cutânea de anuros pode ajudar em identificações taxonômicas, bem como, fomentar a indústria farmacêutica com modelos para o desenho de novas drogas terapêuticas.

## Abstract

Amphibian skin secretions have been known as a rich source of antimicrobial peptides for a long time. The outcome of antibiotic resistant bacterial species is an increasing problem, which encourages the search of new compounds in nature, for example, over anurans' skin secretion. Due to its antimicrobial properties and mechanism of action, which is independent of specific receptors, these peptides have been considered as an alternative to the available antibiotics. The present study describes peptidômica analysis of the cutaneous secretion from the frog *Eupemphix nattereri*, focusing on antimicrobial peptides. As results of the present work, three antimicrobial peptides, named nattererins, were isolated and characterized. The identified nattererins were synthesized and tested against Gram-positive and Gram-negatives bacteria showing antimicrobial activity and low hemolytic activity. Nattererins are cationic peptides (30 amino acid residues long) and adopt an  $\alpha$ -helical conformation in the presence of TFE 50% (v/v). Regarding the obtained results, naturally occurring bioactive peptides from amphibian skin can be a source of pharmaceutically interesting compounds, which endorses a higher investment in this kind of study. In addition, these peptides also can help in the taxonomy of anurans species.

## Introdução

A classe Anfíbia contém cerca de 6.433 espécies descritas incluídas em três ordens: Apoda (cecilídeos), Caudata (salamandra e tritões) e Anura (sapos e rãs) (Frost, 2009). Diante dos números atuais, o Brasil ocupa a primeira colocação na relação de países com maior riqueza de espécies de anfíbios, com cerca de 849 espécies descritas, seguido pela Colômbia e pelo Equador. (Sociedade Brasileira de Herpetologia, <http://www.sbherpetologia.org.br>).

Os anfíbios foram os primeiros vertebrados a invadirem o ambiente terrestre e essa transição só se tornou possível devido a uma série de adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais, podendo ser ressaltada a presença de um tegumento altamente especializado. A pele dos anfíbios desempenha diversas funções fisiológicas, tais como proteger o animal contra a abrasão, respiração cutânea, osmorregulação, termorregulação e ainda proteger o animal de predadores e de microorganismos por meio da secreção de substâncias tóxicas (Clarke, 1997).

Os anfíbios possuem um verdadeiro arsenal químico que faz parte do seu sistema de defesa. Em resposta a uma variedade de estímulos, tais componentes são secretados por glândulas especializadas localizadas na superfície dorsal e no trato gastrointestinal (Pukala *et al.*, 2006) e, aparentemente, cada espécie produz seu próprio conjunto de peptídeos ativos contra microorganismos patogênicos (Rollins-Smith *et al.*, 2002).

Existem dois tipos de glândulas acinares localizadas na pele dos anfíbios: as mucosas e as granulosas. As glândulas mucosas estão associadas com a secreção de mucinas, que estão envolvidas na manutenção da lubrificação cutânea e na termorregulação. As glândulas granulosas, também chamadas de glândulas serosas ou de veneno, são responsáveis pela produção da maioria das substâncias tóxicas encontradas na pele dos anfíbios. Sua secreção contém um grande número de compostos farmacologicamente ativos, tais como aminas biogênicas, esteróides, alcalóides, bufodienolídeos, peptídeos e proteínas. Essas substâncias desempenham diversas atividades biológicas, podendo ser cardio-, mio-, ou neurotóxicos, colinomiméticos, simpatomiméticos, vasoconstrictores locais, hipertensores, hemolíticos,

alucinogênicos, antinociceptivos ou inibidores do crescimento de microorganismos (Lazarus & Attila, 1993; Erspamer, 1994; Daly, 1995; Clarke, 1997; Rinaldi, 2002).

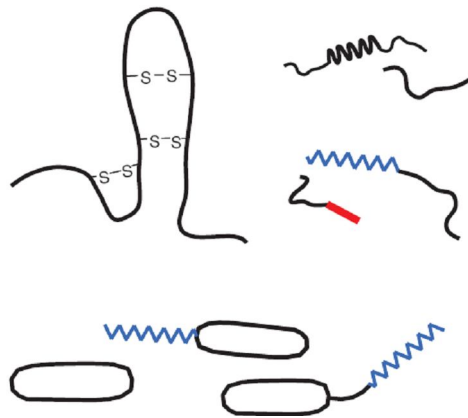
Em estudos antigos realizados com anuros, centenas de peles secas de diversas espécies eram extraídas na presença de solventes com o intuito de obter peptídeos ativos, um método hoje considerado ambientalmente incorreto. Esse método também se mostrou quimicamente inadequado, pois os peptídeos ativos estão armazenados na sua forma inativa, propeptídeo, no interior das glândulas. Métodos modernos utilizam técnicas que não envolvem a morte do animal, como, por exemplo, a injeção de noradrenalina ou estimulação elétrica não-invasiva de modo a liberar de forma eficaz a secreção na pele. Com o emprego desses métodos, peptídeos ativos podem ser isolados e identificados da secreção cutânea de apenas um único animal (Roseghini et al., 1976; Pukala et al., 2006). Não se sabe muito sobre a concentração de peptídeos ativos presente na pele de anfíbios saudáveis e em repouso, mas com o emprego dessas técnicas, a concentração pode exceder 1,0 mg/mL. Fatores ambientais podem também, direta ou indiretamente, inibir a síntese ou secreção de tais peptídeos. Por exemplo, situações de estresse elevam os níveis de glicocorticóides que podem inibir a produção ou a liberação desses peptídeos (Rollins-Smith et al., 2002).

Peptídeos antimicrobianos representam uma barreira inicial contra a invasão por microorganismos patogênicos (Nascimento et al., 2003) e sua expressão e acumulação na secreção cutânea é uma característica conservada pelos anuros de todo o mundo (Brand et al., 2006). Estudos recentes demonstram que a secreção de peptídeos aumenta após a exposição dos anfíbios a um ambiente rico em patógenos (Miele et al., 1997). A produção desses compostos faz parte da resposta imune inata primitiva e está amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrados em humanos, plantas e insetos (Reddy et al., 2004). Muitos peptídeos antimicrobianos apresentam especificidade em relação às membranas bacterianas e deixam de apresentar essa especificidade em relação às membranas celulares dos vertebrados. Após o contato com as células-alvo, esses peptídeos provocam uma permeabilização da membrana acompanhado de um vazamento do

conteúdo intracelular que acaba resultando na morte da célula (Hancock & Chapple, 1999; Zasloff, 2002).

Aparentemente, outros componentes da defesa imune dos anfíbios, tais como anticorpos e células T, devem ser responsáveis pela defesa contra determinados patógenos que apresentam certa resistência aos peptídeos antimicrobianos (Rollins-Smith *et al.*, 2002).

Até o momento, mais de 900 peptídeos antimicrobianos já foram descritos (Montesinos, 2007) e estão divididos em diversos grupos de acordo com suas características biológicas e estruturais (Reddy *et al.*, 2004), tais como peptídeos lineares helicoidais, peptídeos ricos em cisteínas com até quatro pontes dissulfeto, e ainda ciclopeptídeos formando um anel peptídico. Peptídeos lineares e circulares podem estar ligados a cadeias de ácidos graxos (lipopeptídeos) ou a outros elementos, resultando em moléculas complexas, denominadas pseudopeptídeos (Montesinos, 2007; Gottler & Ramamoorthy, 2008)



**Figura 1.** Estruturas simplificadas de peptídeos antimicrobianos lineares e cíclicos. A porção peptídica, representada em preto, apresenta conformação linear, helicoidal ou folha- $\beta$  com pontes dissulfeto (S). Ácidos graxos estão representados em azul (lipopeptídeos) e em vermelho têm-se outras substituições resultando em pseudopeptídeos (Retirado de Montesinos, 2007).

No início dos anos 70, acreditava-se que toda infecção bacteriana poderia ser tratada com algum dos vários agentes antibióticos disponíveis, os quais geralmente eram isolados de algumas espécies de bactérias e fungos. Pouco tempo depois, provou-se o contrário com o surgimento de linhagens

bacterianas que apresentavam resistência aos antibióticos comumente usados. Tal evento resultou na busca por novas moléculas que poderiam contornar o problema da resistência apresentada pelos patógenos. Dentre as moléculas que possuem essas propriedades estão os peptídeos antimicrobianos (Reddy *et al.*, 2004), cujo mecanismo de ação é imediato e leva à lise celular. Em contrapartida, tem-se o mecanismo de ação dos antibióticos clássicos que é baseado na inibição de determinadas enzimas e necessita de um determinado tempo para ser mostrar eficiente (Nascimento *et al.*, 2004).

Esses peptídeos apresentam propriedades bactericidas, fungicidas, virucidas, tumoricidas, e têm ainda propriedades que podem contornar o problema da resistência bacteriana (Reddy *et al.*, 2004), pois atuam no “calcanhar de Aquiles” dos microorganismos, ou seja, numa característica específica presente em suas membranas e que os diferenciam de plantas e animais multicelulares (Zasloff, 2002) e, uma vez que não foi detectada interações com centros quirais (Nascimento *et al.*, 2003), tornam-se candidatos a novas drogas terapêuticas nessas áreas (Reddy *et al.*, 2004).

## **Peptídeos Antimicrobianos de Anuros**

A secreção cutânea dos anfíbios já é conhecida como sendo uma rica fonte de peptídeos farmacologicamente ativos há bastante tempo. O interesse científico por peptídeos antimicrobianos se deu após a purificação da bombinina, presente na secreção cutânea de *Bombina variegata* em 1970, (Csordas & Michl, 1970) e consolidou-se com o isolamento das magaininas, obtidas de *Xenopus laevis*, em 1987 (Zasloff, 1987). O fato de esses peptídeos estarem frequentemente disponíveis em grandes quantidades tem facilitado bastante a pesquisa nessa área (Nascimento *et al.*, 2003).

Peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea de anfíbios apresentam quatro propriedades principais que lhes permitem agir na primeira linha de defesa contra microorganismos patogênicos. Primeiramente, apresentam uma toxicidade seletiva por meio da qual conseguem diferenciar células patogênicas das células do hospedeiro. Também apresentam ação microbicida rápida, onde o sítio de ação é preferencialmente a superfície



celular. Possuem amplo espectro de ação e, por último, a probabilidade de promoverem o surgimento de resistência por parte dos patógenos é baixa, visto que os alvos dos peptídeos antimicrobianos são componentes conservados das membranas biológicas dos microorganismos (Matsuzaki, 1999).

A seletividade lipídica pode explicar a seletividade tóxica, uma vez que os peptídeos se ligam seletivamente a membranas aniônicas e as permeabilizam. As forças atuantes sobre esse processo envolvem interações hidrofóbicas entre aminoácidos não-polares e a membrana, e interações eletrostáticas entre as cargas positivas dos peptídeos com as cargas negativas dos lipídeos. A hidrofobicidade dos peptídeos de defesa geralmente é moderada, e eles não chegam a se associar com fosfolipídios “zwitteriônicos”, evitando assim efeitos tóxicos no hospedeiro (Matsuzaki, 1999).

A principal diferença entre a membrana citoplasmática de células de indivíduos eucariotos e de procariotos está na composição e no arranjo topológico dos lipídios. A superfície da membrana das células de mamíferos é exclusivamente composta por fosfolipídios “zwitteriônicos” e eletricamente neutros, como fosfatidilcolina e esfingomiéline, e a presença de colesteróis estabilizantes de membrana protege a membrana eucariótica contra a ação de peptídeos, como a magainina-2, por exemplo. Já as células bacterianas possuem em suas membranas grandes quantidades de fosfolipídios negativamente carregados, como fosfatidilglicerol e cardiolipina. Bactérias Gram-negativas ainda possuem uma membrana externa recoberta por lipopolissacarídeos polianiónicos. (Matsuzaki, 1999)

Peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea de anuros possuem cerca de 10 a 50 resíduos de aminoácidos, sendo que grande parte desses resíduos são hidrofóbicos e positivamente carregados (Barra & Simmaco, 1995; Simmaco, 1999). Tais peptídeos ainda apresentam uma conformação em  $\alpha$ -hélice anfipática, um momento hidrofóbico elevado, e uma ampla face apolar contrastando com uma pequena face polar (Oren & Shai, 1999), mas, no entanto, não apresentam nenhum consenso em suas seqüências que permita associar com sua atividade biológica (Conlon *et al.*, 2005).

A eficácia dos peptídeos é modulada por uma série de propriedades estruturais do próprio peptídeo mencionadas acima, como a presença de uma

grande quantidade de resíduos hidrofóbicos e positivamente carregados, o que confere afinidade com os fosfolípidios negativamente carregados presentes em membranas bacterianas; a conformação em  $\alpha$ -hélice anfipática, que promove o alinhamento de cadeias polares de um lado e de resíduos hidrofóbicos no lado oposto da hélice, favorecendo assim a interação entre peptídeos e a estrutura anfipática da membrana; um momento altamente hidrofóbico e uma ampla face apolar (Nascimento *et al.*, 2004). Dessa forma, tanto as estruturas primárias quanto as secundárias estão diretamente relacionadas com a sua atividade biológica. Por exemplo, as aureinas, citropinas, uperinas e maculatinas são peptídeos lineares, pequenos (apresentam menos de 20 resíduos de aminoácidos), catiônicos, possuem pelo menos dois resíduos básicos nas posições 7 e 8, a região C-terminal não se encontra amidada e apresentam atividade antibacteriana e antitumoral (Apponyi *et al.*, 2004).

A maioria dos peptídeos antimicrobianos de anfíbios é composta por L-aminoácidos, entretanto alguns peptídeos contendo D-aminoácidos já foram isolados da secreção cutânea dos anuros (Mignigna *et al.*, 1998). De forma geral, a atividade antimicrobiana presente nesses peptídeos não está relacionada com a interação com receptores ou com outro centro quiral, uma vez que D-isômeros se mostraram tão ativos quanto os seus respectivos isômeros de conformação L (Feder *et al.*, 2000; Krugliak *et al.*, 2000). Peptídeos antimicrobianos têm como alvo preferencial a matriz lipídica ao invés de proteínas, uma vez que peptídeos enantioméricos compostos por D-aminoácidos são tão potentes quanto compostos por L-aminoácidos que ocorrem naturalmente, indicando que moléculas quirais não estão envolvidas na ação microbida (Matsuzaki, 1999).

A diversidade de peptídeos antimicrobianos descoberta é tão vasta que há grande dificuldade em classificá-los de forma eficiente, a não ser com base na sua estrutura secundária. Tal diversidade provavelmente é um reflexo da adaptação da espécie a um ambiente único rico em microorganismos que caracteriza o nicho ocupado pela espécie, incluindo também os microorganismos associados às fontes alimentares (Zasloff, 2002).

O princípio estrutural fundamental reside na habilidade da molécula em adotar formatos nos quais regiões com aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos estejam organizadas resultando numa conformação antipática. (Zasloff, 2002).

Os peptídeos antimicrobianos de anuros geralmente estão classificados em três famílias, de acordo com suas características estruturais:

- A primeira família contém peptídeos lineares, formadores de  $\alpha$ -hélice, sem cisteínas, onde estão incluídas as magaininas e as dermaseptinas. Esse grupo apresenta ação contra bactérias, fungos e protozoários em contraste com baixa atividade contra células humanas (Zasloff, 1987; Mor *et al.*, 1991; Feury *et al.*, 1998; Batista *et al.*, 1999).

- A segunda família engloba quatro grupos de peptídeos relacionados e isolados de diversas espécies da família Ranidae. Todos contêm dois resíduos de cisteínas na porção C-terminal envolvidos na formação de uma ponte dissulfeto intracadeia (Wang *et al.*, 2005) e ainda possuem um motivo estrutural composto por um segmento catiônico heptapeptídico. Brevininas, esculetinas e gaegurinas pertencem a essa família (Morikawa *et al.*, 1992; Simmaco *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1994).

-A terceira família é representada pelas temporinas, que foram inicialmente isoladas de *Rana temporaria*, e engloba os menores peptídeos antimicrobianos descritos (Simmaco *et al.*, 1996). As temporinas contêm cerca de 10 a 13 resíduos de aminoácidos e estão presentes na secreção cutânea de espécies do gênero *Rana*. São moléculas anfipáticas, hidrofóbicas, catiônicas, com conformação em  $\alpha$ -hélice e contêm o grupo CONH<sub>2</sub> na porção C-terminal. Esses peptídeos possuem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, apresentam uma clássica atividade na bicamada da membrana, tanto na sua conformação L (natural) ou D (sintética). L-temporinas aumentam a permeabilidade da membrana bacteriana através da formação de aberturas do tipo poros, causando o extravasamento de pequenas moléculas e levando à morte celular (Pukala *et al.*, 2006).

Dentre as várias substâncias encontradas na pele de anfíbios, peptídeos isolados da família Phyllomedusinae se destacam por apresentar uma potente atividade bactericida e de cicatrização, além de possuírem relevância bioquímica. Tais peptídeos foram denominados dermaseptinas. Eles se caracterizam por serem poli-catiônicos com conformação em  $\alpha$ -hélice em meio apolar, e por possuírem atividade lítica contra bactérias, protozoários e fungos na faixa micromolar de concentração. As dermaseptinas apresentam uma série

de vantagens sobre os antibióticos existentes, como a habilidade de matar as células-alvo rapidamente e possuírem um amplo e incomum espectro de ação, além de serem eficientes contra linhagens multi-resistentes de patógenos (Batista *et al.*, 1999). Elas atuam como ionóforos e criam poros transientes nas membranas, o que permite a passagem de moléculas com baixa massa molecular, levando à lise celular (Lorin *et al.*, 2005).

