



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



**Caracterização química e biológica de peptídeos com
propriedades antiproliferativas isolados da secreção cutânea
do anuro *Hypsiboas raniceps* (Cope, 1862)**

Autor: Carlos José Correia de Santana

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Coorientador: Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Brasília-DF

2016



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



Caracterização química e biológica de peptídeos com propriedades antiproliferativas isolados da secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps* (Cope, 1862)

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

Autor: Carlos José Correia de Santana
Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro
Coorientador: Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Brasília-DF
2016



Carlos José Correia de Santana

**Caracterização química e biológica de peptídeos com
propriedades antiproliferativas isolados da secreção
cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps* (Cope, 1862)**

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Mariana S. Castro
Presidente
Departamento de Ciências Fisiológicas/IB
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho
Membro Titular
Departamento de Biologia Celular/IB
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Luís Henrique Ferreira do Vale
Membro Titular
Departamento de Biologia Celular/IB
Universidade de Brasília

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo
Membro Suplente
Departamento de Genética e Morfologia/IB
Universidade de Brasília

Dedico esta dissertação aos meus pais João e Anália, meus irmãos Érica e Erivelton e minha esposa Jaqueline pelo incentivo, apoio e por tudo que são e representam pra mim.

Ao primo Warley Santana (*in memoriam*) um grande amigo...

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem Ele eu nada seria.

À Profa. Dra. Mariana de Souza Castro, que gentilmente me acolheu em seu laboratório, pela orientação, paciência e toda ajuda dispensada durante o mestrado.

Ao Prof. Dr Osmino Júnior, pela coorientação, por ter feito tudo o que foi possível para ajudar mesmo quando tudo dava errado, por todo aprendizado e confiança.

Aos meus pais João e Anália e meus irmãos Érica e Erivelton pelo apoio incondicional, por terem feito tudo que foi possível para que eu pudesse estar aqui hoje, apesar de todas as dificuldades.

À Jaqueline, minha esposa, pelo apoio incondicional e paciência durante esse tempo.

À Eliane e Valdo, que gentilmente me acolheram em sua casa, em meio as idas e vindas no início do mestrado.

Às IC's Maria Giovanna, Isadora e Natália pela ajuda inestimável nas centenas cromatografias que fizemos durante esses dois anos, além das outras coisas...

Ao Prof. Wagner Fontes pela ajuda na fragmentação das amostras no LC-MS.

Ao Prof. Dr. Diego e a Profa. Dra. Jamila, da UnB Ceilândia, por gentilmente disponibilizarem o uso do espectrômetro de massas MALDI-TOF.

À profa. Dra. Graziella Joanitti e a MSc. Alicia Ombredane pela inestimável ajuda nos experimentos de citometria de fluxo.

Ao MSc. César Priaz pela ajuda nos ensaios de MTT.

As doutorandas Tânia e Tainã pela revisão do texto e aos mestrandos Ana Carolina, Andréia, Lucas pela sempre disposição em ajudar em todos os momentos.

A Anderson Lima e Thompson Tomatieli pelo auxílio nas coletas e extração da secreção usada neste trabalho.

Aos colegas do laboratório Anderson, Harry, Jaqueline, Cláudia, Beatriz, Carol, Sol, Camila, Luz, Victória, Diego, Dhara, Bruna e todos os demais pela boa convivência diária.

A Capes pelo apoio financeiro por meio da concessão da bolsa de estudos.

APOIO FINANCEIRO

A dissertação de mestrado intitulada “Caracterização química e biológica de peptídeos com propriedades antiproliferativas isolados da secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps* (Cope, 1862)” desenvolvida por Carlos José Correia de Santana sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq (processos no. 563972/2010-6 - Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRÓ-CENTRO-OESTE nº 31/2010, no. 302925/2012-0 - Produtividade em Pesquisa (PQ – 2012) e no. 407801-2013 - Rede Centro-Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação - REDE PRÓ-CENTRO-OESTE), da FAPDF (processo no 193.000.461/2011 - Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRÓ-CENTRO-OESTE nº 31/2010), da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

RESUMO

Atualmente, é crescente o número de micro-organismos resistentes aos antibióticos convencionais sendo imprescindível o desenvolvimento de novas alternativas que possam conter o aumento da resistência microbiana. Os peptídeos antimicrobianos surgem como uma alternativa interessante, pois atuam sobre a membrana plasmática, reduzindo a possibilidade de resistência. A secreção cutânea de anfíbios é uma fonte rica de peptídeos antimicrobianos e muitos destes também apresentam atividade antiproliferativa e citotóxica sobre células tumorais. O presente estudo teve como objetivo avaliar a secreção cutânea de *Hypsiboas raniceps* quanto à presença de peptídeos com atividade antiproliferativa e citotóxica sobre bactérias e fungos patogênicos, bem como células de melanoma murino (B16F10). Foram identificados e purificados dois peptídeos inéditos, denominados Hr22 e Hr24, com potente atividade sobre bactérias, principalmente sobre patógenos Gram-positivos e também mostraram-se ativos sobre eritrócitos humanos, células de melanoma (B16F10) e fibroblastos normais (NIH3T3). No caso dos efeitos sobre células de melanoma, observou-se que os peptídeos também foram tóxicos para as células normais testadas, entretanto o peptídeo Hr24 indicou uma provável seletividade em relação às células de câncer, com uma dose efetiva com cerca da metade do valor obtido para as células normais. O tratamento empregando-se a dose correspondente ao IC₇₅ do peptídeo Hr22 reduziu o número de células viáveis e a maioria das células apresentaram membrana plasmática danificada. Ambos os peptídeos induziram uma maior exposição de fosfatidilserina (marcada com anexina V-FITC) e não apresentaram marcação somente com iodeto de propídio (PI) quando testados na dose correspondente ao IC₅₀. Empregando-se a dose do IC₇₅ do peptídeo Hr22, observou-se alterações no potencial de membrana mitocondrial, além da fragmentação de DNA e alterações no ciclo celular, sugerindo morte celular por apoptose. Mais estudos são necessários para a melhor compreensão de como agem estes peptídeos. A produção de análogos com modificações estruturais podem melhorar suas atividades e especificidades tanto para micro-organismos quanto para células de câncer.