Devido a essas características, é esperado que as dermaseptinas não contribuam na seleção de linhagens resistentes, podendo ser consideradas uma promissora fonte alternativa de antibióticos e ainda usadas como protótipos na síntese de novas drogas (Batista *et al.*, 1999).

A maioria dos peptídeos antimicrobianos é sintetizada como um pré-pró-peptídeo (*signal-spacer*) contendo uma seqüência sinal N-terminal, um pró-segmento e um peptídeo catiônico na região C-terminal, o qual apresentará a atividade antimicrobiana após sua clivagem (Reddy *et al.*, 2004).

A porção sinal desse precursor direciona o peptídeo para a região apropriada da glândula antes de ser clivado por uma endoprotease, liberando assim a parte inativa do peptídeo (Pukala *et al.*, 2006). A necessidade de tal mecanismo de processamento o torna seguro para ser estocado (Apponyi *et al.*, 2004).

Quando o animal é atacado, estimulado ou está doente, uma segunda endoprotease cliva o pró-peptídeo e o peptídeo maduro é então secretado na pele ou no trato gastrointestinal. Ocasionalmente, esse peptídeo pode ser citotóxico para o animal e, nesse caso, uma terceira protease o degrada e, assim, inativa esse peptídeo após um determinado intervalo de tempo sobre a pele, geralmente entre 5 a 30 minutos, de acordo com a espécie. Tal degradação envolve uma clivagem no centro do peptídeo ou a remoção de vários resíduos de aminoácidos da porção N-terminal (Pukala *et al.*, 2006).

A maioria dos peptídeos antimicrobianos e anti-tumorais apresentam como modificações pós-traducionais a glicosilação, a isomerização, o processamento proteolítico, a halogenação (Zasloff, 2002) e amidação (CONH<sub>2</sub>) da porção C-terminal (Pukala *et al.*, 2006). Como conseqüência dessa última modificação, há um aumento da carga positiva e isso parece ser importante para a sua atividade biológica. Nem todos os peptídeos antimicrobianos de anfíbios apresentam grupos CONH<sub>2</sub> na porção C-terminal.

Espécies do gênero *Rana* possuem um grande número de peptídeos antimicrobianos em sua secreção cutânea. Mais de 400 peptídeos já foram isolados até o momento. A maioria contém ligações dissulfeto na porção C-terminal e esses peptídeos catiônicos normalmente possuem o grupo CO<sub>2</sub>H na região C-terminal (Pukala *et al.*, 2006).

A função precisa do anel dissulfeto na atividade antimicrobiana do peptídeo não é sabida. Formas oxidadas e reduzidas da brevinina-1 demonstraram atividade citolítica significativa. Entretanto, no caso da esculetina-1, a forma cíclica se mostrou mais eficiente para matar bactérias do que a forma linear. De qualquer forma, interações eletrostáticas da região dissulfeto com os fosfolipídios podem ter um papel na especificidade de ação (Pukala *et al.*, 2006).

Estudos já demonstraram que o aumento da cationicidade e a manutenção do caráter de  $\alpha$ -hélice anfipática resultam no aumento da atividade bactericida contra determinados microorganismos. Acredita-se que a porção positiva dos peptídeos facilite a interação e a passagem pela parede celular da célula bacteriana, tanto de bactérias Gram-positivas, que possuem ácido teicóico, quanto de Gram-negativas, que possuem lipopolissacarídeos na sua parede (Conlon *et al.*, 2005).

Diferentes peptídeos antimicrobianos possuem diferentes espectros de atividades e sugere-se que essa diversidade seja importante para a proteção do animal contra a invasão por diferentes patógenos (Wang *et al.*, 2007), pois já foi demonstrado que animais mantidos em ambiente estéril não produzem tais peptídeos e que somente quando voltam a ser expostos ao ambiente natural a síntese dos peptídeos é observada (Mangoni *et al.*, 2001)

Em relação aos diversos compostos sintéticos criados em laboratórios, a maioria das moléculas ativas contém resíduos hidrofóbicos e catiônicos organizados de forma que a molécula apresente uma estrutura anfipática. Peptídeos naturais totalmente compostos por D-aminoácidos, ao invés de L-aminoácidos, apresentam um maior potencial antibacteriano e uma certa resistência a proteólise enzimática. Peptídeos pequenos e lineares ou cíclicos e anfipáticos que contém tanto D-aminoácidos quanto L-aminoácidos apresentam diversos graus de atividade bactericida e de seletividade. Recentemente,

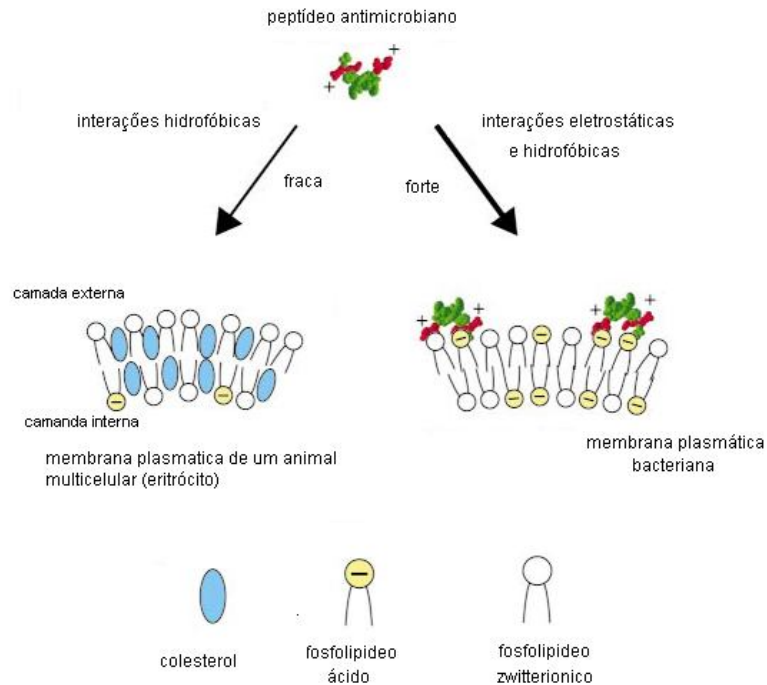
peptídeos antimicrobianos resistentes a protease constituídos de  $\beta$ -aminoácidos foram construídos (Zasloff, 2002).

## Mecanismos de Ação

Peptídeos de anuros apresentam diferentes graus de especificidade para células eucarióticas e bacterianas. Por exemplo, alguns exibem atividade bactericida de amplo espectro enquanto outros são ativos contra determinados microorganismos. No mais, há peptídeos letais para células tumorais em concentrações que são inofensivas para as células sadias. Tais ações estão relacionadas com as propriedades da membrana, incluindo fatores como composição lipídica, carga e potencial de membrana que influenciam a ligação do peptídeo e sua habilidade de permeabilização. (Apponyi *et al.*, 2004). A superfície externa da membrana bacteriana é rica em lipídeos e negativamente carregada devido às cabeças fosfolipídicas (Zasloff, 2002).

A atividade antibiótica ou anti-cancerígena resulta da ação do peptídeo sobre a barreira hidrofóbica-hidrofílica da membrana da célula, levando à lise da bactéria ou da célula tumoral (Pukala *et al.*, 2006) e, uma vez que, os D-isômeros têm sua atividade comparável com a forma natural L-, pode-se excluir assim interações com receptores quirais específicos (Apponyi *et al.*, 2004). Tais interações geralmente ocorrem em concentrações inferiores à necessária pra lisar uma célula eucariótica normal (Pukala *et al.*, 2006). Mas o mecanismo exato de ação ainda é bastante controverso. Dados obtidos sugerem que o arranjo estrutural anfipático possui um papel importante nesse mecanismo (Reddy *et al.*, 2004). Por serem de natureza catiônica, esses peptídeos reconhecem preferencialmente fosfolipídios e se ligam aos negativamente carregados, como fostatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e cadiolipinas, presentes na membrana bacteriana enquanto estabelecem interações fracas com os lipídios “zwitteriônicos” e neutros como fosfatidilcolina e esfingomiéline, expostos nas células de mamíferos. Os peptídeos ainda podem se ligar a moléculas de ácido siálico e a lipopolissacarídeos negativamente carregados, localizados na superfície de eritrócitos e na

membrana externa de bactérias Gram-negativas, respectivamente (Zasloff, 2002).

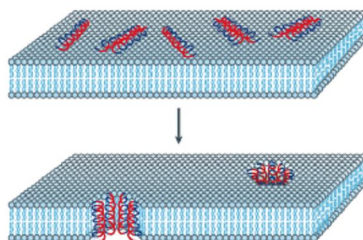


**Figura 2.** Modelo de interação entre peptídeos antimicrobianos e membranas celulares bacteriana e eucariótica (Modificado de Zasloff, 2002).

Uma série de diferentes mecanismos já foi proposta para explicar a permeabilização da membrana e a lise, mas existem alguns modelos principais (Pukala *et al.*, 2006):

**Modelo *barrel-stave*:** nesse modelo, o peptídeo anfipático e helicoidal se liga paralelamente na parte externa da bicamada lipídica, e depois penetra nessa bicamada para induzir a formação de poros que são orientados perpendicularmente ao plano da bicamada (Pukala *et al.*, 2006), através de atrações eletrostáticas entre os resíduos carregados e sítios iônicos da bicamada (Apponyi *et al.*, 2004) (Figura 3). Um mínimo de 20 resíduos de aminoácidos é necessário para atravessar a bicamada, mas já foi registrado que peptídeos menores são capazes de se dimerizar, resultando assim na

penetração na barreira (Pukala *et al.*, 2006). O tamanho do poro é aumentado com o progressivo recrutamento de mais monômeros (Nascimento *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Representação esquemática do modelo *barrel-stave*. Os peptídeos se acumulam e se inserem na bicamada lipídica de forma que as regiões hidrofóbicas dos peptídeos fiquem alinhadas com a região lipídica, e as regiões hidrofílicas dos peptídeos acabam localizadas no interior do poro. Regiões hidrofílicas dos peptídeos estão representadas em vermelho, e regiões hidrofóbicas estão representadas em azul (Retirado de Brogden, 2005).

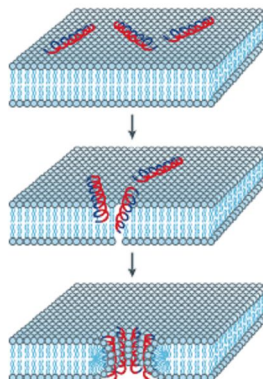
Peptídeos com atividade antibiótica como alamenticina (20 resíduos), cecropina p1 (31 resíduos) e a gramicidina (15 resíduos) obtida do *Bacillus brevis* apresentam o mecanismo de ação descrito acima (Rozek *et al.*, 2000).

**Modelo do poro toroidal:** sugeriu-se um outro modelo que envolve os peptídeos que interagem fortemente com lipídios e resulta na formação de poros toroidais. Esse modelo explica tanto a organização de poros aquosos quanto a manutenção das interações entre peptídeos e lipídios. Peptídeos formadores de  $\alpha$ -hélice são dispostos perpendicularmente na bicamada, mas permanecem fortemente ligados aos grupos lipídios por toda sua extensão, devido ao rearranjo dos lipídios. Como resultado, tem-se a formação de poros aquosos por onde os íons fluem (Figura 4). As magaininas parecem atuar por esse tipo de mecanismo (Ludtke *et al.*, 1996).

A estrutura em  $\alpha$ -hélice dos peptídeos parece estar intimamente relacionada com a atividade bacteriana, uma vez que, é a responsável pela sua inserção na membrana bacteriana. Entretanto, já foi observado que diastereoisômeros, que são peptídeos contendo L- e D-aminoácidos e por isso apresentam uma estrutura helicoidal alterada, atuam de forma semelhante aos



L-peptídeos, indicando que a conformação helicoidal nem sempre se faz necessária para a atividade microbicida (Shai, 1999).



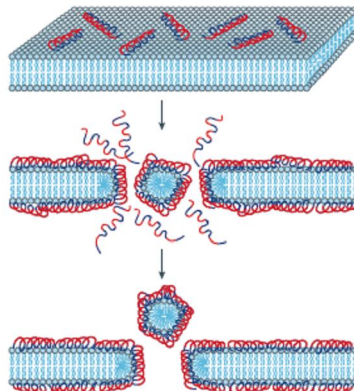
**Figura 4.** Representação esquemática do modelo do poro toroidal. Nesse modelo os peptídeos se agregam e induzem a monocamada lipídica a se curvar continuamente através do poro de forma que a passagem hidrofílica do canal é resultado do alinhamento das faces polares dos peptídeos inseridos e das cabeças dos lipídios. Regiões hidrofílicas dos peptídeos estão representadas em vermelho, e regiões hidrofóbicas estão representadas em azul (Retirado de Brogden, 2005).

**Modelo *carpet-like*:** esse modelo foi proposto inicialmente para descrever o modo de ação das dermaseptinas. Primeiramente, os peptídeos se depositam na superfície da membrana e a recobrem de forma semelhante a um carpete. Inicialmente, há uma ligação preferencial entre os monômeros do peptídeo e as cabeças dos fosfolipídios. Em seguida, há um alinhamento dos peptídeos na superfície da membrana de forma que a sua porção hidrofílica fique voltada para as cabeças dos fosfolipídios. Finalmente, os peptídeos se inserem na bicamada levando à sua desintegração através do rompimento da integridade da membrana biológica (Figura 5) (Reddy *et al.*, 2004), devido à alta pressão osmótica na célula (Rozek *et al.*, 2000).

Os peptídeos permanecem ligados à interface da membrana e o rompimento da bicamada se dá por um efeito do tipo detergente. Após uma determinada concentração, buracos são formados devido à tensão na bicamada e a membrana se degrada em complexos do tipo micela (Pukala *et al.*, 2006).

A dermaseptina b (34 resíduos) isolada de anuros do gênero *Phyllomedusa* e a melitina (26 resíduos) encontrada na peçonha das abelhas

são exemplos de peptídeos que tem sua ação descrita pelo modelo *carpet-like* (Rozek *et al.*, 2000).



**Figura 5.** Representação esquemática do modelo *carpet-like*. Nesse modelo, os peptídeos rompem a membrana se orientando paralelamente à superfície da bicamada lipídica formando assim uma extensa camada ou carpete. Regiões hidrofílicas dos peptídeos estão representadas em vermelho e regiões hidrofóbicas estão representadas em azul (Retirado de Brogden, 2005).

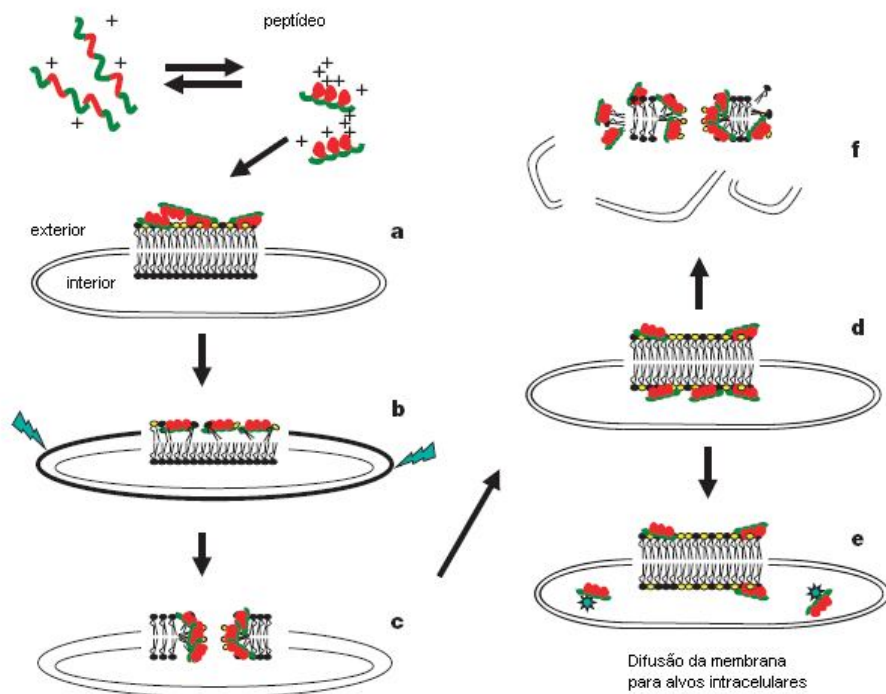
Todos os modelos propostos causam rompimento da membrana, resultando num fluxo excessivo de íons e de pequenas moléculas através dessa membrana e, por fim, acabam promovendo a lise celular (Pukala *et al.*, 2006).

**Modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH):** esse modelo está emergindo como sendo uma visão unificada. O modelo possui uma série de vantagens, pois acomoda a ação de pequenos peptídeos que não conseguem ultrapassar a membrana e assim não podem atuar na formação de poros como no modelo *barrel-stave*. O mecanismo de ação das temporinas, peptídeos menores, pode ser explicado através desse modelo (Rinaldi, 2002).

O modelo SMH sugere duas possíveis formas de ação contra o patógeno-alvo: rompimento de membrana ou interação com alvos intracelulares (Wang *et al.*, 2005). Estudos indicam que os peptídeos podem se ligar a alvos intracelulares, como DNA e RNA, e interferir na suas funções metabólicas (Rinaldi, 2002).

Esse modelo propõe uma interação do peptídeo com a membrana seguido de um deslocamento dos lipídios, uma alteração estrutural da membrana e, em alguns casos, na passagem do peptídeo para o interior da célula-alvo. A presença de colesterol na membrana-alvo geralmente reduz a atividade do peptídeo devido à estabilização da bicamada lipídica ou a interações entre o colesterol e o próprio peptídeo. Da mesma forma, acredita-se que o aumento da força iônica, que geralmente reduz a atividade da maioria dos peptídeos antimicrobianos, promova enfraquecimento das interações eletrostáticas necessárias para o início do processo (Zasloff, 2002).

Tal mecanismo (Figura 6) envolve tanto a formação de carpete quanto de poro (Zasloff, 2002). As moléculas de peptídeos aderem à membrana externa dos microorganismos, causando o seu adelgaçamento. A bicamada é esticada e ocorre a formação de poros, permitindo a passagem dos peptídeos para o citoplasma celular, atingindo possíveis alvos intracelulares. Finalmente, a membrana tem a sua integridade perdida (Nascimento *et al.*, 2003). Geralmente, peptídeos que atuam por esse mecanismo são letais para microorganismos em concentrações da ordem de micromolares (Zasloff, 2002).



**Figura 6.** Modelo *Shai-Matsuzaki-Huang*: a) Formação de um carpete de peptídeos na face externa da membrana; b) Integração do peptídeo à membrana e afinamento da face externa; c) Formação de poros transitórios; d) Transporte de lipídeos e peptídeos para a face interna; e) Difusão dos peptídeos para alvos intracelulares (em alguns casos); f) Colapso da membrana em fragmentos e perturbação física da membrana da célula-alvo. Lipídeos com as cabeças em amarelo são negativamente carregados. Lipídeos com as cabeças em preto não apresentam cargas (Modificado de Zasloff, 2002).

Independente do mecanismo de ação, uma despolarização letal da membrana bacteriana, a formação de poros que provocam o extravasamento do conteúdo celular, a ativação de processos letais como a indução de hidrolases que degradam a membrana, a desorganização da distribuição de lipídeos na membrana que resulta na perturbação do funcionamento normal da membrana, e danos a alvos intracelulares após a entrada do peptídeo na célula resultam na lise da célula bacteriana. (Apponyi *et al.*, 2004, Zasloff, 2002).

## Aplicações

Muitos antibióticos disponíveis no mercado atualmente são fabricados a partir de produtos de origem fúngica e muitas linhagens bacterianas já apresentam resistência a tais drogas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Uma possível solução seria o uso de novos antibióticos totalmente diferentes dos já utilizados, os quais vem se revelando cada vez mais ineficazes. Os peptídeos antimicrobianos são excelentes candidatos, uma vez que seu mecanismo de ação é completamente diferente dos mecanismos encontrados nas drogas atualmente comercializadas (Schoröde, 1999; Gottler & Ramamoorthy, 2008).

Entretanto, algumas espécies dos gêneros *Morganella* e *Serratia* não expressam na superfície externa de suas membranas uma densidade de lipídios ácidos apropriada, que permita a interação com os peptídeos. Outra espécie resistente como a *Porphyromonas gingivalis* secreta proteases digestivas que acabam destruindo os peptídeos antimicrobianos. Estudos sobre esse tipo de resistência adquirida contra peptídeos antimicrobianos identificaram alguns genes que, uma vez corrompidos (*disrupted*), tornam os organismos mais suscetíveis a um determinado peptídeo antimicrobiano, e tais genes geralmente estão envolvidos com a virulência do microorganismo (Zasloff, 2002). De qualquer forma, como o alvo de ação do peptídeo é a membrana bacteriana, o microorganismo teria que reestruturar toda a sua membrana, alterando sua composição e a organização dos lipídeos, e isso seria uma solução altamente dispendiosa para a maioria das espécies microbianas. Já a destruição do peptídeo apresenta uma série de problemas,

pois a maioria é criada a partir de seqüências não definidas de aminoácidos que não apresentam um epítipo, o qual poderia servir como um sítio de reconhecimento para uma possível protease encarregada de destruir o peptídeo. Além disso, organismos multicelulares atacam os microorganismos com múltiplos peptídeos de diferentes classes estruturais e a destruição de um único tipo de peptídeo pelo microorganismo não é suficiente para contornar o ataque. Com isso, os genes de virulência expressos pelas bactérias, representam a melhor defesa que os microorganismos possuem contra os peptídeos antimicrobianos (Zasloff, 2002).

Vários peptídeos de anfíbios apresentam um amplo espectro de ação (Nascimento *et al.* 2003) e a produção de antibióticos baseados em peptídeos tem se mostrado uma possível solução ao problema do aumento na resistência de linhagens patogênicas de bactérias aos antibióticos usados regularmente (Rinaldi, 2002), o qual vem sendo observado nos últimos 15 anos. Contudo é preciso contornar alguns obstáculos antes da produção de novas drogas se tornar uma realidade. Muitos peptídeos apresentam atividade citolítica contra células de mamíferos, principalmente quando administrados de forma sistêmica, possuem ainda uma meia-vida curta na circulação e há ainda a possibilidade de evocarem uma resposta imune (Conlon *et al.*, 2005). Entretanto, progressos têm sido alcançados nessa direção e novos peptídeos foram identificados que podem servir de inspiração para o desenho de análogos para prevenir ou tratar infecções (Rinaldi, 2002).

Os peptídeos ativos de membrana mais estudados são as magaininas 1 e 2. Ambos são moléculas anfipáticas e helicoidais e têm propriedades antimicrobianas, antifúngicas e anti-cancerígenas em concentrações da ordem de micromolar. Outros estudos demonstraram também atividades contra protozoários, bem como atividade espermicida (Pukala *et al.*, 2006).

Duas magaininas sintéticas, A e G, apresentaram atividade espermicida, e a maximina 3 demonstrou significativa atividade anti-HIV (Wang *et al.*, 2005).

Um derivado da magainina, denominado MSI-78, foi desenvolvido e recomendado para uso tópico no tratamento de úlceras poli-microbianas causada pelo diabetes (Hancock & Chapple, 1999), não tendo sido sua comercialização aprovada pelo *U.S Food and Drug Administration*.

O peptídeo ativo de membrana caerina 1, obtido de rãs Australianas do gênero *Litoria*, é um antibiótico de amplo espectro e tem se mostrado um poderoso agente tumoricida, mostrando atividade em concentrações da ordem de micromolar contra todas as células tumorais humanas testadas pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI) e ainda apresenta atividade antiviral contra vírus que possuem envelopes, tais como, Herpes e HIV, além de promover a morte de nematóides e inibir a síntese neuronal de óxido nítrico. Os dados sugerem que os peptídeos derivados de anfíbios podem atingir células dendríticas contaminadas pelo HIV e destruí-las antes do vírus atingir as células T (Pukala *et al.*, 2006).

Já concentrações na ordem de micromolares de dermaseptinas são capazes de lisar bactérias e fungos, e tem se mostrado bastante eficientes contra fungos filamentosos que causam infecções oportunistas letais, devido ao uso de medicamentos imunossupressores ou à síndrome da imunodeficiência adquirida (Mor *et al.*, 1994).

Derivados da dermaseptina S3 mostraram-se capazes de afetar a viabilidade do parasita intraeritrócítico *Plasmodium falciparum*, conhecido agente etiológico da malária, sem provocar a lise da célula hospedeira (Krugliak *et al.*, 2000).

A dermaseptina S4 apresenta um amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos, parasitas e ainda contra o vírus envelopado do herpes, HSV-1. O aumento da carga positiva e a redução da hidrofobicidade do peptídeo nativo resultam numa atividade microbicida mais seletiva e na redução da toxicidade em células de mamíferos (Lorin *et al.*, 2005).

Derivados da dermaseptina S4 podem ser utilizados como moléculas de endereçamento para drogas terapêuticas. O derivado K4-S4(1-13) estabelece ligações com a membrana citoplasmática de células vermelhas do sangue e pode atuar como um “peptídeo-gancho”: a droga com função terapêutica é anexada à K4-S4(1-13), que se liga à membrana das células vermelhas. A droga anexada é então espontaneamente transferida para a molécula-alvo com a qual possui uma maior afinidade como, por exemplo, algum receptor (Feder, *et al.*, 200).

O maior interesse da área farmacêutica está voltado para o desenvolvimento de agentes de uso tópico, como o pexiganan, também

conhecido como MSI-78, análogo da magainina 2, principalmente por se tratar de uma terapia relativamente segura devido à incerteza acerca da toxicologia a longo prazo de novas drogas administradas de forma sistêmica. Um dos maiores impedimentos do uso de peptídeos antimicrobianos em terapias sistêmicas é que, apesar de se mostrarem ativos *in vitro*, sua eficácia em modelos animais geralmente é bem próxima da dose tóxica, gerando assim uma margem de segurança não aceitável (Zasloff, 2002, Gottler & Ramamoorthy, 2008).

Análogos de peptídeos antimicrobianos de plantas e animais ou ainda novos compostos inspirados em suas estruturas já foram sintetizados e é esperado que cada vez mais novos compostos sejam sintetizados. A química combinatória tem se mostrado uma poderosa ferramenta para o desenho de novas moléculas a partir de compostos que possam ser otimizados, potencializando sua atividade contra alvos selecionados e minimizando sua toxicidade para plantas ou animais e sua susceptibilidade a proteases (Zasloff, 2002; Montesinos, 2007).

Algumas outras aplicações possíveis atribuídas aos peptídeos catiônicos incluem o tratamento de infecções em peixes, a conservação de alimentos e de flores, medicações contra vírus envelopados e células cancerígenas, aerossol contra infecções pulmonares causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Alguns ainda impedem a infecção por agentes causadores de doenças sexualmente transmissíveis, como *Nisseria*, *Chlamydia*, e limitam também o crescimento de colônias de microorganismos em materiais de polímero sintético comumente usado em cateteres intravenosos. Também podem ser secretados por microorganismos atuando como ingredientes ativos de biopesticidas comerciais (Hancock, *et al.*, 1998; Hancock & Chapple, 1999; Zasloff, 2002; Montesinos, 2007).

A introdução e expressão de genes de peptídeos antimicrobianos de anuros em plantas estão surgindo como uma fascinante aplicação biotecnológica. Estudos demonstraram que esses peptídeos também apresentam ação contra uma série de patógenos de plantas e assim podem contribuir para melhorar a resistência da planta contra fitopatógenos. A expressão da magainina modificada Myp30 no tabaco transgênico reduziu

significativamente o tamanho da lesão causada pelo oomiceto *Peronospora tabacina* e a sua capacidade de esporulação (Rinaldi, 2002).

Já foi registrado também a bem sucedida expressão da esculetina-1 em plantas de tabaco. Tal peptídeo confere resistência contra *Pseudomonas syringae* (Rinaldi, 2002).

A taxonomia também tem se utilizado de peptídeos para uma classificação mais exata. Muitas vezes as diferenças morfológicas entre as espécies são tão sutis que a identificação de indivíduos em regiões onde diversas espécies coexistem produzindo híbridos se torna especialmente difícil. Dessa forma, compostos bioquímicos presentes na secreção cutânea de diversos anfíbios podem fornecer informações tão importantes quanto às seqüências de DNA (Bevier *et al.*, 2004)

Está se tornando bastante evidente que peptídeos antimicrobianos de anfíbios têm uma vasta aplicação terapêutica e biotecnológica e seu potencial está além do que já foi sugerido (Rinaldi, 2002). Estudos clínicos e laboratoriais confirmam que o surgimento de resistência contra peptídeos bioativos é menos provável do que o observado com antibióticos convencionais, o que tem estimulado o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com base em peptídeos, tanto naturais quanto sintetizados em laboratórios (Zasloff, 2002).

É preciso destacar também que apenas algumas poucas espécies de anuros já tiveram seus peptídeos isolados e caracterizados (Nascimento *et al.* 2003) e com isso mais pesquisas nessa área se fazem necessárias. (Rinaldi, 2002).

### ***Eupemphix nattereri* (Steindachner, 1863)**

Em 1863, Steindachner descreveu o gênero *Eupemphix* para as espécies de *E. nattereri* encontradas em Cuiabá, no Mato Grosso. Em 1970, Lynch reuniu as espécies dos gêneros *Engystomops* (Jiménez-de-la-Espada, 1872), *Eupemphix* (Steindachner, 1863) e *Physalaemus* (Fitzinger, 1826) em um único gênero, denominado *Physalaemus* (Nascimento *et al.*, 2005).

Em 2005, Nascimento *et al.* redefiniram os grupos de espécies do gênero *Physalaemus* com base em características de morfometria, morfologia



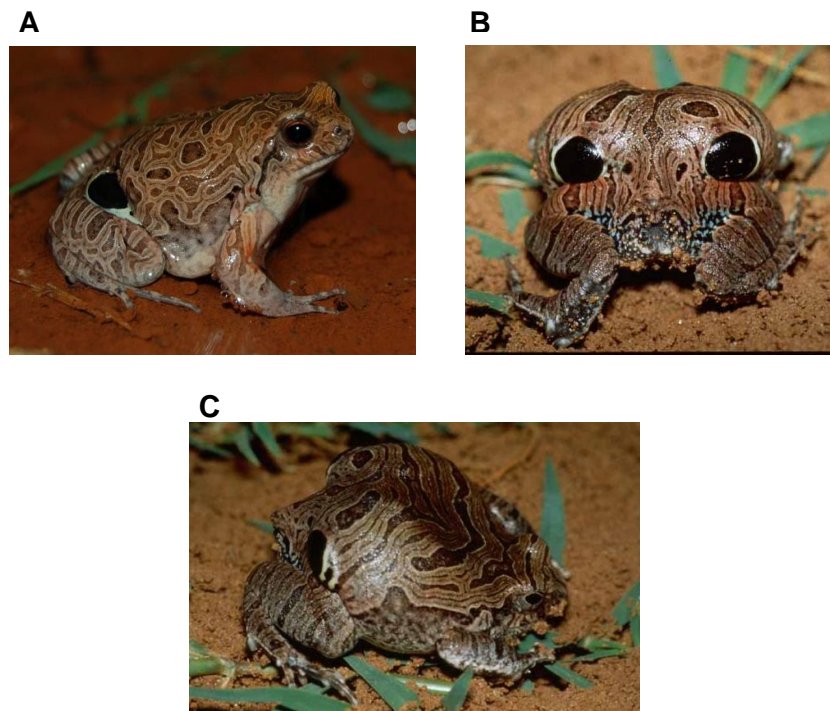
externa, padrão de desenho e osteologia, e com isso o gênero *Eupemphix* (Steindachner, 1863) foi revalidado para acomodar a espécie *E. nattereri*, a qual atualmente pertence à família Leiuperidae, proveniente da família Leptodactylidae (Grant et al. 2006).

Até 2005, a família Leptodactylidae era considerada uma grande e desajeitada família Neotropical. Em 1996, Ruvinsky e Maxson sugeriram que Leptodactylidae (sensu lato) tratava-se de um grupo polifilético, de forma que em 2006, Frost *et al.* dividiram a família Leptodactylidae em diversas famílias reformuladas: Calyptocephalellidae, Leptodactylidae, Ceratophryidae e Cycloramphidae. Subsequentemente, Grant *et al.* em 2006 subdividiu a família Cycloramphidae em Cycloramphidae e Hylodidae, e a família Leptodactylidae em Leptodactylidae e Leiuperidae, considerando esse último táxon como um táxon irmão de Bufonidae + Hylodidae + Dendrobatoidea. Atualmente, a literatura disponível para a família Leiuperidae mescla-se profundamente com a de Leptodactylidae (Frost, 2009).

A forma de reprodução da maioria das espécies é deposição de ovos em bolsas de espuma feitas pelo macho, que esfrega rapidamente o muco presente no dorso e região inguinal da fêmea. Esta espuma possui propriedades que protegem os ovos contra a ação de microorganismos e ressecamento, favorecendo assim a espera de maior volume de água para os girinos. Estas bolsas de espuma são feitas principalmente por espécies dos gêneros *Leptodactylus*, *Pleurodem*, *Physalaemus* e *Eupemphix* e, após um período variável entre um ou alguns dias, os ovos eclodem e os girinos nascem e completam o seu ciclo em lagos temporários, lagoas ou riachos (Freitas e Silva, 2007).

O anuro *Eupemphix nattereri* é popularmente conhecido como rã-piadeira. É uma espécie de 4,0 cm de comprimento rostro-cloacal. Possui colorido de fundo cinza-prateado com diversas estrias negras espalhadas por todo o corpo. É uma espécie típica dos cerrados do Brasil Central, mas também encontrada nas áreas de transição entre a caatinga e o cerrado do oeste da Bahia e Piauí (Freitas e Silva, 2007). Exemplares testemunhos estão depositados na coleção científica da Universidade de Brasília, com a identificação CHUNB-26437.

Uma de suas características mais notáveis é a presença, tanto em indivíduos machos quanto fêmeas, de um par de glândulas arredondadas e negras na região inguinal. Estudos demonstram que o comportamento de defesa dessa espécie ocorre em duas etapas (Figura 7). Quando ameaçado, *E. nattereri* geralmente apresenta um comportamento característico que consiste no inchaço lateral do corpo devido ao inflamento dos pulmões, em seguida, o animal vira de costas para o agente que oferece perigo e eleva a parte traseira. Nessa posição, as glândulas negras inguinais ficam expostas juntamente com o cóccix, dando a impressão de se tratar de uma face com grandes olhos negros. Tal efeito visual de alerta, muitas vezes já é suficiente para desencorajar o ataque de potenciais predadores visualmente orientados. Caso esse comportamento não seja suficiente e o predador insista no ataque, no momento da mordida, sua mucosa oral entra em contato com a secreção expelida pelas glândulas do anfíbio, causando assim seu envenenamento (Lenzi-Mattos *et al.*, 2005).