ABSTRACT

Currently, the number of microorganisms resistant to conventional antibiotics is rising, thus the development of new alternatives that may hold back this increase in resistance is essential. The antimicrobial peptides emerged as an attractive alternative because they act on the plasma membrane, reducing the possibility of resistance. Amphibian skin secretion is a rich source of these peptides and many of them also have activity on tumor cells. The present study aimed to evaluate *Hypsiboas raniceps* skin secretion for the presence of peptides with antiproliferative and cytotoxic activity against pathogenic bacteria and fungi, as well as murine melanoma cells (B16F10). Two novel peptides were identified, named Hr22 and Hr24, with potent activity against bacteria, especially on Gram-positive pathogens, also showing activity on human red blood cells, melanoma cells (B1F10) and normal fibroblasts (NIH3T3). In respect to the effects on melanoma cells, the peptides were also toxic to normal cell lines tested, however the Hr24 peptide indicated a probable selectivity in relation to cancer cells, with an effective dose of about half of the value obtained for normal cells. Treatment employing the corresponding IC₇₅ dose of the Hr22 peptide reduced the number of viable cells and most cells showed plasma membrane damaged. Both peptides induced a higher exposure of phosphatidylserine (anexin V-FITC labeled) and were not labeled only with propidium iodide (PI) when tested with the corresponding IC₅₀. Employing the IC₇₅ dose of the Hr22 peptide, alterations were observed in the mitochondrial membrane potential, as well as DNA fragmentation and alterations in the cell cycle, suggesting cell death by apoptosis. More studies are needed to better understand how these peptides act. The production of analogs with structural modifications can improve their activities and specificities for both micro-organisms and cancer cells.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. <i>Hypsiboas raniceps</i>	18
1.2. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)	20
1.3. Resistência microbiana	25
1.4. Fungos	26
1.5. Peptídeos anticâncer	27
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVO E METAS	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Metas estabelecidas	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Obtenção da secreção cutânea	32
4.2. Fracionamento da secreção cutânea bruta de <i>H. raniceps</i> por cromatografia líquida de alta eficiência	32
4.3. Purificação dos peptídeos bioativos	33
4.4. Espectrometria de massas	33
4.4.1. Sequenciamento <i>de novo</i>	34
4.5. Ensaio antimicrobianos	34
4.5.1. Ensaio antibacteriano	34
4.5.2. Ensaio antifúngico	35
4.5.3. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)	35
4.6. Ensaio sobre células tumorais	36
4.6.1. Manutenção da cultura de células	36
4.6.2. Tratamento das células com os peptídeos de <i>H. raniceps</i>	37
4.6.3. Viabilidade Celular (MTT)	39
4.6.4. Avaliação da integridade de membrana e proliferação celular	39
4.6.5. Efeitos apoptóticos	40
4.6.6. Potencial de membrana mitocondrial	41
4.6.7. Fragmentação de DNA e ciclo celular	41
4.7. Ensaio hemolítico	42
4.7.1. Determinação da HC ₅₀	43

4.8. Bioinformática	43
4.9. Análise estatística	43
5. RESULTADOS	44
5.1. Fracionamento cromatográfico da secreção bruta e análises por espectrometria de massas.....	44
5.2. Determinação de MIC, HC ₅₀ e IC ₅₀	50
5.3. Efeitos citotóxicos e citostáticos.....	52
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÃO.....	72
8. PERSPECTIVAS	73
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécime adulto de <i>Hypsiboas raniceps</i> . Foto: Pedro Peloso, Dom Pedro - MA.....	19
Figura 2. Função biológica dos peptídeos antimicrobianos. Os PAMs ligam-se às membranas bacterianas através de interações eletrostáticas, tanto para romper a membrana ou para entrar na bactéria para inibir alguma função intracelular... ..	21
Figura 3. Diversidade estrutural dos peptídeos antimicrobianos.	22
Figura 4. Representação esquemática do modelo <i>barrel-stave</i>	23
Figura 5. Esquema do modelo <i>carpet-like</i>	24
Figura 6. Ilustração do modelo Shai-Matsuzaki-Huang.	25
Figura 7. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de <i>Hypsiboas raniceps</i> em uma coluna C ₈ (Vydac 208TP54).	44
Figura 8. Recromatografia da fração Hr22 de <i>H. raniceps</i> em uma coluna Vydac C ₈ (Vydac 208TP54)	45
Figura 9. Recromatografia da fração Hr24 de <i>H. raniceps</i> em uma coluna Vydac C ₈ (Vydac 208TP54)	45
Figura 10. Espectro de massa monoisotópica (M+H ⁺) da fração Hr22 com 3006,41 Da.....	46
Figura 11. Espectro de massa monoisotópica (M+H ⁺) da fração Hr24 com 1914,78 Da.....	46