**Figura 7.** *Eupemphix nattereri*. A) Vista lateral normal, B) e C) Durante comportamento de defesa com exibição das glândulas inguinais. B) vista traseira e C) vista lateral (Retirado de Lenzi-Mattos *et al.*, 2005).

## Justificativa

A secreção cutânea de anuros tem se mostrado bastante rica quimicamente e diversos peptídeos com atividade antimicrobiana já foram isolados e caracterizados. A existência de diferentes peptídeos de defesa na pele de anuros de uma única espécie é surpreendente, e pode ser resultado de uma seleção evolucionária que forneceu uma eficiente proteção contra um amplo espectro de microorganismos. Estudos sobre o isolamento de novos peptídeos e seus mecanismos de ação são de grande interesse. (Barra & Simmaco, 1995).

A América Latina contém uma extensa fauna de anuros e apenas poucas espécies foram estudadas até o momento. O conhecimento sobre os vários aspectos da pele dos anuros pode ser muito produtivo, uma vez que fornece informações sobre a biologia do animal e pode ajudar em estudos de sistemática e evolucionários. Uma investigação química e farmacológica dos componentes encontrados na secreção cutânea também se mostra bastante promissora em relação à identificação de novas substâncias medicinais. (Toledo & Jared, 1995).

Pesquisas com peptídeos antimicrobianos de espécies de anfíbios encontradas no Brasil ainda são escassas. Motivado por esses fatos, o presente projeto de pesquisa visa à purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes da secreção cutânea do anuro *Eupemphix nattereri* comumente encontrado no cerrado brasileiro para aplicações terapêuticas.

## Objetivo Geral

Realizar análise peptidômica da secreção cutânea do anuro *Eupemphix nattereri* com ênfase na prospecção de peptídeos antimicrobianos para aplicações terapêuticas. Tal projeto engloba a extração e purificação de peptídeos bioativos encontrados na secreção cutânea de *E. nattereri*, bem como, a caracterização química e biológica dos peptídeos antimicrobianos isolados a fim de se avaliar seu potencial terapêutico.

## **Materiais e Métodos**

### **1. Reagentes químicos**

Apenas reagentes de grau analítico ou superior provenientes de diferentes fornecedores comerciais foram utilizados nos experimentos. Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q (Millipore Reagent Water System, USA).

### **2. Obtenção da secreção cutânea**

Exemplares adultos machos e fêmeas de *Eupemphix nattereri* foram coletados na região de Monte Alegre/GO e mantidos nas dependências do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília. A secreção cutânea foi obtida por meio de estimulação elétrica moderada de corrente contínua de até 150 V e de baixa amperagem. A secreção liberada pelo animal foi dissolvida em água Milli-Q, congelada e liofilizada. É importante ressaltar que esse procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, em 27/05/2008, e que os animais não foram mortos durante o procedimento, reassumindo seu comportamento normal em poucos minutos. A amostra seca foi separada em alíquotas contendo 5,0 mg e armazenadas a -20°C, estando assim disponíveis para o uso.

### **3. Purificação dos peptídeos**

Alíquotas de 5,0 mg da secreção bruta liofilizada foram ressuspendidas em 220 µL de TFA 0.1% (v/v) em água Milli Q (solvente A) e centrifugadas por 5 min a 14.000 rpm. Alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram aplicadas em coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (Vydac 218TP54, 4,6 x 250 mm) com fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 216 nm. As frações foram eluídas aplicando-se as seguintes condições: lavagem com TFA 0.1% (v/v) em água Milli Q (solvente A) por 5 min; gradiente linear de 0 a 60% de TFA 0.1% (v/v) em acetonitrila (solvente B) em 60 min; de 60 a 100% de solvente B em 5 min e lavagem final

por 5 min com 100% de solvente B. As frações foram coletadas manualmente, secas em Speed-Vac e armazenadas a -20°C.

As frações de interesse foram recromatografadas e acumuladas por meio de RP-HPLC em coluna C<sub>18</sub> (Shimadzu Shim-pack VP-ODS 7092605, 4,6 x 150 mm). O gradiente utilizado foi definido de acordo com o tempo de retenção da amostra na etapa preparativa. A eluição foi realizada empregando-se fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV a 216 nm. Os peptídeos foram coletados manualmente, secados a vácuo e utilizados em experimentos posteriores.

#### **4. Ensaio Hemolítico**

Esse ensaio biológico permitiu avaliar a atividade hemolítica das frações cromatográficas obtidas. Primeiramente foi realizada uma varredura empregando-se alíquotas das frações cromatográficas obtidas. As frações de interesse purificadas foram acumuladas de modo a se determinar seu HC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração capaz de provocar a hemólise de 50% das hemácias presentes na preparação.

O ensaio empregado foi modificado do protocolo descrito por Onuma *et al.* (1999). As células foram separadas do plasma por centrifugação e então foi preparada uma suspensão a 1% (v/v) de eritrócitos do sangue humano O<sup>+</sup> obtidos no Hemocentro de Brasília (lavado três vezes com NaCl 0,15 M, Tris-HCL 0,01 M pH 7.4). Cada fração cromatográfica de uma corrida preparativa de RP-HPLC foi ressuspensa em 100 µL do tampão salino e, em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) foi adicionada. Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 2 min. Alíquotas de 100 µL de cada sobrenadante foram transferidas para uma placa de fundo chato de 96 poços e a leitura se deu a 405 nm em leitora de placas (BioRad Modelo3550-UV, Hercules, CA, USA). Utilizaram-se os seguintes controles: 1% (v/v) da suspensão de eritrócitos incubada com 1% (v/v) de Triton X-100 como referência de 100% de hemólise e 1% (v/v) da suspensão de eritrócitos incubada em tampão salino como referência de 0% de hemólise.

Na determinação da HC<sub>50</sub>, o mesmo protocolo descrito acima foi empregado, sendo que foi adotada uma diluição seriada dos peptídeos,

partindo-se de uma concentração inicial de 256  $\mu\text{M}$ . Cada experimento foi realizado em triplicata. Com os resultados das diversas concentrações, construiu-se, por regressão logarítmica, uma curva de hemólise e, a partir da equação desta, determinou-se o valor da concentração capaz de promover 50% de hemólise ( $\text{HC}_{50}$ ).

## 5. Ensaio Antimicrobiano

Para verificar quais frações são ativas contra microorganismos, foi realizado um ensaio antimicrobiano inicial em meio líquido contra as bactérias patogênicas Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) obtidas do Banco de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas-SP).

Primeiramente, 150  $\mu\text{L}$  da solução estoque de bactérias foram cultivadas em 7 mL de meio Mueller-Hinton a 37°C sob agitação até atingirem  $\text{DO}_{590\text{nm}} = 1$ . As bactérias, em fase logarítmica, foram então diluídas em meio Mueller-Hinton nas proporções 1:50 para as Gram-negativas e 1:100 para as Gram-positivas. Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de cada cultura bacteriana (contendo de 2 a 7 x 10<sup>5</sup> CFUs) foram incubadas (por 20-24 h a 37°C) com 50  $\mu\text{L}$  de cada fração ressuspendida em água Milli-Q. Os controles positivos e negativos foram, respectivamente, água Milli-Q e formaldeído 0,4% (v/v) adicionados às culturas bacterianas. A inibição do crescimento se deu pela leitura da densidade óptica a 595 nm em leitora de placas (BioRad Modelo3550-UV, Hercules, CA, USA).

Também foram realizados ensaios para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração onde nenhum crescimento bacteriano é detectado por meio de leitura espectrofotométrica, dos peptídeos purificados que apresentaram atividade antimicrobiana no ensaio de varredura preliminar. A mesma metodologia descrita acima foi utilizada, sendo que foi adotada uma diluição seriada dos peptídeos, partindo-se de uma concentração inicial de 256  $\mu\text{M}$ . Cada experimento foi realizado em triplicata.

## 6. Seqüenciamento N-terminal

A estrutura primária dos peptídeos isolados foi determinada por degradação de Edman, em seqüenciador automático Applied Biosystems 477A modificado como descrito por Fontes *et al.* (1998). PTH-aminoácidos foram identificados utilizando-se coluna de fase reversa PTH-C<sub>18</sub> acoplada a equipamento de HPLC Applied Biosystems 120A. O sistema cromatográfico foi calibrado com padrões de PTH-aminoácidos antes de cada análise.

## 7. Espectrometria de Massa

Todas as frações cromatográficas foram caracterizadas com relação a sua composição peptídica/protéica por meio da determinação de suas massas moleculares experimentais em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). O procedimento foi realizado no modo refletor e foi utilizada a solução-padrão *Peptide Mix* (Bruker Daltonics) para a adequada calibração do equipamento.

As amostras analisadas foram ressuspendidas em 50 µL de solução de TFA 0,1% (v/v) e 1 µL foi plaqueado juntamente com 1 µL da matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) ressuspendida em TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v) em placa de aço inoxidável.

Os peptídeos de interesse obtidos após a etapa de recromatografia foram submetidos ao mesmo procedimento descrito acima para a verificação do grau de pureza antes da realização dos ensaios de atividade biológica.

## 8. Determinação da amidação C-terminal

A amidação da porção C-terminal dos peptídeos foi realizada por análise em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) dos peptídeos metilados de acordo com o protocolo de Esterificação de Fisher (Hunt *et al.*, 1986). Alíquotas dos peptídeos de interesse foram dissolvidas em 20 µL do reagente de HCl metanólico (10 µL de cloreto de acetila em 250 µL de metanol anidro) e incubadas à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida as amostras foram



secas a vácuo e reconstituídas em 20  $\mu$ L de 0,1% (v/v) TFA em 50% (v/v) acetonitrila para análise por MALDI-TOF MS.

## 9. Síntese Química

Os peptídeos caracterizados quimicamente no presente estudo foram obtidos por meio da síntese química manual, segundo o protocolo de Atherton & Sheppard (1989), pelo Prof. Eduardo Cilli (UNESP - Araraquara). Utilizaram-se os seguintes grupos de proteção da cadeia lateral: Boc (t-butoxicarbonil) para K; tBut (t-butil) para D, T e E e Pmc (2,2,5,7,8 pentametilchromane-6-sulfonil) para Q e N. Cada ciclo de síntese consistiu na desproteção de Na-Fmoc com piperidina/dimetilformamida 20% (v/v) durante 20 min, seguido por lavagem com diclorometano e dimetilformamida e acoplamento ao próximo resíduo. Ao final da síntese, a clivagem do peptídeo foi realizada em um coquetel contendo água ultra-pura 5% (v/v); fenol 5% (v/v); 1,2 etanoditiol 2,5% (v/v) e tioanisol 5% (v/v) em TFA, por 2 h, sob agitação. O peptídeo foi então precipitado com éter etílico gelado e filtrado em placa porosa juntamente com a resina. O peptídeo, retido na placa, foi dissolvido em solução aquosa de ácido acético 10% (v/v) e separado da resina por filtração. O filtrado foi liofilizado, solubilizado em TFA 0,045% (v/v) em água (solvente A) e purificado por RP-HPLC, utilizando-se coluna semi-preparativa (Beckman C<sub>18</sub> 1 cm x 25 cm), gradiente linear de 10 a 40% de TFA 0,036% (v/v) em acetonitrila (solvente B) durante 90 min, detecção em 220 nm e fluxo de 5 mL/min. As impurezas derivadas do processo de síntese foram retiradas por meio de RP-HPLC em coluna C<sub>18</sub> (Vydac 218TP54, 4,6 x 250 mm). A identidade do peptídeo sintético foi confirmada por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (Bruker, Autoflex II).

## 10. Dicroísmo Circular

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados em espectropolarímetro Jasco J-815 CD Espectrometer. Alíquotas dos peptídeos de interesse foram dissolvidas em água Milli e em TFE 50% (v/v). Os dados do dicroísmo circular foram registrados usando-se uma célula de 1 mm e varredura entre 190-260 nm a 25 e 37°C. Cada espectro foi obtido como a média de quatro *scans* consecutivos. Após a correção da linha de base, a

elipsidade observada,  $\delta$  (miligráus), foi convertida para a elipsidade molar média do resíduo,  $[\delta]$  (graus quadrado centímetro por decímol).

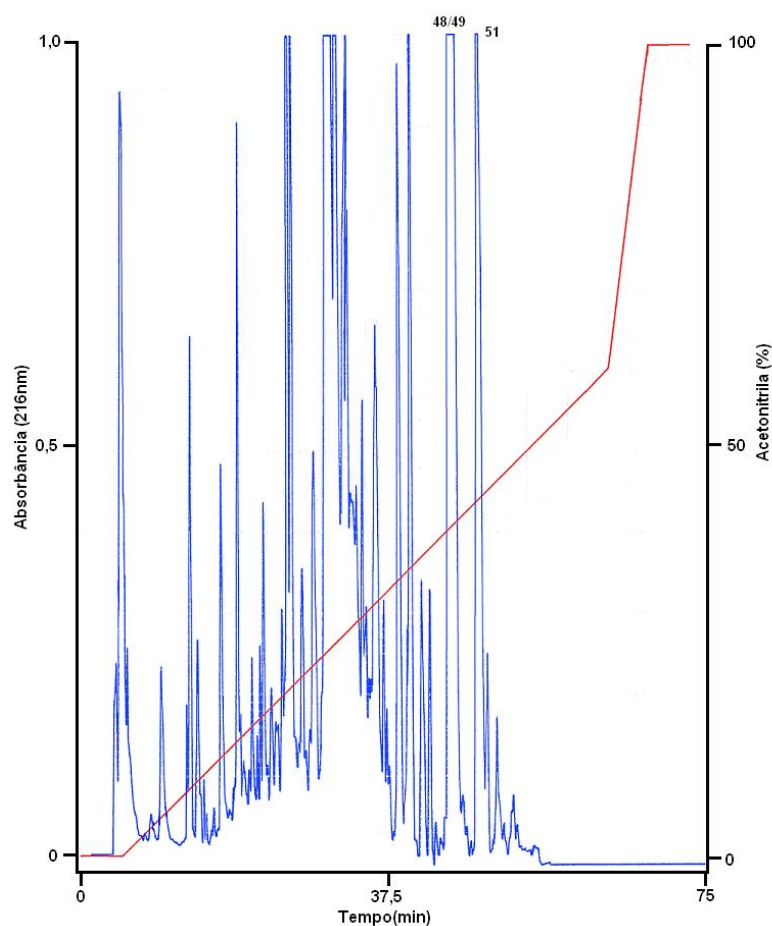
## 11. Bioinformática

Os seguintes programas foram utilizados: (1) Expasy - Compute pI/Mw ([http://au.expasy.org/cgi-bin/pi\\_tool](http://au.expasy.org/cgi-bin/pi_tool)), para cálculo das massas moleculares monoisotópicas dos peptídeos; (2) Innovagen - Peptide Property Calculator (<http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>), para cálculo das cargas dos peptídeos, considerando-se a presença de amidação C-terminal; (3) BLAST (Altschul *et al.*, 1997 - <http://au.expasy.org/tools/blast/>), para buscas por similaridade no banco de dados UniProt; (4) ClustalW (Thompson *et al.*, 1994 - <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), para alinhamentos múltiplos de seqüências de proteínas, ajustados manualmente, quando necessário e (5) o aplicativo em <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi> para projeções helicoidais dos peptídeos.

## Resultados

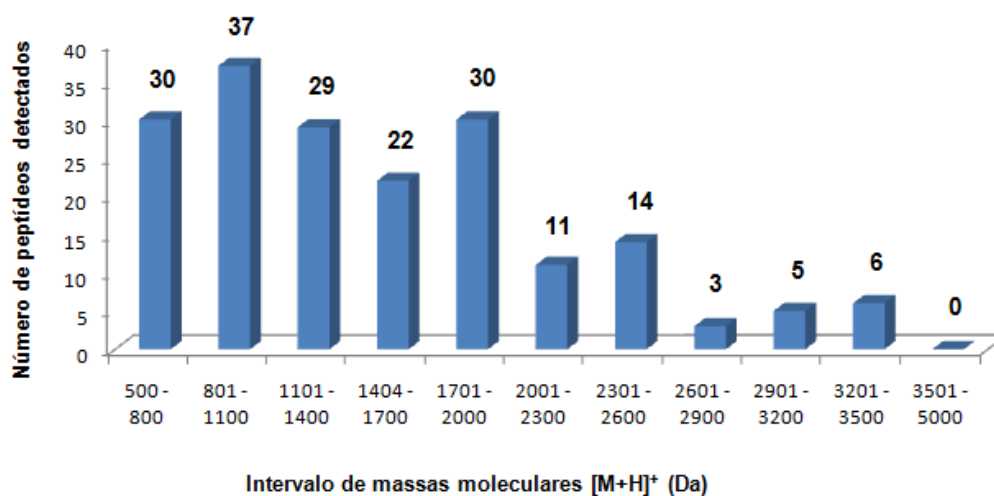
### 1) Fracionamento da secreção cutânea

Alíquotas de 5,0 mg da secreção bruta foram inicialmente fracionadas por RP-HPLC usando-se coluna C<sub>18</sub> (Vydac 218TP54, 4,6 x 250 mm). Os perfis cromatográficos obtidos apresentaram uma boa reprodutibilidade ao longo das diferentes corridas cromatográficas realizadas, resultando em cerca de 54 frações coletadas manualmente (Figura 8).



**Figura 8.** Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção bruta de *Eupemphix nattereri* em sistema de RP-HPLC com coluna C<sub>18</sub> (Vydac 218TP54, 4,6 x 250 mm), empregando-se gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila. O monitoramento das frações foi realizado a 216 nm com fluxo de 1,0 mL/min. As frações contendo os peptídeos purificados neste trabalho estão identificadas pelos respectivos números das frações. Frações 48 e 49 contêm os peptídeos de massas moleculares 3.180 Da e 3.208 Da e a fração 51 contém o peptídeo de massa molecular 3.142 Da.

As frações obtidas foram secas, ressuspensas e analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF-TOF (Autoflex II, Bruker Daltonics, Alemanha) varrendo uma faixa de  $m/z$  de 500 a 5000 Da. Os peptídeos cujas massas foram determinadas (apresentadas no Anexo 2) foram agrupados e estão representados na Figura 9, podendo-se destacar a abundância de componentes no intervalo de massas moleculares de 800 a 2000 Da presentes na secreção cutânea de *E. nattereri*.



**Figura 9.** Composição peptídica da secreção cutânea de *E. nattereri*, apresentada em intervalos de massas moleculares monoisotópicas obtidas por espectrometria de massa MALDI-TOF das frações provenientes de uma corrida de RP-HPLC.

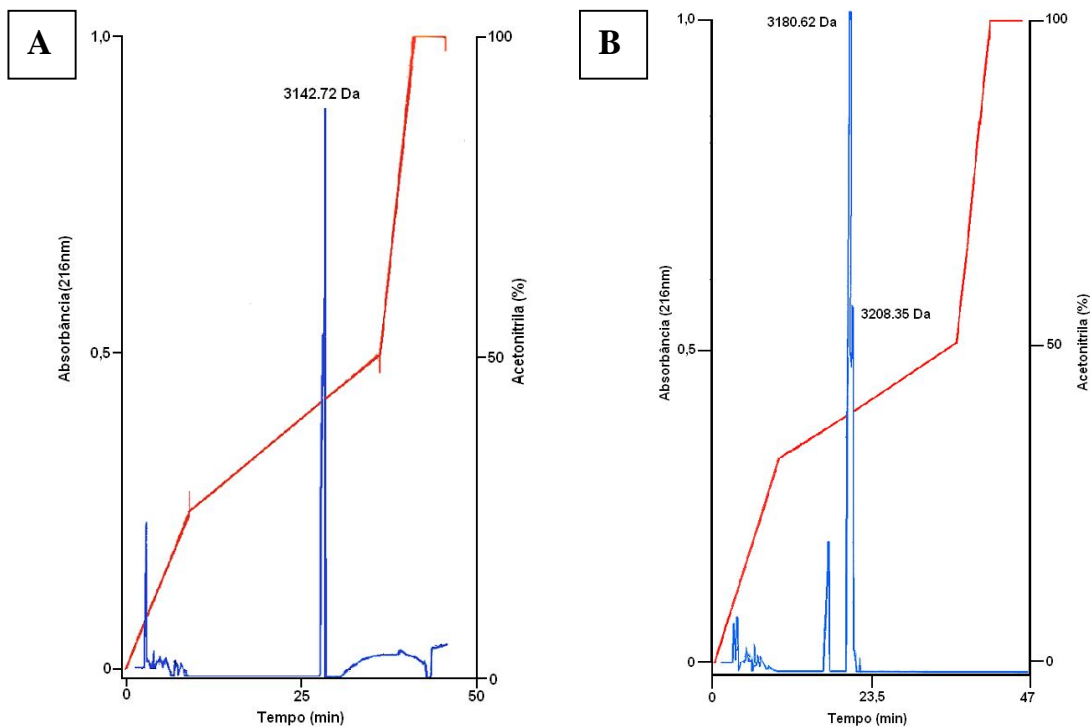
## 2) Ensaios preliminares para avaliação de atividades antimicrobiana e hemolítica

Realizaram-se varreduras a fim de se avaliar as atividades antimicrobiana e hemolítica das frações cromatográficas obtidas. Tal varredura para detecção de atividade antimicrobiana foi realizada com as bactérias *S.aureus* (Gram-positiva) e *E. coli* (Gram-negativa).

As frações referentes aos picos 48, 49 e 51 apresentaram atividade contra *S.aureus* e *E. coli*. No caso da varredura realizada a fim de se avaliar a presença de atividade hemolítica, as frações mencionadas não apresentaram atividade hemolítica significativa.

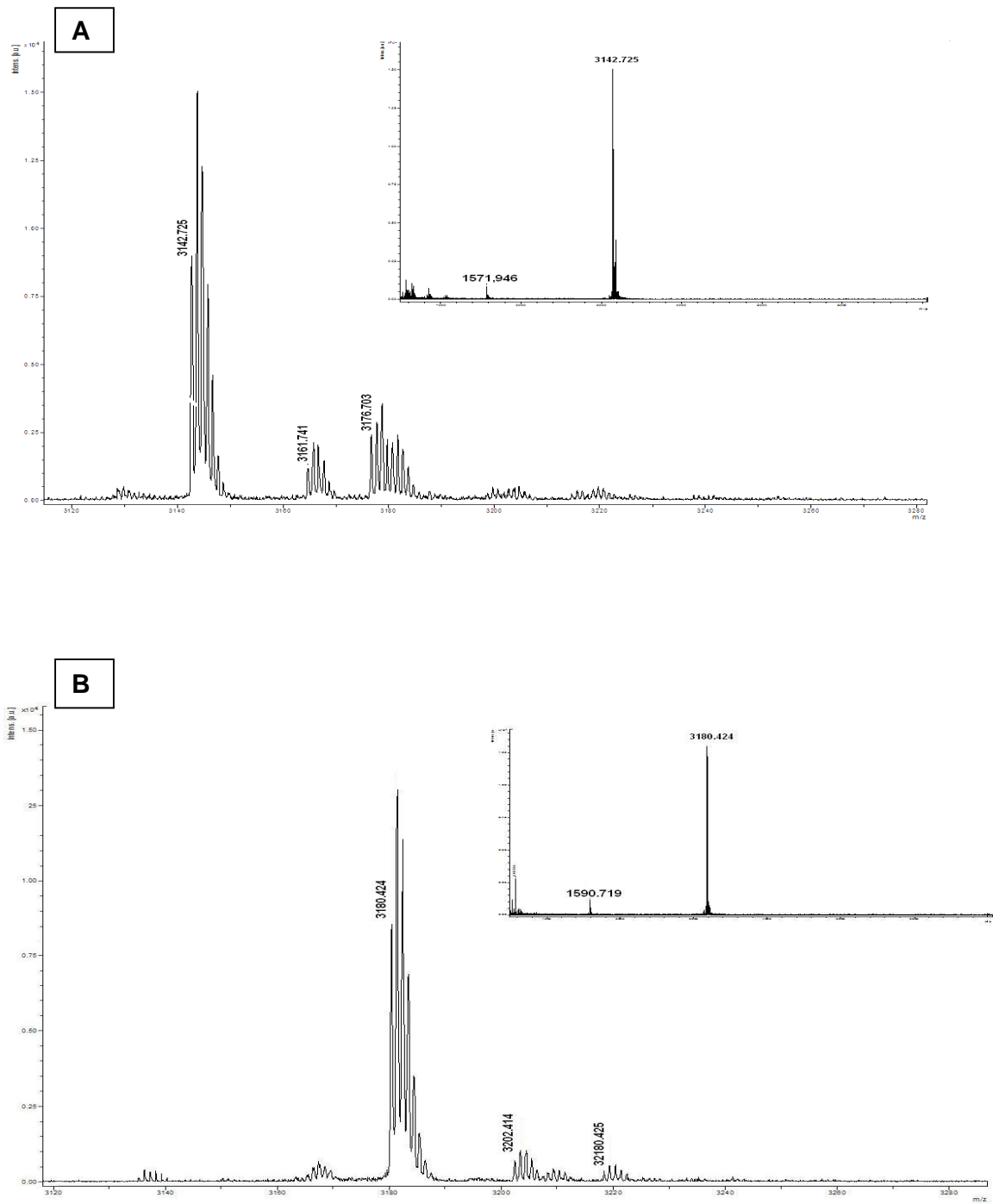
### 3) Purificação dos peptídeos de interesse

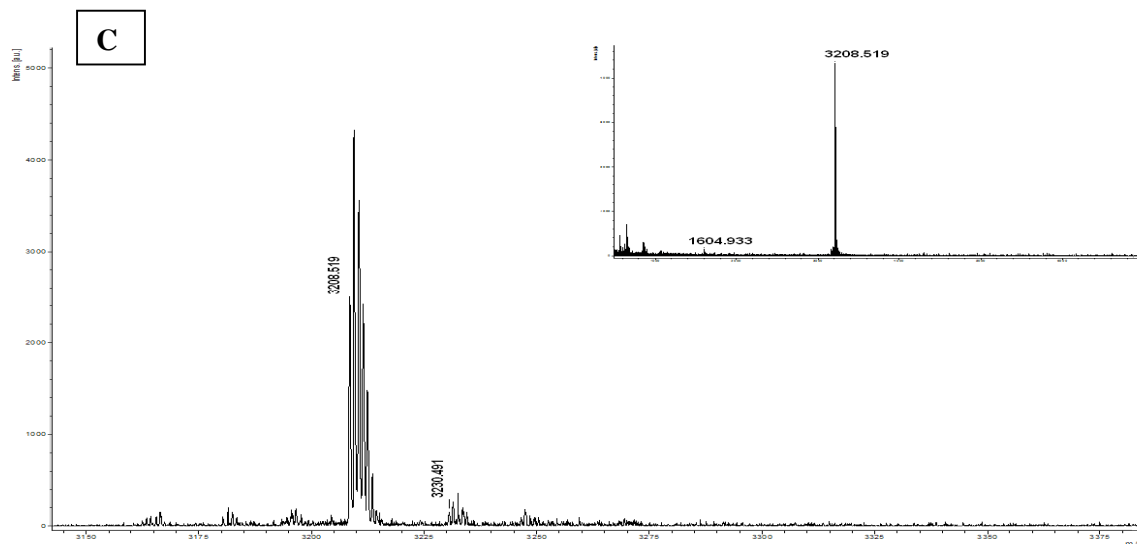
As frações contendo os peptídeos de massa monoisotópica  $[M+H]^+$  3.180 Da, 3.208 Da e 3.142 Da foram acumuladas e recromatografadas por RP-HPLC em coluna  $C_{18}$  (Shimadzu Shim-pack VP-ODS 7092605, 4,6 x 150 mm) com eluição a 1.0 mL/min de acordo com os gradientes apresentados na Figura 10.



**Figura 10.** Recromatografias dos peptídeos de interesse. As frações de massa 3.142 Da, 3.180 Da e 3.208 Da foram purificadas utilizando-se RP-HPLC em coluna  $C_{18}$  (Shimadzu Shim-pack VP-ODS 7092605, 4,6 x 150 mm) com fluxo de 1mL/min. **(A)** Purificação do peptídeo 3.142 Da por meio da aplicação do gradiente de 25-50% de acetonitrila/TFA 0,1% (v/v) por 30 minutos; **(B)** Purificação dos peptídeos 3.180 Da e 3.208 Da por meio da aplicação do gradiente de 32-50% de acetonitrila/TFA 0,1% (v/v) por 27 minutos. A detecção foi realizada a 216 nm. Os picos contendo os peptídeos purificados estão indicados por suas respectivas massas moleculares monoisotópicas  $[M+H]^+$ .

As frações resultantes das recromatografias foram analisadas quanto à sua homogeneidade por meio de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF, no modo refletor de íons positivos na faixa de massa de 500 a 7.000 Da (Figura 11).





**Figura 11.** Espectros de massa dos peptídeos: (A) 3.142 Da. As massas de 1.571 e 3.164 Da referem-se ao peptídeo duplamente carregado e ao aduto com íon sódio, respectivamente; (B) 3.180 Da. As massas de 1.590, 3.202 e 3.218 Da referem-se ao peptídeo duplamente carregado, ao aduto com íon sódio e ao aduto com íon potássio, respectivamente e (C) 3.208 Da. As massas de 1.604 e 3.230 Da referem-se ao peptídeo duplamente carregado e ao aduto com íon sódio, respectivamente.

#### 4) Caracterização química dos peptídeos

As estruturas primárias de dois dos peptídeos de interesse ( $[M+H]^+$  3.208 Da e 3.142 Da) foram determinadas por degradação de Edman em seqüenciador automático de proteínas e peptídeos modelo 477A da Applied Biosystems. De posse dos resultados da análise por espectrometria de massa e dos dados de seqüência, constatou-se que os peptídeos com massas moleculares  $[M+H]^+$  3.180 Da e 3.208 Da já haviam sido previamente identificados e denominados nattererinas por Martins, em 2005, contudo a completa purificação dos peptídeos não fora atingida. Já o peptídeo com massa molecular  $[M+H]^+$  3.142 Da revelou-se inédito. Diante dessa informação, o peptídeo 3.180 Da não foi submetido ao seqüenciamento por degradação de Edman e foi assumida a estrutura primária determinada por Martins em seu estudo.

Os peptídeos isolados no presente trabalho apresentaram as seguintes estruturas primárias:

Nattererina 1 (3.180 Da):  $^1\text{GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINKFSPQPQ}^{30}$

Nattererina 2 (3.208 Da):  $^1\text{GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINRFSPQPQ}^{30}$

Nattererina-3 (3.142 Da):<sup>1</sup>GLKDIKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ<sup>30</sup>

Também foi comprovado por meio de esterificação de Fisher que as nattererinas não apresentam a porção C-terminal amidada.

A busca por seqüências similares foi realizada usando o programa *BLAST* e o alinhamento das seqüências foi realizado usando-se o programa *ClustalW* (Figura 12). Em relação às nattererinas 1 e 2, a única diferença entre elas está no aminoácido que ocupa a posição 24. Na nattererina-1 tem-se uma lisina (K) e na nattererina-2 encontra-se uma arginina (R) nessa posição. Isso confere 96% de identidade e 100% de similaridade entre essas duas moléculas. Já quando se compara a nattererina-3 com as nattererinas 1 e 2, separadamente, observa-se 83% e 80% de identidade, respectivamente, e ambas apresentam 96,7% de similaridade com a nattererina-3.

Nattererina-1	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINKFSPQPQ	30
Nattererina-2	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINRFSPQPQ	30
Nattererina-3	GLKDI IKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ	30
	****:*****:* **:******:*****	

**Figura 12.** Alinhamento comparativo entre as estruturas primárias das nattererinas.

Cada um dos peptídeos isolados foi comparado com outros peptídeos similares que foram identificados pela busca usando-se a ferramenta *BLAST*. Tal análise demonstrou que em relação à nattererina-1, o peptídeo ranatuerina-1T, isolado de *Rana temporaria* (Goraya *et al*, 1999) possui 63% de similaridade e a gaegurina-2, isolada de *Rana rugosa* (Park *et al*, 1994) apresenta 60% de similaridade, e quando comparado com a ranatuerina-2BYa, isolada de *Rana boylei* (Conlon *et al*, 2003), observa-se uma taxa de similaridade de 56%. A análise evidenciou também que a syphaxina, isolada de *Leptodactylus syphax* (Dourado *et al*, 2007), e a fallaxina, isolada de *Leptodactylus fallax* (Rollins-Smith *et al*, 2005), apresentaram uma similaridade de 60% com a nattererina-1 (Figura 13).

Já em relação à nattererina-2, o peptídeo ranatuerina-1T apresentou 63% de similaridade, a gaegurina-2 apresentou 60% e a ranatuerina-2BYa apresentou 56% de similaridade. Quando comparado com os peptídeos



syphaxina e fallaxina, estes apresentaram similaridade de 60% com a nattererina-2 (Figura 14).

Nattererina-1	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINKFSPQPQ--- 30
Gaegurina-2	GIMSIVKDVAKNAAKEAAKALSTLSCKLAKTC 33
	*: ::*:**:* : * : :* :
Nattererina-1	----GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINKFSPQPQ 30
Ranaturina-1T	GLLSGLKKVKGKHAVAKNVAVSLMDSLKCKISGDC- 33
	*** : *::**:* ** * :: :*:* :
Nattererina-1	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINKFSPQPQ-- 30
Ranaturina-2BYa	GILSTFKGLAKGVAKDLAGNLLDKFKCKITGC 32
	*: :* *** * *** ::** :
Nattererina-1	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINKFSPQPQ 30
Syphaxina	GVLDILKGAAKDLAGHVATKVINKI----- 25
	*: *::* ** : * ::* *****:
Nattererina-1	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINKFSPQPQ 30
Fallaxina	GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL----- 25
	*: *::* ** : * ::* *****:

**Figura 13.** Alinhamento comparativo entre as estruturas primária dos peptídeos nattererina-1 com gaegurina-2; nattererina-1 com ranaturina-1T; nattererina-1 com ranaturina-2BYa, nattererina-1 com syphaxina e nattererina-2 com fallaxina.

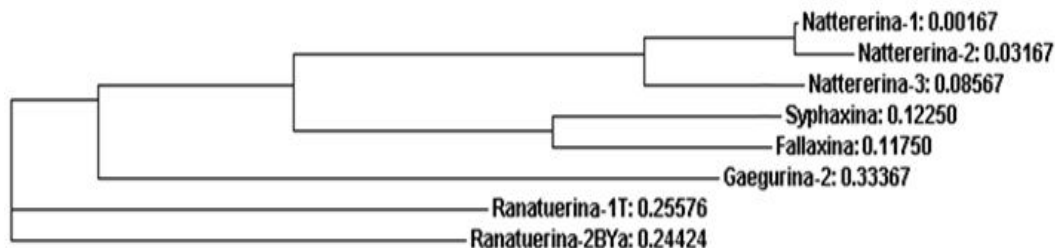
Nattererina-2	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINRFSPQPQ--- 30
Gaegurina-2	GIMSIVKDVAKNAAKEAAKALSTLSCKLAKTC 33
	*: ::*:**:* : * : :* :
Nattererina-2	----GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINRFSPQPQ 30
Ranaturina-1T	GLLSGLKKVKGKHAVAKNVAVSLMDSLKCKISGDC- 33
	*** : *::**:* ** * :: :*:* :
Nattererina-2	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINRFSPQPQ-- 30
Ranaturina-2BYa	GILSTFKGLAKGVAKDLAGNLLDKFKCKITGC 32
	*: :* *** * *** ::** :
Nattererina-2	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINRFSPQPQ 30
Syphaxina	GVLDILKGAAKDLAGHVATKVINKI----- 25
	*: *::* ** : * ::* *****:
Nattererina-2	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINRFSPQPQ 30
Fallaxina	GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL----- 25
	*: *::* ** : * ::* *****:

**Figura 14.** Alinhamento comparativo entre as estruturas primária dos peptídeos nattererina-2 com gaegurina-2; nattererina-2 com ranaturina-1T; nattererina-2 com ranaturina-2BYa, nattererina-2 com syphaxina e nattererina-2 com fallaxina.