Figura 12. A) Espectro MS/MS do peptídeo Hr22 obtido no Orbitrap Elite	48
Figura 13. A) Espectro MS/MS do peptídeo Hr24 obtido no Orbitrap Elite.....	49
Figura 14. Alinhamento do peptídeo Hr22 com o peptídeo predito figainina-4.....	50
Figura 15. Alinhamento do peptídeo Hr24 com o peptídeo hilina a1	50
Figura 16. Porcentagem de células viáveis pelo ensaio de MTT nas concentrações de 1 a 64 μ M após incubação por 24 horas do peptídeo Hr22 e do peptídeo Hr24 sobre células B16F10 e NIH3T3.	52
Figura 17. Contagem de células B16F10 tratadas com água (controle) e após o tratamento com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC ₅₀	52
Figura 18. Contagem de células B16F10 tratadas com água (controle) e após o tratamento com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC ₇₅	53
Figura 19. Avaliação da morfologia celular de células B16F10 tratadas com o peptídeo Hr22 e o peptídeo Hr24 na concentração correspondente ao IC ₅₀	54
Figura 20. Avaliação da morfologia celular de células B16F10 tratadas com o peptídeo Hr22 e o peptídeo Hr24 na concentração correspondente ao IC ₇₅	54
Figura 21. Efeito dos peptídeos Hr22 e Hr24 sobre as células B16F10 utilizando os marcadores anexina V-FITC (apoptose) e iodeto de propídio (necrose).....	56
Figura 22. Comparação entre os efeitos dos tratamentos com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC ₅₀ e o controle nos quatro quadrantes (Q) analisados.....	57

Figura 23. Comparação entre os efeitos dos tratamentos com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC ₇₅ e o controle nos quatro quadrantes (Q) analisados.....	58
Figura 24. Determinação do efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial de células B16F10 de células tratadas com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC ₅₀	59
Figura 25. Efeito do tratamento com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC ₅₀ sobre o potencial de membrana mitocondrial de células de melanona murino B16F10.	60
Figura 26. Efeito do tratamento com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC ₇₅ sobre o potencial de membrana mitocondrial de células de melanona murino B16F10.....	62
Figura 27. Sobreposição dos histogramas de potencial de membrana mitocondrial de células B16F10 tratadas com a dose correspondente ao IC ₇₅ dos peptídeos Hr22 e Hr24.....	62
Figura 28. Percentual de células B16F10 com DNA fragmentado quando tratados com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC ₅₀ e ao IC ₇₅	63
Figura 29. Proporção de células B16F10 nas diferentes fases do ciclo celular tratadas na concentração correspondente ao IC ₅₀ dos peptídeos Hr22 e Hr24	64
Figura 30. Proporção de células B16F10 nas diferentes fases do ciclo celular tratadas na concentração correspondente ao IC ₇₅ dos peptídeos Hr22 e Hr24	65

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Peptídeos antimicrobianos descritos na literatura isolados da secreção cutânea de espécies do gênero *Hypsiboas*.....19
- Tabela 2.** Atividade antimicrobiana (MIC) e hemolítica (HC₅₀) dos peptídeos Hr22 e Hr24 isolados da secreção cutânea de *H. raniceps*.51

ABREVIACÖES

ATCC – Coleção americana de culturas típicas, do inglês *american type culture collection*

BHI – Infusão cérebro-coração, do inglês *brain heart infusion*

CFU – Unidade formadora de colônia, do inglês *colony-forming unit*

CID – Dissociação induzida por colisão, do inglês *collision-induced dissociation*

Da – Dalton

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco, do inglês *Dulbecco's modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

ESI – Ionização por electrospray, do inglês *electrospray ionization*

ETD – Dissociação por transferência de elétrons, do inglês *electron-transfer dissociation*

FITC – Isotiocianato de fluoresceína, do inglês *fluorescein isothiocyanate*

FSC - Dispersão frontal relativo ao tamanho celular, do inglês *forward scatter*

HC₅₀ – Concentração mínima capaz de promover 50% de hemólise

HCCA – Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, do inglês *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*

HCD – Dissociação por colisão de alta energia, do inglês *high-energy collision dissociation*

Hepes – 2-[4-(2-hidroxietil)piperazina-1-il] ácido etanosulfônico, do inglês *2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid*.

IC₅₀ – Concentração mínima capaz de inibir o crescimento em 50%

IC₇₅ – Concentração mínima capaz de inibir o crescimento em 75%

IP – Iodeto de propídio, do inglês *propidium iodide*

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography-mass spectrometry*.

MALDI-TOF – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – Tempo de Voo, do inglês *matrix assisted laser desorption ionization – time of flight*.

MIC – Concentração mínima inibitória, do inglês *minimal inhibitory concentration*.

Min – Minuto

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, do inglês *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

Nm – Nanometro

PAM – Peptídeo antimicrobiano

PBS – Tampão salino fosfato, do inglês *phosphate buffered saline*

RP-HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês *reversed-phase high-performance liquid chromatography*.

SSC – Dispersão lateral relativo à granulidade celular, do inglês *side scatter*

TFA – Ácido trifluoroacético, do inglês *trifluoroacetic acid*

1. INTRODUÇÃO

A classe Amphibia contém 7.487 espécies descritas e estão divididas em três ordens: Gymnophiona (cecílias), Caudata (salamandras) e Anura (sapos, rãs e pererecas), sendo que ordem Anura possui o maior número de representantes, totalizando, até o momento 6.579 espécies (Frost, 2016).

Uma característica dos anfíbios é a presença de um tegumento altamente especializado, que realiza grande parte das trocas gasosas de oxigênio e gás carbônico com o ambiente. Existem dois tipos de glândulas acinares na pele dos anfíbios: as glândulas mucosas que são mais numerosas e secretam mucinas, com a função de umidificar e lubrificar a pele para auxiliar na respiração cutânea, termorregulação e proteção física contra predadores por meio da lubrificação ou liberação de substâncias pegajosas para dificultar sua captura (Rollins-Smith *et al.*, 2005) e as glândulas granulosas que são menos numerosas, mas sintetizam e armazenam a maioria das substâncias tóxicas e nocivas encontradas na secreção cutânea dos anfíbios. Quando há estímulo resultante de estresse ou injúria, ocorre a contração dos miócitos que envolvem a glândula liberando seu conteúdo. Tais glândulas liberam secreções que contêm compostos ativos como aminas biogênicas, esteroides, alcaloides, bufodienolídeos, peptídeos e proteínas que podem ter efeito neurotóxico, vasoconstritor, alucinógeno, hipotensor, antimicrobiano e citotóxico, entre outros (Simmaco *et al.*, 1998; Nascimento *et al.*, 2003).

1.1. *Hypsiboas raniceps*

O gênero *Hypsiboas* compreende, até o momento, 90 espécies descritas, as quais encontram-se distribuídas, em grande parte, na América do Sul (Frost, 2016). Considerando a quantidade de espécies do gênero, o número de estudos sobre

peptídeos bioativos ainda é pequeno abordando um número reduzido de espécies incluídas nesse gênero, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Peptídeos antimicrobianos descritos na literatura isolados da secreção cutânea de espécies do gênero *Hypsiboas*.

Espécie	Peptídeo	Sequência	Massa (Da)	Referência
<i>H. lundii</i> (<i>Hyla biobeba</i>)	Hylin b1	FIGAILPAIAGLVHGLINR	1945,38	Castro <i>et al.</i> , 2005
<i>H. lundii</i> (<i>Hyla biobeba</i>)	Hylin b2	FIGAILPAIAGLVGGLINR	1865,29	Castro <i>et al.</i> , 2005
<i>H. albopunctatus</i>	Hylin a1	IFGAILPLALGALKNLIK	1864,37	Castro <i>et al.</i> , 2009
<i>H. semilineatus</i>	Hs-1	FLPLILPSIVTALSSFLKQG	2144,60	Nacif-Marçal <i>et al.</i> , 2015
<i>H. punctatus</i> (<i>Hyla punctata</i>)	Hylaseptin P1	GILDAIKAIKAAG	1311,80	Prates <i>et al.</i> , 2004
<i>H. pulchellus</i>	P1-Hp-1971	TKPTLLGLPLGAPAAAGPGKR	1971,1	Siano <i>et al.</i> , 2014
<i>H. pulchellus</i>	P2-Hp-1935	KLSPSLGPVSKGKLLAGQR	1935,2	Siano <i>et al.</i> , 2014
<i>H. pulchellus</i>	P3-Hp-1891	RLGTALPALLKTLLAGLNG	1891,2	Siano <i>et al.</i> , 2014
<i>H. albopunctatus</i>	Ctx-Ha	GWLDVAKKIGKAAFNVAKNF(L/I)	2288,8	Cespedes <i>et al.</i> , 2012
<i>H. raniceps</i>	Rsp-1	AWLDKLSLKGKVVGVKVALGVAQNYLNPQQ	3136,78	Magalhães <i>et al.</i> , 2008

A espécie *Hypsiboas raniceps* (Figura 1), encontra-se distribuída por grande parte da América do Sul e não está ameaçada de extinção de acordo com a Lista Vermelha da IUCN (La Marca *et al.*, 2004).



Figura 1. Espécime adulto de *Hypsiboas raniceps*. Foto: Pedro Peloso, Dom Pedro-MA.

1.2. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

A permeabilidade do tegumento à água limita a dispersão da maioria dos anfíbios a micro habitats úmidos onde possam controlar o ganho e a perda de água (osmorregulação), além do controle da temperatura corporal (Nascimento *et al.*, 2003). Por ser uma estrutura sensível e estar em contato direto com o ambiente, ou seja, estar constantemente exposta à ação de potenciais agentes patogênicos, os anfíbios apresentam na sua secreção cutânea peptídeos antimicrobianos que fazem parte do seu sistema imune inato. Os PAMs da secreção cutânea dos anuros são caracterizados por ter de 10 a 46 resíduos de aminoácidos, sendo que a maioria apresenta-se como moléculas catiônicas (carga líquida igual ou superior a +2) e, aproximadamente, 50% dos resíduos presentes em suas cadeias peptídicas são representados por aminoácidos hidrofóbicos (Nascimento *et al.*, 2003; Marr *et al.*, 2006).