Por último, em relação à nattererina-3, a ranatuerina-1T exibiu uma similaridade de 60%, a ranatuerina-2BYa de 53% e a gaegurina-2 apresentou 56%. Já os peptídeos syphaxina e fallaxina apresentaram 56% de similaridade (Figura 15).

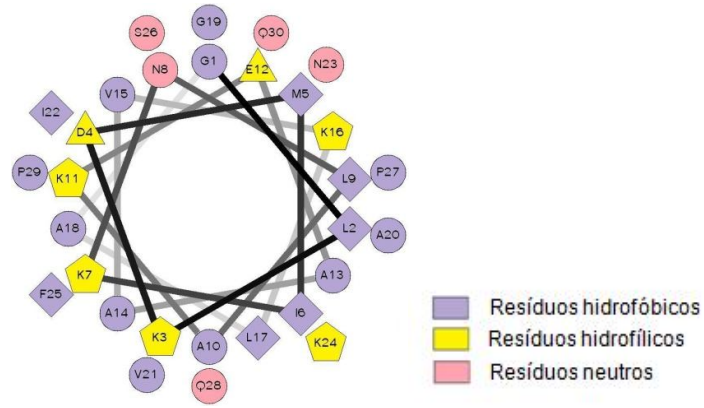
Nattererina-3	GLKDI IKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ--- 30
Gaegurina-2	GIMSIVKDVAKNAAKEAAKALSTLSCKLAKTC 33
	*: **::**:* : * : ** :
Nattererina-3	----GLKDI IKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ 30
Ranatuerina-1T	GLLSGLKKVKGKHVAKNVAVSLMDSLKCKISGDC- 33
	*** : **::**:* : * : : : ** :
Nattererina-3	GLKDI IKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ-- 30
Ranatuerina-2BYa	GILSTFKGLAKGVAKDLAGNLLDKFKCKITGC 32
	*: : * ** : ** : : * : :
Nattererina-3	GLKDI IKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ 30
Syphaxina	GVLDI LKGAAKDLAGHVATKVINKI----- 25
	*: **:* ** : ** ****:
Nattererina-3	GLKDI IKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ 30
Fallaxina	GVVDI LKGAAKDIAGHLASKVMNKL----- 25
	*: **:* ** : : * **:

**Figura 15.** Alinhamento comparativo das estruturas primárias dos peptídeos nattererina-3 com gaegurina-2; nattererina-3 com ranateurina-1T; nattererina-3 com ranateurina-2BYa, nattererina-3 com syphaxina e nattererina-3 com fallaxina.

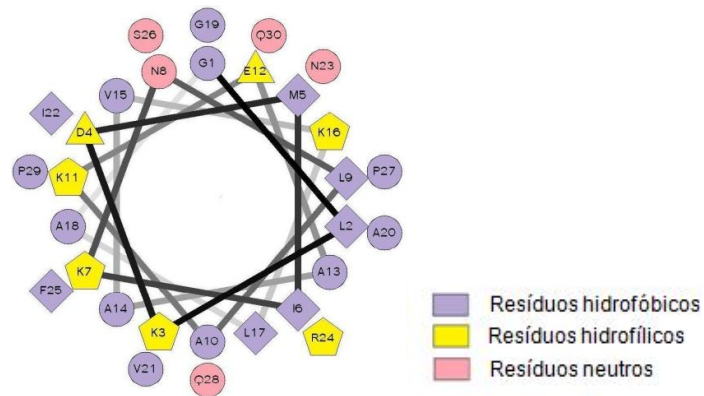


**Figura 16.** Árvore filogenética construída com as nattererinas e peptídeos similares. Os valores das distâncias estão ao lado dos peptídeos.

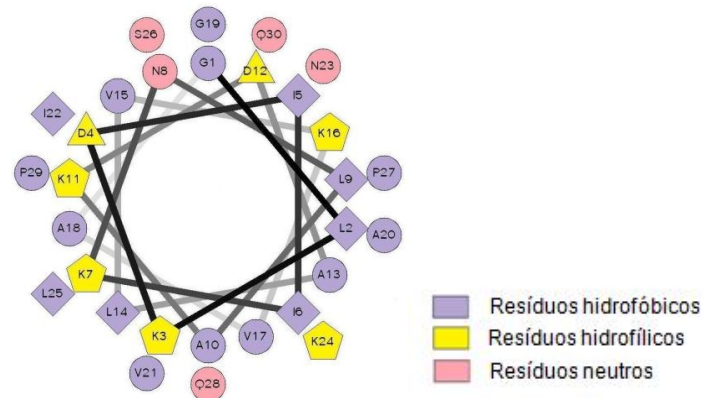
As predições de estrutura secundária para as nattererinas-1, 2 e 3 mostraram uma tendência à formação de  $\alpha$ -hélice anfipática. Tais características são evidenciadas com o uso das projeções de Schiffer & Edmundson (1967) (Figuras 17, 18 e 19).



**Figura 17.** Projeção em hélice de Schiffer & Edmundson (1967) do peptídeo nattererina-1



**Figura 18.** Projeção em hélice de Schiffer & Edmundson (1967) do peptídeo nattererina-2

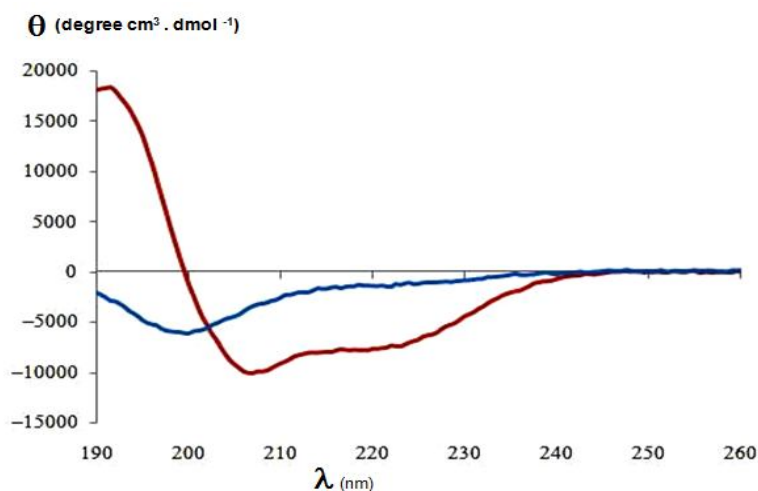


**Figura 19.** Projeção em hélice de Schiffer & Edmundson (1967) do peptídeo nattererina-3

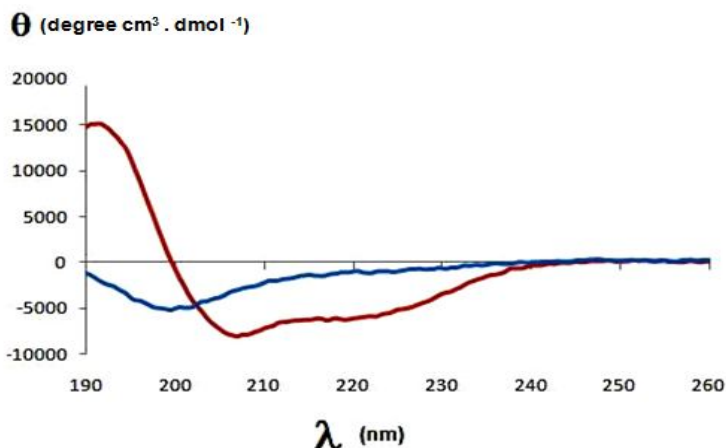
**Tabela 1.** Comparação entre as nattererinas isoladas. Os parâmetros comparados são a massa molecular monoisotópica  $[M+H]^+$  (MM); carga em pH neutro; ponto isoelétrico (pI); anfifilicidade, como momento hidrofóbico médio ( $\langle\mu H\rangle$ ); porcentagem de resíduos hidrofóbicos (%H); atividade contra Gram-positivas (+) e Gram-negativas (-); predição da estrutura secundária.

<b>Peptídeo</b>	<b>MM (Da)</b>	<b>Carga</b>	<b>pI</b>	<b><math>\langle\mu H\rangle</math></b>	<b>%H</b>	<b>Atividade</b>	<b>Estrutura</b>
Nattererina-1	3.180	+3	10.4	-0.05	60	+/-	$\alpha$ -hélice
Nattererina-2	3.208	+3	10.5	-0.05	60	+/-	$\alpha$ -hélice
Nattererina-3	3.142	+3	10.4	-0.06	60	+/-	$\alpha$ -hélice

Experimentos de dicroísmo circular foram realizados para comprovar a formação de estruturas helicoidais nos peptídeos isolados. Apenas as nattererinas-1 e 2 foram testadas, pois não foi possível acumular a nattererina-3 de forma satisfatória. Em relação à nattererina-1, foi observada a presença de 29% de helicidade na presença do solvente TFE 50% (v/v) (figura 20) e a nattererina-2 apresentou 28,4% de helicidade no mesmo solvente (figura 21), ambas a 25°C. Tais dados foram medidos na região de comprimento de onda 222 nm, por se tratar de uma banda do espectro que evidencia a estrutura típica de  $\alpha$ -hélice. A nattererina-3 não foi testada, contudo sugere-se que esse peptídeo também assumira uma estrutura helicoidal semelhante às das nattererinas 1 e 2.



**Figura 20.** Espectro de dicroísmo circular da nattererina-1. Em azul tem-se a estrutura randômica adotada pelo peptídeo na presença de água. Em vermelho, o peptídeo adota uma conformação típica de  $\alpha$ -hélice na presença de TFE 50% (v/v).



**Figura 21.** Espectro de dicroísmo circular do peptídeo nattererina-2. Em azul tem-se a estrutura randômica adotada pelo peptídeo na presença de água. Em vermelho, o peptídeo adota uma conformação típica de  $\alpha$ -hélice na presença de TFE 50% (v/v).

## 5) Determinação de CIM e HC<sub>50</sub>

Os peptídeos caracterizados no presente estudo foram sintetizados quimicamente e suas formas sintéticas foram testadas contra os microorganismos patogênicos *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* para a determinação da CIM, tendo todos apresentado atividade contras as bactérias testadas, com a ressalva de que a bactéria Gram-positiva *S. aureus* mostrou-se pouco sensível às nattererinas. Também foram realizados ensaios hemolíticos com as formas nativas das nattererinas-1 e 2 as quais apresentaram lise dos eritrócitos considerada baixa (7% e 11%, respectivamente) na maior concentração testada (128  $\mu$ M). Abaixo estão apresentados os resultados obtidos.

**Tabela 2.** Atividade antimicrobiana das nattererinas-1, 2 e 3 sintéticas.

Peptídeo	CIM ( $\mu$ M)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Nattererina-1	128	16	32
Nattererina-2	128	64	32
Nattererina-3	256	8	64

## Discussão

Neste trabalho foi analisada a secreção cutânea do anuro *Eupemphix nattereri* em termos de seu conteúdo peptídico. Tal secreção mostrou-se bastante rica quimicamente atingindo uma média de 54 frações eluídas por corrida cromatográfica (Figura 8 e Anexo 1) em fase reversa.

Uma boa reprodutibilidade do perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC, como aquele obtido por Conlon *et al.* (2003) utilizando a secreção cutânea do anuro *R. boylii* durante vários meses, ilustra o potencial dessa metodologia para a identificação taxonômica de espécies intimamente relacionadas ou até mesmo sub-populações de uma determinada espécie. O perfil cromatográfico obtido com a secreção do anfíbio *E. nattereri* também apresentou boa reprodutibilidade ao longo dos meses, o que indica que sua secreção cutânea pode também ser utilizada como uma ferramenta adicional em estudos taxonômicos. Como a secreção cutânea pode ser obtida por métodos não invasivos, pode-se obter um perfil cromatográfico até mesmo de espécies ameaçadas de extinção e assim obter um perfil que pode ser usado para caracterização de espécies, dessa forma uma análise feita a partir da combinação de HPLC com espectrometria de massa tem se mostrado uma técnica muito eficiente em tais estudos.

Também foi possível o isolamento de três peptídeos antimicrobianos denominados nattererinas-1, 2 e 3 com as respectivas massas moleculares de 3.180 Da, 3.208 Da e 3.142 Da. Após buscas na literatura, foi identificada uma dissertação de mestrado (Martins, 2005), na qual foi descrita a co-purificação dos peptídeos 3.180 Da e 3.280 Da e a caracterização química e biológica de tais peptídeos. No entanto, no referido trabalho não se obteve sucesso no isolamento desses peptídeos, tendo sido a atividade antimicrobiana avaliada para a mistura dos peptídeos 3.180 Da e 3.208 Da. A purificação desses dois peptídeos foi alcançada no presente estudo tornando possível uma análise mais aprofundada de tais peptídeos e também do peptídeo 3.142 Da identificado nesse projeto.

As três nattererinas mostraram-se bastante semelhantes entre si, apresentando apenas algumas substituições do tipo conservativa (Figura 12).

Os peptídeos isolados são constituídos por 30 resíduos de aminoácidos, com seqüências semelhantes entre si, apresentando cerca de 60% de resíduos hidrofóbicos. A hidrofobicidade é uma característica essencial para os peptídeos antimicrobianos interagirem com as membranas biológicas e o seu aumento está relacionado com a toxicidade para células de mamíferos e perda da especificidade do peptídeo. Dessa forma, muitos peptídeos são moderadamente hidrofóbicos, otimizando sua atividade contra membranas dos microorganismos (Dathe *et al*, 1997; Yeaman & Yount, 2003).

Uma característica evidente entre peptídeos antimicrobianos como uma classe é a conservação de elementos de estrutura secundária e a existência de carga líquida na molécula dentre os diversos filos. Peptídeos antimicrobianos formam estrutura anfipática e frequentemente são catiônicos quando em pH fisiológico. A anfipaticidade e a carga líquida positiva são características conservadas entre muitos peptídeos antimicrobianos e a afinidade por cargas é um importante meio de conferir seletividade aos peptídeos bioativos (Yeaman & Yount, 2003). A carga tem um papel determinante em mediar a interação inicial entre peptídeos e as células-alvo, de forma que um aumento na cationicidade pode levar a um aumento da citotoxicidade contra todos os tipos celulares (Giangaspero *et al*, 2001).

As cargas teóricas das nattererinas-1, 2 e 3 foram determinadas em pH 7 e os valores obtidos foram iguais a +3 para todas (Tabela 1), estando de acordo com o esperado para peptídeos antimicrobianos. Segundo Yeaman & Yount (2003) muitos dos peptídeos antimicrobianos caracterizados até o momento apresentam cargas positivas entre 2 e 10. A cationicidade é importante para a atração eletrostática inicial do peptídeo com os fosfolipídios negativamente carregados das membranas bacterianas e um valor mínimo de cargas, talvez perto de +2, faz-se necessário para a seletividade do peptídeo contra microorganismos, pois permite a atração eletrostática inicial à membrana negativa da célula-alvo.

Já uma medida quantitativa de anfipaticidade é o momento hidrofóbico ( $\mu H$ ), que é calculado como a soma vetorial da hidrofobicidade de cada aminoácido normalizada numa hélice ideal (Eisenberg, 1984). Para as nattererinas-1, 2 e 3, os valores obtidos foram -0.05, -0.05 e -0.06, respectivamente. O aumento do momento hidrofóbico resulta num significativo

aumento da atividade hemolítica e na capacidade de permeabilizar células-alvo. Entretanto, tal aumento parece ter um efeito modesto sobre interações entre peptídeos e membranas altamente negativas; já em membranas mais neutras, onde as interações eletrostáticas são minimizadas, o aumento do  $\mu H$  tem um papel importante na toxicidade celular (Yeaman & Yount, 2003).

A análise dos alinhamentos realizados pelo *ClustalW* com peptídeos obtidos por buscas em banco de dados (Figuras 13, 14 e 15) revelou uma maior identidade entre as nattererinas e os peptídeos syphaxina e fallaxina, isolados dos anuros *L. syphax* e *L. fallax*, respectivamente, pertencentes à família Leptodactylidae, a qual está relacionada filogeneticamente com a família Leuperidae.

A fallaxina apresenta baixa atividade antimicrobiana, sendo ativa apenas contra bactérias Gram-negativas (Rollins-Smith *et al*, 2005). Não existem dados aprofundados sobre a syphaxina, contudo as formas truncadas SPX (1-16) e SPX (1-22) da syphaxina apresentaram atividade antimicrobiana mais aproximada à das nattererinas-1 e 2 (Dourado *et al.*, 2007).