De acordo com dados da literatura, a atividade bactericida dos peptídeos não é mediada por interações entre receptores específicos, mas pela interação direta entre o peptídeo e os fosfolípidos da membrana plasmática (Figura 2). Muitos PAMs adotam uma estrutura secundária em α -hélice anfipática somente quando em contato com as membranas celulares, tornando-se ativos e perturbando a integridade da membrana, criando falhas ou formando poros (Bechinger e Lohner, 2006; Conlon *et al.*, 2009; Azevedo Calderon *et al.*, 2011; Conlon, 2011). A carga positiva dos PAMs favorece uma maior interação com os fosfolípidos negativamente carregados (fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e cardiolipina) das membranas bacterianas do que com fosfolípidos “zwitteriônicos” (neutros) presentes na face extracelular da membrana de células de mamíferos (Biggin e Sansom, 1999; Matsuzaki, 1999; Reddy *et al.*, 2004; Ramamoorthy, 2009).

Os PAMs não se restringem apenas a lise de potenciais patógenos na primeira linha de defesa. Com o avanço das pesquisas, vem sendo possível observar que esse grupo de moléculas desempenha um importante papel além da imunidade inata, mas também contribui para uma resposta adaptativa de diversos organismos (Mansour *et al.*, 2014; Mansour e Hancock, 2015; Zhang e Gallo, 2016).

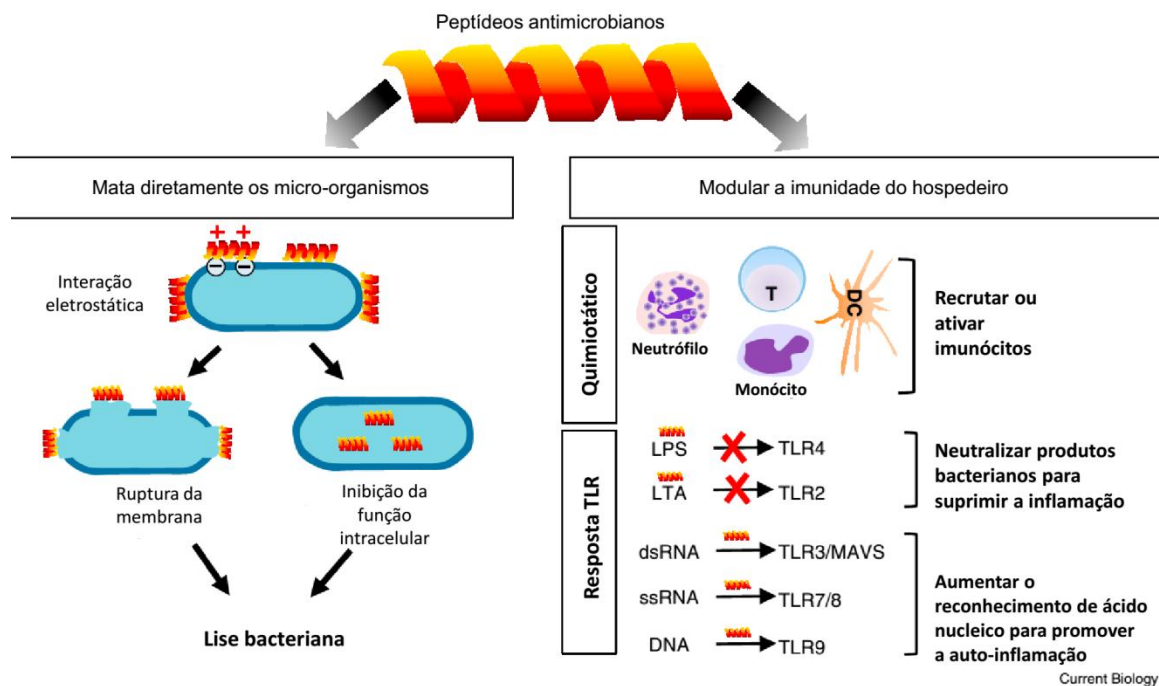


Figura 2. Função biológica dos peptídeos antimicrobianos. Os PAMs ligam-se às membranas bacterianas através de interações eletrostáticas, tanto para romper a membrana ou para entrar na bactéria para inibir alguma função intracelular. Alguns PAMs também modulam a imunidade do hospedeiro através do recrutamento / ativação de imunócitos ou mediando o reconhecimento de receptores do tipo Toll (TLR) a produtos microbianos e ácidos nucleicos liberados com dano tecidual. DC, de células dendríticas; LPS, lipopolissacarídeo; LTA, ácido lipoteicóico; MAVS, proteína mitocondrial de sinalização antiviral. Modificado de Zhang e Gallo (2016).

Os peptídeos antimicrobianos adotam diferentes estruturas (Figura 3) e estas estão diretamente relacionadas com os seus mecanismos de ação. Vários mecanismos de ação já foram propostos para explicar a atividade e especificidade dos antimicrobianos sobre os micro-organismos (Zasloff, 2002).