O alinhamento das seqüências das nattererinas com as ranatuerinas 1T e 2BYa mostrou uma considerável similaridade entre elas. A comparação da seqüência de aminoácidos do peptídeo ranatuerina-1T com outros peptídeos antimicrobianos de ranídeos, feita por Goraya *et al* (1999), demonstrou que este apresenta uma baixa similaridade estrutural fora de sua região cíclica a qual é altamente conservada entre as ranatuerinas, contudo a presença dessa região não é uma característica obrigatória para a bioatividade. Devido à sua baixa atividade biológica, sugere-se que o papel desse peptídeo provavelmente está mais relacionado com a prevenção do crescimento bacteriano excessivo sobre a pele do anfíbio do que com a função de um potente agente citolítico, o que não pode ser inferido no caso das nattererinas-1 e 2, pois esses peptídeos apresentam uma atividade biológica mais potente.

A gaegurina-2 é um peptídeo que pertence à família das Breveninas-2 e também apresentou uma similaridade considerável com as nattererinas isoladas. A gaegurina-2 caracteriza-se por ter uma natureza anfipática com uma rede de cargas positivas que é importante para gerar uma seletividade, interagindo de forma discriminativa entre as membranas bacterianas que



contém lipídios com as cabeças fosfolipídicas negativamente carregadas, e as membranas eucarióticas cuja superfície é principalmente “*zwitterionica*” sem uma rede de cargas predominante (Park *et al.*, 1994; Won *et al.*, 2008).

Espécies pertencentes à família Ranidae não são intimamente relacionadas em termos filogenéticos às espécies da família Leptodactylidae. Como a organização estrutural dos precursores de peptídeos antimicrobianos de diferentes famílias é bem semelhante, foi especulado que muitos peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea surgiram de um gene ancestral comum (Rollins-Smith *et al.*, 2005).

Geralmente, peptídeos ativos em membranas são capazes de assumir uma estrutura secundária anfipática quando estão no ambiente da membrana. Significativamente, além de assumirem na maioria das vezes uma conformação em  $\alpha$ -hélice, esses peptídeos são de natureza catiônica. A carga positiva direciona a ligação do peptídeo à bicamada lipídica negativamente carregada. Estudos recentes demonstram que a helicidade é menos crucial para o efeito bactericida, entretanto a correlação de helicidade desses peptídeos com a atividade hemolítica indica um significativo papel da  $\alpha$ -hélice anfipática sobre as células vermelhas do sangue (Dathe *et al.*, 1997).

A característica anfipática da  $\alpha$ -hélice, observada nas nattererinas e em outros peptídeos antimicrobianos, é crucial para a interação com a membrana posicionando os aminoácidos hidrofóbicos de um lado e os hidrofílicos do outro lado do eixo da hélice. Peptídeos helicoidais e anfipáticos geralmente se encontram desestruturados em solução e são eletrostaticamente atraídos pelos grupos negativamente carregados presentes na superfície das células, tais como ácidos teicóicos e peptidoglicanos em bactérias Gram-positivas e a camada externa rica em LPS em Gram-negativas. Com o objetivo de induzir a conformação funcional relevante para a atividade peptídica, modelos experimentais que mimetizam a membrana biológica frequentemente são utilizados em estudos estruturais como, por exemplo, o uso de solventes orgânicos como o trifluoroetanol (TFE) que estabelece um meio hidrofóbico semelhante ao encontrado na membrana (Giangaspero *et al.*, 2001; Won *et al.*, 2008).

Experimentos realizados por dicroísmo circular confirmaram a formação de estrutura helicoidal nas nattererinas-1 e 2 (Figuras 20 e 21). Infelizmente, a terceira nattererina isolada no presente estudo não pôde ser acumulada em quantidades suficientes para ser testada, mas com base na semelhança de sua estrutura primária com os outros dois peptídeos testados e na sua projeção em hélice pode-se sugerir que a nattererina-3 adquira também uma estrutura helicoidal quando em meio mimético de membrana biológica. Peptídeos lineares que são capazes de assumir uma estrutura helicoidal ativa e anfipática estão entre os mais abundantes e distribuídos na natureza e há alguns parâmetros físicos que se mostraram relevantes para a atividade biológica, tais como o tamanho do peptídeo, a sua seqüência, a carga, o grau de estruturação (helicidade), a hidrofobicidade e anfipaticidade. Na verdade, o arranjo anfipático dos resíduos é importante para a atividade de peptídeos helicoidais, e a habilidade de se estruturar numa conformação helicoidal sem esse arranjo anfipático, de fato não é suficiente para fornecer uma atividade antimicrobiana potente e de amplo espectro (Giangaspero *et al*, 2001).

É observado que as concentrações dos peptídeos necessárias para inibir o crescimento bacteriano geralmente são bem menores do que as concentrações obtidas para HC<sub>50</sub>. Com isso sugere-se que interações entre peptídeos hidrofóbicos e membrana atuam de forma decisiva. Em contraste com as células vermelhas do sangue, a membrana de bactérias Gram-positivas contém componentes negativamente carregados como o ácido teicóico e os grupos carboxila dos aminoácidos localizados na camada de peptideoglicanos. Desse modo, as concentrações baixas obtidas para CIM, em comparação com as obtidas para HC<sub>50</sub> nos ensaios realizados com as nattererinas, em parte pode se explicada pela afinidade do peptídeo por superfícies negativamente carregadas (Dathe *et al*, 1997).

Já o envelope de bactérias Gram-negativas é uma estrutura complexa formada por uma membrana interna que pode ser comparada à das células de mamíferos, e por uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS), os quais conferem um alto grau de negatividade, localizados na superfície externa. Para atingir seus alvos, os peptídeos catiônicos devem transpassar a barreira formada pela membrana externa de bactérias Gram-negativas. Primeiramente, sugere-se que há uma permeabilização

reversível da membrana externa e que tal permeabilização deve ser atingida através da alta concentração de peptídeos catiônicos que se ligam à membrana. Posteriormente, há um dano irreversível na membrana interna o que leva à morte celular. Assim, pode-se observar que interações eletrostáticas também têm um papel decisivo no efeito geral sobre bactérias Gram-negativas (Dathe *et al*, 1997).

Acredita-se que a diversidade molecular observada nas espécies de anfíbios seja uma consequência de múltiplas duplicações de um gene ancestral durante a radiação das espécies e dentro da própria espécie, e a semelhança estrutural entre os peptídeos nattererinas, fallaxina e syphaxina é consistente com a idéia de que eles sejam homólogos (Figura 16), contudo a possibilidade de tal semelhança ser apenas uma coincidência não deve ser descartada (Rollins-Smith *et al*, 2005).

Contudo não existe nenhuma seqüência consenso de aminoácidos nos peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea de anuros que possa ser associada à sua atividade biológica. No entanto, a distribuição de aminoácidos nos peptídeos antimicrobianos presentes nesse tipo de secreção não é aleatória, uma vez que eles sempre contêm uma elevada proporção de resíduos que promovem a formação de  $\alpha$ -hélice, tais como Ala, Leu, Lys, Met, His, e os resíduos que provocam desestabilização dessa hélice, como Tyr, Thr, Ser, Pro, geralmente são encontrados em menor numero, soma-se ainda o fato de que eles são quase invariavelmente catiônicos, relativamente hidrofóbicos, e ainda têm uma propensão a formar uma  $\alpha$ -hélice anfipática quando em meio que mimetiza membranas. A potência de um peptídeo em particular contra microorganismos é determinada por uma interação complexa que envolve fatores relacionados à conformação (graus de  $\alpha$ -helicidade), carga molecular, hidrofobicidade e anfipaticidade (Rollins-Smith *et al*, 2005).

A caracterização de novos peptídeos, como as nattererinas, pode servir de inspiração para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, uma vez que o modo de ação dos peptídeos sobre as membranas bacterianas torna mais difícil o desenvolvimento de resistência pelas bactérias, contribuindo assim para contornar o problema de resistência adquirida pelas bactérias aos antibióticos convencionais.

## Conclusões

Este estudo teve como objetivo avaliar o conteúdo peptídico da secreção cutânea do anuro *Eupemphix nattereri* por meio do emprego de técnicas cromatográficas acopladas à análise por espectrometria de massa, com vistas à identificação de peptídeos antimicrobianos. Com o uso metodologia descrita foi possível a identificação e o isolamento de três peptídeos antimicrobianos. Tais peptídeos denominados nattererinas-1, 2 e 3 foram os primeiros peptídeos bioativos isolados em alto grau de pureza da secreção cutânea dessa espécie e apresentam grande semelhança estrutural entre si. As nattererinas são peptídeos catiônicos, anfipáticos e formadores de  $\alpha$ -hélice, características comumente encontradas em peptídeos antimicrobianos.

As nattererinas-1 e 2 apresentaram ainda uma baixa atividade hemolítica, o que em conjunto com a atividade antimicrobiana as tornam possíveis candidatas em estudos voltados para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas.

As nattererinas, em especial a nattererina-3 por sua atividade microbica mais acentuada e específica, podem vir a servir como modelo para a produção de novos fármacos.

## Referências Bibliográficas

- Apponyi, M. A.; Pukala, T. L.; Brinkworth, C. S.; Maselli, V. M.; Bowie, J. H.; Tyler, M. J.; Booker, G. W.; Wallace, J. C.; Carver, J. A.; Separovic, F.; Doyle, J.; Llewellyn, L. E. (2004) Host-defence peptides of the Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. *Peptides* 25:1035-1054.
- Atherton, E.; Sheppard, R. C. (1989) Solid phase peptide synthesis: a practical approach (the practical approach series). USA: *Oxford University Press*, 216 p.
- Barra, D.; Simmaco, M. (1995) Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends Biotechnol.* 13:205-209.
- Batista, C. V. F.; Rosendo da Silva, L.; Sebben, A.; Scaloni, A.; Ferrara, L.; Paiva, G. R.; Olamendi-Portugal, T.; Possani, L. D.; Bloch Jr, C. (1999) Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. *Peptides*. 20:679-686.
- Bevier, C. R.; Sonnevend, A.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N.; Nielsen, P. F.; Conlon, J. M. (2004) Purifications and characterizations of antimicrobial peptides from the skin secretions of the mink frog (*Rana septentrionalis*) *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 139:31-38.
- Brand, G. D.; Leite, J. R. S. A.; Mandel, S. M. S.; Mesquita, D. A.; Silva, L. P.; Prates, M. V.; Barbosa, E. A.; Vinecky, F., Martins, G. R.; Galasso, J. H.; Kuckelhaus, S. A. S.; Sampaio, R. N. R.; Furtado Jr, J. R.; Andrade, A. C.; Bloch Jr, C. (2006) Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia) *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 347:739-746.
- Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. 3:238-250.
- 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*. 12:89-93.

- Clarke, B. T. (1997) the natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biol. Rev.*, 72:365-379.
- Conlon, J. M.; Sonnevend, A.; Patel, M.; Davidson, C.; Nielsen, P. F.; Pal, T.; Rollins-Smith, L. A. (2003) Isolation of peptides of the brevinin-1 family with potent candidacidal activity from the skin secretions of the frog *Rana boylii*. *J. Peptide Res.* 62:207-213.
- Conlon, J. M.; Abraham, B.; Galadari, S.; Knoop, F. C.; Sonnevend, A.; P'al, T. (2005) Antimicrobial and cytolytic properties of the frog peptide, kassinaturein-1 and its L- and D-lysine-substituted derivatives. *Peptides* 26:2104-2110.
- Csordas, A.; Michl, H. (1970) Isolierung und Strukturaufklärung eines hämolytisch wirkenden Polypeptides aus dem Abwehrsekret europäischer Unken. *Monatsh. Chem.*, 101:182–189.
- Daly, J.W. (1995) Alkaloids from frog skins: selective probes for ion channels and nicotinic receptors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28:1033-1042.
- Dathe, M.; Wieprecht, T.; Nikolenko, H.; Handel, L.; Lee Maloy, W.; MacDonald, D. L.; Beyermann, M.; Bienert, M. (1997) Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Letters*. 403:208–212.
- Dourado, F. S.; Leite, J. R. S. A.; Silva, L. P.; Melo, J. A. T.; Bloch Jr., C.; Schwartz, E. F. (2007) Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus siphax*. *Toxicon*, 50:572-580.
- Duda JR., T. F.; Vanhoye, D.; Nicolas, P. (2002) Roles of diversifying selection and coordinated evolution in the evolution of amphibian antimicrobial peptides. *Mol. Biol. Evol.* 19:858–864.
- Eisenberg, D.; Weiss, R. M.; Terwilliger, T. C.; Wilcox, W. (1982) Hydrophobic moments and protein structure. *Faraday Symp. Chem. Soc.* 17:109–120.
- Eisenberg, D. (1984) Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 53:595-623.
- Erspamer, V. (1994) In amphibian biology: bioactive secretions of the amphibian integument. (Heatwole, E., Ed.), pp. 178-350.

- Feder, R.; Dagan, A.; Mor, A. (2000) Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 275:4230–4238.
- Feder, R.; Nehushtai, R.; Mor, A. (2001) Affinity driven molecular transfer from erythrocyte membrane to target cells. *Peptides*, 22:1683-1690.
- Fleury, Y.; Vouille, V.; Beven, L.; Amiche, M.; Wroblewski, H.; Delfour, A.; Nicolas P. (1998) Synthesis, antimicrobial activity and gene structure of a novel member of the dermaseptin B family. *Biochim. Biophys. Acta*, 1396:228-236.
- Freitas, M. A.; Silva, T. F. S. (2007) Guia ilustrado - A herpetofauna das caatingas e áreas de altitudes do nordeste brasileiro. Editora USEB, 388p.
- Frost, D. R.; Grant, T.; Faivovich, J.; Bain, R. H.; Haas, A.; Haddad, C. F. B.; De Sá, R. O.; Channing, A.; Wilkinson, M.; Donnellan, S. C.; Raxworthy, C. J.; Campbell, J. A.; Blotto, B. L.; Moler, P.; Drewes, R. C.; Nussbaum, R. A.; Lynch, J. D.; Green, D. M.; Wheeler, W. C. (2006) The Amphibian Tree of Life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 297:370p.
- Frost, D. R. (2009) Amphibian species of the world: an online reference. Version 5.3 (12 February, 2009). Electronic Database accessible at [http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History](http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/American_Museum_of_Natural_History), New York, USA.
- Fontes, W.; Cunha, R. B.; Sousa, M. V.; Morhy, L. (1998) Improving the recovery of lysine in automated protein sequencing. *Analytical Biochemistry*. 258:259-267.
- Giangaspero, A.; Sandri, L; Tossi, A. (2001) Amphipathic  $\alpha$ -helical peptides. A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. *Eur. J. Biochem*. 268:5589-5600.
- Goraya, J.; Knoop, F. C.; Conlon, J. M. (1999) Ranatuerin 1T: an antimicrobial peptide isolated from the skin of the frog, *Rana temporaria*. *Peptides* 20:159-163.
- Gottler, L. M.; Ramamoorthy, A. (2008) Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan – A highly potent antimicrobial peptide designed from magainina. *Biochimica et Biophysica Acta*, doi10.1016/j.bbamem.2008.10.009.

- Grant, T.; Frost, D. R.; Caldwell, J. P.; Gagliardo, R.; Haddad, C. F. B.; Kok, P. J. R.; Means, D. B.; Noonan, B. P.; Schargel, W. E.; Wheeler, W. C. (2006) Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 299:262p.
- Hancock, R. E. W.; Lehrer, R. (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.*, 16:82-88.
- Hancock, R. E. W.; Chapple, D. S. (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:1317-1323.
- Hunt, D. F.; Yates, J. R.; Shabanowitz, J.; Winston, S.; Hauer, C. R. (1986) Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83(17):6233-7.
- Krugliak, M.; Feder, R.; Zolotarev, V.; Gaidukov, L.; Dagan, A.; Ginsburg, H.; Mor, A. (2000) Antimalarial activities of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44:2442-2451.
- Lazarus, L. H.; Attila, M. (1993) The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. *Progress in neurobiology*, 41(4):473-507.
- Lenzi-Mattos, R.; Antoniazzi, M. M.; Haddad, C. F. B.; Tambourgi, D. V.; Rodrigues, M. T.; Jared, C. (2005) The inguinal macroglands of the frog *Physalaemus nattereri* (Leptodactylidae): structure, toxic secretion and relationship with deimatic behaviour. *The Zoological Society of London* 266:385-394.
- Lorin, C.; Saidi, H.; Belaid, A.; Zairi, A.; Baleux, F.; Hocini, H.; Bélec, L.; Hani, K.; Tangy, F. (2005) The antimicrobial peptide Dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. *Virology* 334:264-275.
- Ludtke, S.J.; He, K.; Heller, W.T.; Harroun, T.A.; Yang, L.; Huang, H.W. (1996) Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*, 35:13723-13728.
- Mangoni, M. L.; Miele, R.; Renda, T. G.; Barra, D.; Simmaco, M. (2001) The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms. *Faseb J.* 15(8):1431-2.
- Martins, G. R. P (2005) Peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea de *Physalaemus nattereri* (Anuro). *Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília*, 43p.



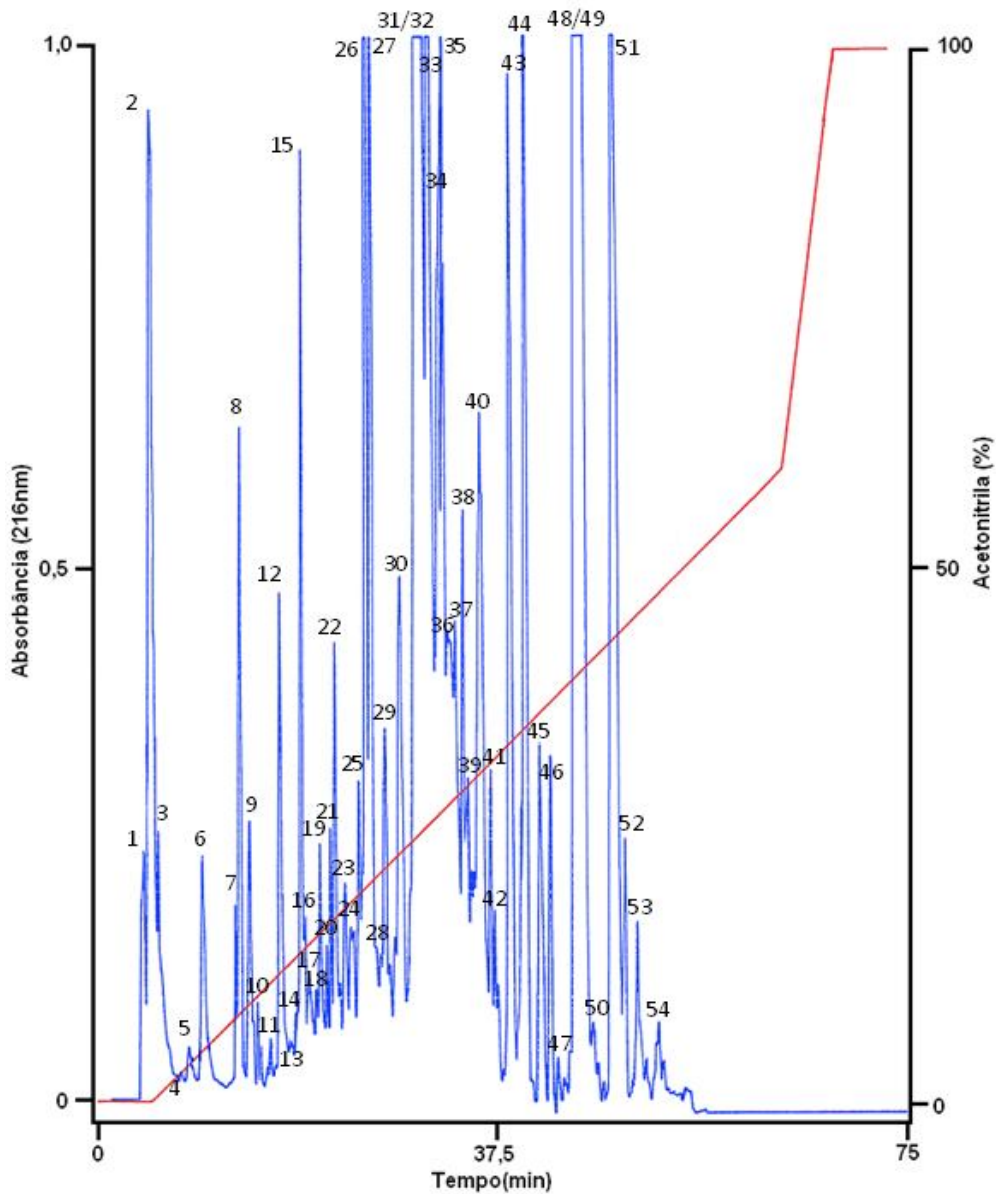
- Matsuzaki, K. (1999) Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1462:1-10.
- Miele, R.; Ponti, D.; Boman, H. G.; Barra, D.; Simmaco, M. (1997) Molecular cloning of a bombinina gene from *Bombina orientalis*: detection of NF- $\kappa$ B and NF-IL6 binding sites in its promoter. *FEBS Letters* 431:23-28.
- Mignogna, G.; Simmaco, M.; Barra, D. (1998) Occurrence and function of D-amino acid-containing peptides and proteins: antimicrobial peptides. *EXS*, 85:29-36.
- Montesinos, E. (2007) Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbial Lett.* 270:1-11.
- Mor, A.; Nguyen, V. H.; Delfour, A.; Migliore-Samour, D.; Nicolas, P. (1991) Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry*, 30:8824-8830.
- Mor, A.; Hani, K.; Nicolas, P. (1994) The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *J. Biol. Chem.*, 269:31635-31641.
- Morikawa, N.; Hagiwara, K.; Nakajima, T. (1992) Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipoda porsa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189:184–190.
- Nascimento, A. C. C.; Fontes, W.; Sebben, A.; Castro, M.S. (2003) Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein and Peptide Letters*. 10:227-238.
- Nascimento, A. C. C.; Zanotta, L. C.; Kyaw, C. M.; Schwartz, E. N. F.; Schwartz, C. A.; Sebben, A.; Sousa, M. V.; Fontes, W.; Castro, M. S. (2004) Ocellatins: New antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) *The Protein Journal* 23:501-508.
- Nascimento, L. B.; Caramaschi, U.; Cruz, C. A. G. (2005) Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-la-Espada, 1872

- and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (amphibia, anura, leptodactylidae) *Arq. Mus. Nac., Rio de Janeiro* 63: 297-320.
- Oren, Z.; Shai, Y. (1999) Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 47:451-463.
- Park, J. M.; Jung, J. E.; Lee, B. J. (1994) Antimicrobial peptides from the skin of a Korean frog, *Rana rugosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 205: 948-954.
- Pukala, T. L.; Bowie, J. H.; Maselli, V. M.; Musgrave, I. F.; Tyler, M. J. (2006) Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. *The Royal Society of Chemistry* 23:368-393.
- Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D.; Aranha, C. (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 24:536-547.
- Rinaldi, A. C. (2002) Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. *Current Opinion in Chemical Biology*. 6:799-804.
- Rollins-Smith, L. A.; Doersam, J. K.; Longcore, J. E.; Taylor, S. K.; Shamblin, J. C.; Carey, C.; Zasloff, M. A. (2002) Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. *Development and Comparative Immunology* 26:63-72.
- Rollins-Smith, L. A., King, J. D.; Nielsen, P. F.; Sonnevend, A.; Conlon, J. M. (2005) An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura: Leptodactylidae). *Regulatory Peptides* 124:173-178.
- Roseghini, M.; Erspamer, V.; Edean, R. (1976) Indole-, imidazole- and henyl-alkylamines in the skin of one hundred amphibian species from Australia and Papua New Guinea. *Comp Biochem Physiol C.*, 54(1):31-43.
- Rozek, T.; Wegener, K. L.; Bowie, J. H.; Olver, I. N.; Carver, J. A.; Wallace, J. C.; Tyler, M. J. (2000) The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis* the solution structure of aurein 1.2. *Eur. J. Biochem.* 267:5330-5341.
- Ruvinsky, I.; Maxson, L.R. (1996) Phylogenetic relationships among bufonoid frogs (Anura:Neobatrachia) inferred from mitochondrial DNA sequences. [Comparative Study, Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't,

- Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.] *Mol Phylogenet Evol.* 5(3):533-47.
- Schröder, J. (1999) Epithelial peptide antibiotics. *Biochemical Pharmacology* 57: 121-134.
- Shai, Y. (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462, 55-70.
- Simmaco, M.; Mignogna, G.; Barra, D.; Bossa, F. (1993) Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta*. *FEBS Letters*, 324:159-161.
- Simmaco, M.; Mignogna, G.; Canofeni, S.; Miele, R.; Mangoni, M. L.; Barra, D. (1996) Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur. J. Biochem.*, 242:788-792.
- Simmaco, M.; Mignogna, G.; Barra, D. (1999) Antimicrobial peptides from amphibian skin: What do they tell us? *Biopolymers*, 47:435-450.
- Sociedade Brasileira de Herpetologia, <http://www.sbherpetologia.org.br> , disponível em junho, 2009.
- Toledo, R. C.; Jared, C. (1995) Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 111A. 1-29.
- Vanhoye, D.; Bruston, F.; Nicolas, P.; Amiche, M. (2003) Antimicrobial peptides from hylid and ranid frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *Eur. J. Biochem.* 270:2068–2081.
- 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: 2069-2074.
- Wang, T.; Zhang, J.; Ji-Hong, S.; Jin, Y.; Wen-Hui, L.; Zhang, Y. (2005) Maximins S, a novel group of antimicrobial peptides from toad *Bombina maxima*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327:945-951.
- Won, H-S.; Kang, S-J.; Lee, B-J. (2008) Action mechanism and structural requirements of the antimicrobial peptides, gaegurins. *Biochemica et Biophysica Acta*. doi:10.1016/j.bbamem.2008.10.021.

- Yeaman, M. R.; Yount, N. Y. (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55:27–55.
- Zasloff, M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor (vertebrate peptide antibiotics). *Microbiology*, 84:5449-5453.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 415:389-395.

## ANEXOS



**Anexo 1.** Perfil cromatográfico típico do fracionamento do extrato bruto da secreção cutânea de *E. nattereri* em coluna C18 (Vydac 218TP54) em um sistema RP-HPLC com um gradiente linear de acetonitrila/TFA 0,1%. O monitoramento das frações foi a 216 nm e a eluição a 1 mL/min. As frações estão numeradas de acordo com a ordem de coleta manual.

**Anexo 2.** Tabela com as massas moleculares [M+H]<sup>+</sup> dos peptídeos observados nas frações obtidas por RP-HPLC em coluna C18 (Vydac 218TP54). Todas as frações foram plaqueadas com matriz HCCA antes de serem analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF nas faixas *m/z* 500–4000 Da.

Fração	Massa molecular [M+H] <sup>+</sup>					
1	530,603	656,057	666,126	672,038	684,007	
	699,992	861,108	877,076	893,043	910,951	
2	684,106	700,092	907,103			
3	664,106	868,988				
4	672,266	868,971				
5	672,201	868,923				
6	868,996					
7	664,154	833,140	851,079	1.078,083		
8	614,326	650,426				
9	668,174	751,502	804,530	822,563	869,025	931,556
	1.067,536					
10	588,160	672,425	869,125	926,090	928,111	937,591
	1.078,640	1.134,570				
11	672,274	868,994	933,537	1.436,654	1.454,659	
12	672,342	1694,722	1.706,908	1.712,766	1.724,975	
13	869,032	1.562,786	1.694,755	1.712,739	1.996,043	2.039,989
	2.057,008	2.096.361				

---

<b>14</b>	672,311 2.039,969	868,984	1.650,693	1.680,095	1.694,696	1.712,746
<b>15</b>	668,085	869,035	1.694,773	2.040,063		
<b>16</b>	869,080 1.712,867	1.118,762	1.464,917	1.650,044	1.668,059	1.694,833
<b>17</b>	668,101 1.695,045	869,093 1.712,883	1.550,008 1.722,087	1.593,974	1.611,992	1.651,031
<b>18</b>	973,561 1.712,803	1.473,939 1.723,988	1.554,035 1.753,050	1.593,949 1.909,119	1.611,943	1.694,641
<b>19</b>	650,155 1.722,992	656,147 1.741,047	668,104 1.780,968	672,176	684,102	879,133
<b>20</b>	1.059,582 1.694,847 1.976,018	1.077,583 1.762,937 1.994,048	1.132,867 1.780,965 2.020,058	1.567,913 2.038,099	1.585,918 2.118,318	1.633,845 2.126,283
<b>21</b>	868,929 2.203,015	927,908 2.233,252	957,575 2.247,042	1.124,000 2.264,079	1.891,779 2.289,099	2.020,805 2.303,015
<b>22</b>	589,325 2.037,835	662,055	668,020	1.086,593	1.823,867	2.020,791
<b>23</b>	773,558 1.695,010 2.408,923	811,479 1.977,223 2.422,689	829,478 2.003,158 2.439,655	907,108 2.020,188 2.462,594	1.157,805 2.037,212	1.676,010 2.247,449
<b>24</b>	641,432 1.024,539 1.165,596 1363,706	743,435 1.032,530 1.179,593 1.675,819	769,501 1.050,547 1.185,722 1.694,760	773,409 1.073,521 1.234,656 2.002,988	787,445 1.147,563 1.345,714 2.020,970	979,460 1.161,592 1.349,712 2.038,983

---

---

	2.272,169					
<b>25</b>	588,116	642,530	699,555	757,541	1.117,726	1.144,789
	1.161,709	1.194,793	1.213,890	1.231,918	1.327,824	1.345,830
	1.533,985	1.596,839	1.694,825	1.712,860	2.020,994	2.038,016
<b>26</b>	615,304	699,401	771,426	1.099,595	1.184,641	1.214,821
	1.228,656	1.240,647	1.256,731	1.270,670	1.284,587	1.373,693
	2.020,789	2.038,806	2.071,819			
<b>27</b>	1.127,689	1.212,708	1.226,681	1.242,864	1.256,742	1.272,776
	1.298,814	1.313,777	1.384,844	1.401,832	2.524,475	
<b>28</b>	714,347	882,624	1.174,704	1.247,580	1.257,698	1.317,661
	1.334,650	1.384,755	1.432,773	1.503,826	1.552,688	1.595,736
	1.639,749					
<b>29</b>	650,162	668,123	862,557	1.317,765	1.388,800	1.432,782
	1.459,857	1.485,796	1.503,806	1.570,847	1.574,833	1.600,814
	1.614,828	1.618,863	1.632,932	1.907,052	1.923,049	2.546,126
<b>30</b>	724,524	929,653	943,672	948,509	962,551	1.032,672
	1.042,484	1.046,691	1.062,900	1.076,719	1.090,730	1.132,618
	1.247,777	1.257,932	1.326,997	1.334,895	1.345,001	1.469,991
	1.527,943	1.545,967	1.597,039	1.606,006	1.616,015	1.733,200
	1.964,238	1.980,227	2.006,236	2.021,110	2.353,424	
<b>31</b>	821,526	827,582	885,607	899,659	918,583	999,601
	1.012,608	1.017,659	1.033,633	1.056,626	1.072,572	1.081,817
	1.088,674	1.098,716	1.104,606	1.173,715	1.201,728	1.245,707
	1.290,758	1.815,020	1.819,009	2.006,122	2.124,151	2.273,148
	2.308,209	2.319,053	2.338,650	2.352,267	2.368,320	2.385,342
	2.696,341					
<b>32</b>	920,600	934,622	973,685	1.012,639	1.017,702	1.033,684
	1.037,665	1.056,675	1.072,655	1.088,655	1.162,732	1.174,780
	1.200,792	1.216,800	1.246,794	1.256,593	1.277,065	1.290,840

---



---

	1.306,860	1.346,759	1.633,054	1.704,062	1.775,081	1.801,072
	1.815,111	1.819,130	1.833,188	1.875,125	2.124,310	2.353,332
	2.437,364	2.481,433	2.498,465			
<b>33</b>	732,994	761,009	904,622	934,664	1.017,681	1.056,661
	1.062,720	1.072,698	1.201,794	1.272,826	1.288,817	1.290,841
	1.330,697	1.915,913	2.481,401	2.499,439		
<b>34</b>	850,546	877,535	904,582	918,601	952,544	1.017,674
	1.037,635	1.056,737	1.145,648	1.202,682	1.272,826	1.334,814
	1.667,014	1.720,025	1.738,021	1.773,10	1.796,168	1.805,068
	1.831,019	1.849,040	1.867,102	2.481,343		
<b>35</b>	762,565	1.097,898	1.129,870	1.143,893	1.175,882	1.272,921
	1.288,031	1.301,832	1.317,847	1.490,931	1.598,085	1.651,126
	1.669,117	1.762,136	1.780,119	1.798,148	1.849,221	2.159,513
<b>36</b>	641,794	762,514	780,312	861,521	1.159,782	1.203,713
	1.231,839	1.334,792	1.347,029	1.659,002	1.677,015	1.762,063
	1.780,042	2.116,309	2.146,540	2.160,352	2.223,333	2.428,662
<b>37</b>	762,591	861,526	869,029	881,493	1.302,769	2.160,348
<b>38</b>	861,592	869,143	871,176	1.123,011	1.367,018	1.381,660
	1.446,903	3.144,195	3.160,261			
<b>39</b>	928,019	1.059,749	1.122,934	1.322,860	1.366,861	2.195,389
	2.339,486	2.353,481	2.529,534	2.628,640	3.144,049	3.160.053
<b>40</b>	1.056,726	1.350,896	1.430,839	2.233,349	3.257,083	3.274,125
<b>41</b>	1.641,931	2.233,228	2.746,676	3.237,740	3.272,908	3.281,947
	3.297,943	3.323,936	3.385,943	3.425,970		
<b>42</b>	1.661,903	1.698,007	1.713,990	1.842,042	1.887,041	2.515,367
	3.256,892	3.272,862				

---

<b>43</b>	1.814,063 2.350,424	2.328,284 2.386,260	2.344,365	2.386,260	2.329,317	2.343,351
<b>44</b>	1.970,201 3.188,748	1.986,156 3.205,791	2.326,208	2.342,216	3.061,655	3.176,080
<b>45</b>	668,090 1.988,136 2.434,680	1.755,058 2.003,213 3.059,802	1.799,064 2.328,279 3.075,849	1.815,093 2.347,552	1.831,085 2.376,580	1.944,114 2.391,643
<b>46</b>	1.353,817 1.816,120 2.078,279	1.740,063 1.832,130	1.754,042 1.840,068	1.769,050 1.928,179	1.784,082 1.973,182	1.800,115 2.022,355
<b>47</b>	3.180,003	3.208,014	3.324,097			
<b>48</b>	3.180,223	3.208,348				
<b>49</b>	1.256,040	3.164,464	3.172,451	3.180,468	3.208,601	3.224,602
<b>50</b>	2.642,782	2.670,828	2.826,914	2.854,937	3.180,144	3.208,217
<b>51</b>	1.576,259	3.142,486	3.176,476			
<b>52</b>	1.553,962 3.176,082	1.576,008	1.592,000	1.609,973	1.665,917	3.142,099
<b>53</b>	1.880,388	3.142,135	3.176,145	3.208,158		
<b>54</b>	2.020,959	2.038,966	3.142,211	3.176,192	3.208,108	