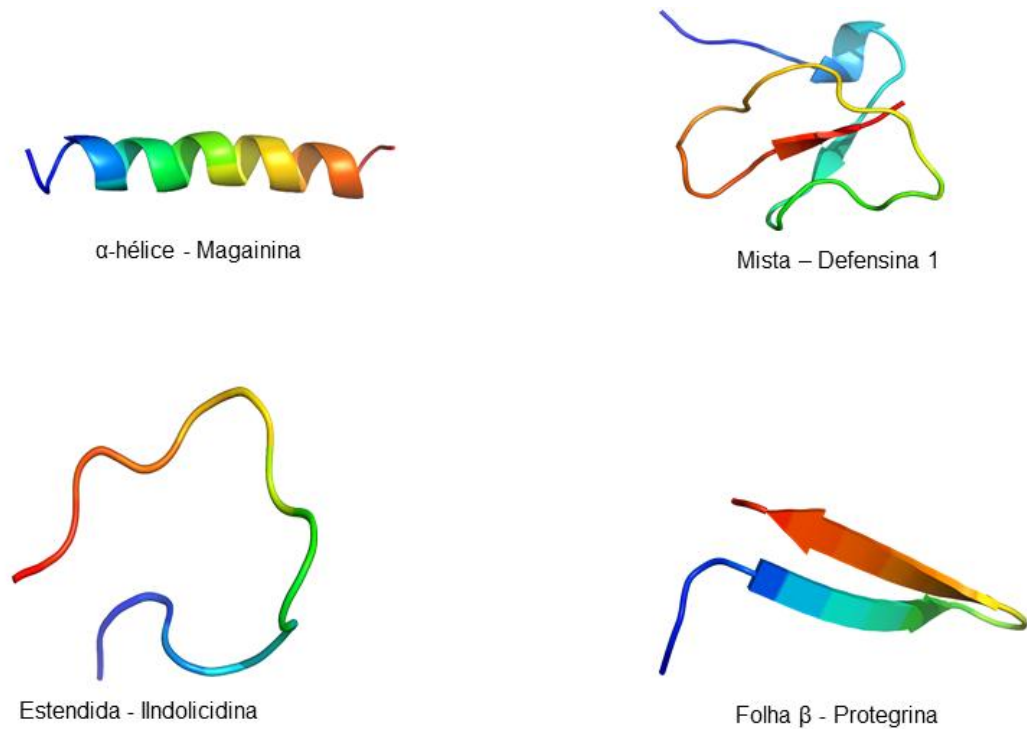


Figura 3. Diversidade estrutural dos peptídeos antimicrobianos. As estruturas foram obtidas do SCOPe. Disponível em: <http://scop.berkeley.edu>. (Fox *et al.*, 2014).

Modelo *barrel-stave*: este mecanismo envolve a associação de várias moléculas de peptídeos na membrana lipídica formando um canal transmembranar (Brogden, 2005). Outro modelo, proposto para alguns grupos de peptídeos como magainina e mastoparan, denominado **poro toroidal** é semelhante ao *barrel-stave*, diferenciando-se pela intercalação dos peptídeos com os fosfolipídios para formar o poro (Figura 4) (Brogden, 2005; Sengupta *et al.*, 2008).

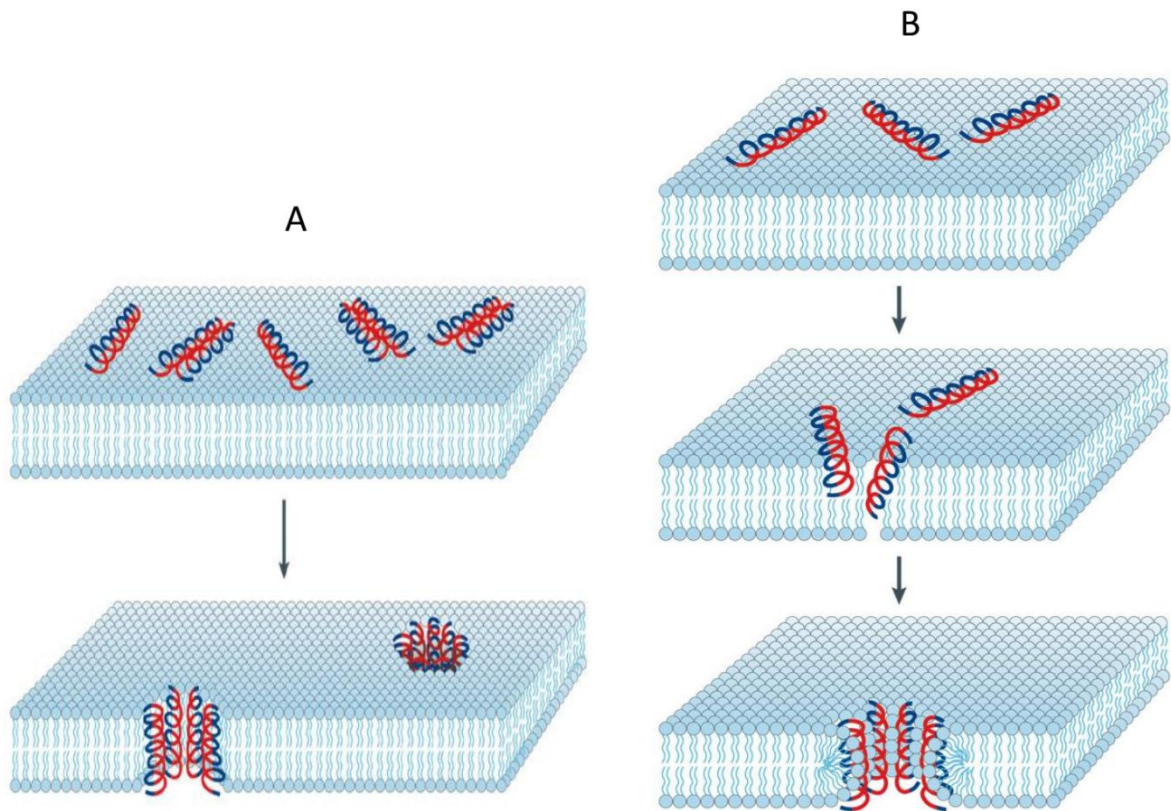


Figura 4. Representação esquemática do modelo *barrel-stave* (A). Os peptídeos ligam-se à membrana de modo que as regiões hidrofóbicas dos peptídeos (em azul) interagem com a região do núcleo lipídico e as regiões hidrofílicas (em vermelho) ficam voltadas para o interior do poro. Poro toroidal (B) as hélices dos peptídeos inserem-se na membrana e induzem as monocamadas lipídicas a se dobrarem através do poro, ficando expostas as partes hidrofílicas dos fosfolípidios e dos peptídeos (Retirado de Brogden, 2005).

Modelo *carpet-like*: foi proposto inicialmente por Pouny *et al.* (1992), estudando o peptídeo dermaseptina. Os peptídeos ligam-se a membrana-alvo formando algo semelhante a um tapete, em seguida, os peptídeos causam a permeabilização e desintegração da membrana (Figura 5) (Shai e Oren, 2001).

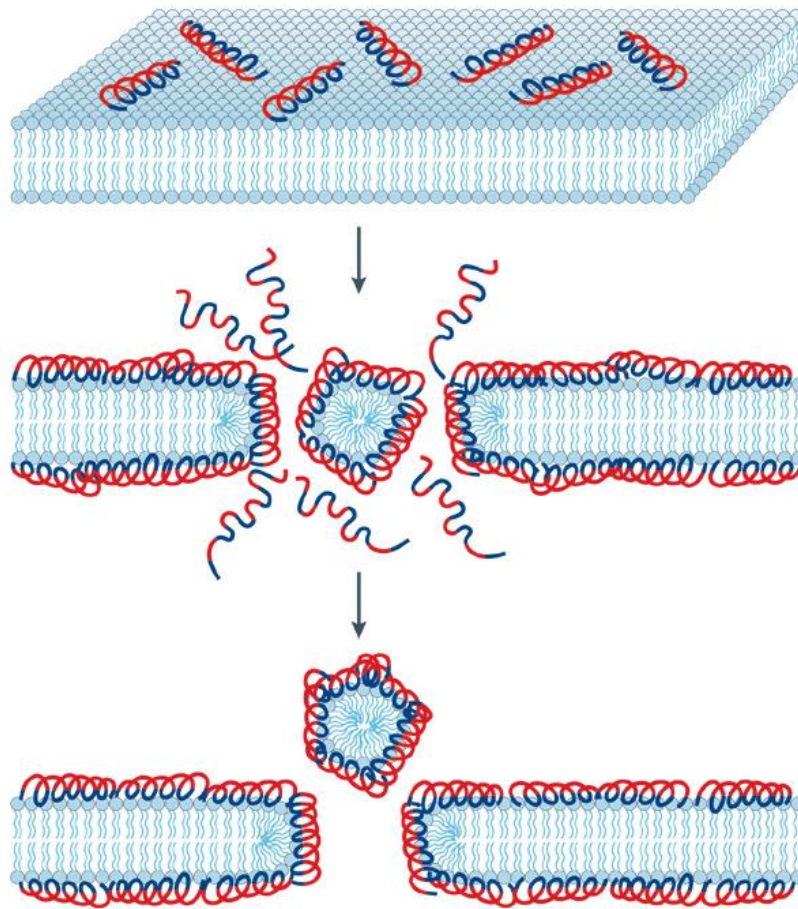


Figura 5. Esquema do modelo *carpet-like*. As superfícies hidrofóbicas (azul) dos peptídeos ligam-se à membrana e as superfícies hidrofílicas (vermelho) ficam voltadas para o meio. Os peptídeos rompem a membrana através da orientação paralela à superfície da bicamada lipídica. Em altas concentrações dos peptídeos ocorrerá, eventualmente, a desintegração da membrana e a formação de micelas (Retirado de Brogden, 2005).

Modelo **Shai-Matsuzaki-Huang**: este modelo envolve a formação de carpete e de poro pela adesão de peptídeos na membrana do microrganismo, causando uma diminuição na espessura da membrana, estiramento e formação de poros e a interação de peptídeos com alvos intracelulares (Figura 6) (Matsuzaki, 1999; Shai, 1999; Huang, 2000).

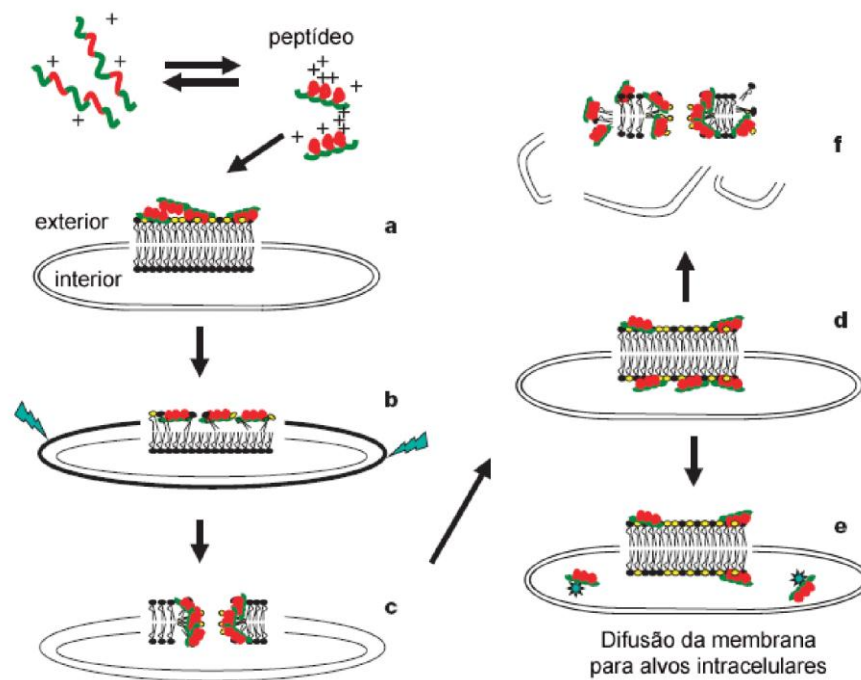


Figura 6. Ilustração do modelo Shai-Matsuzaki-Huang. a) Formação de um carpete de peptídeos na camada externa da membrana. b) Integração do peptídeo à membrana e afinamento da camada externa. c) Formação de poros transitórios. d) Transporte de lipídios e peptídeos para a camada interna. e) Difusão dos peptídeos para alvos intracelulares (em alguns casos). f) Colapso da membrana em fragmentos (Modificado de Zasloff, 2002).

1.3. Resistência microbiana

A resistência dos micro-organismos aos antibióticos convencionais representa um dos maiores desafios para a medicina atual. O uso indiscriminado de antibióticos naturais e seus derivados vêm promovendo a seleção de micro-organismos resistentes. Além disso, o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas vem diminuindo drasticamente, com a ressalva que grande parte das drogas lançadas no mercado são derivadas das já existentes, ou seja, os mecanismos de ação empregados permanecem os mesmos (Spellberg *et al.*, 2004; Spellberg e Gilbert, 2014).

A rápida propagação de estirpes resistentes pode resultar em consequências graves para os hospedeiros. A resistência entre o carbapenem comum e bactérias

da família Enterobacteriaceae vem aumentando significativamente na última década, sendo as bactérias do gênero *Klebsiella* as que mais exibiram resistência (Laxminarayan *et al.*, 2013). As infecções associadas aos cuidados de saúde em países subdesenvolvidos são muito superiores aos países de primeiro mundo, estima-se que mais de 100 mil mortes neonatais são atribuíveis a organismos Gram-negativos e ao patógeno Gram-positivo *S. aureus* e mais de 50 mil são atribuídas à resistência de Enterobacteriaceae produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) apenas na Índia (Laxminarayan *et al.*, 2013).

1.4. Fungos

Os fungos compreendem uma grande quantidade de espécies que causam doenças nos seres humanos, incluindo, por exemplo, várias espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Candida* (Pfaller *et al.*, 2002; Romani, 2011).

Candida albicans é o fungo com maior incidência de doenças em humanos. Estes micro-organismos vivem como comensais em diversos locais do corpo humano, atuando como patógenos oportunistas em decorrência de queda de imunidade ou expressando fatores de virulência. Quando na corrente sanguínea está associado a altas taxas de mortalidade (Calderone e Fonzi, 2001; Pfaller *et al.*, 2002; Berman, 2012).

1.5. Peptídeos anticâncer

O câncer representa atualmente uma das maiores causas de morte no mundo e está associado ao envelhecimento da população e também a alguns comportamentos como o tabagismo e alcoolismo. A estimativa é de que ocorreram 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes em 2012 (Ferlay *et al.*, 2015; Torre *et al.*, 2015).

O termo câncer refere-se a mais de 100 doenças que afetam diversos tecidos e se caracterizam pela divisão desordenada de células resultante de um pequeno número de mutações (Balmain *et al.*, 1993; Hanahan e Weinberg, 2011). De acordo com Hanahan e Weinberg (2011), para uma célula se tornar cancerosa, ela tem que apresentar seis alterações essenciais: a autossuficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade aos sinais do inibidor do crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, e a invasão de tecidos e metástases. Há várias formas para o tratamento do câncer, sendo que as três principais são: cirurgia, radioterapia ou quimioterapia (Almeida *et al.*, 2005). Embora quando localizados os cânceres podem ser tratados com cirurgia ou radioterapia, a quimioterapia continua sendo o tratamento de escolha para os casos mais graves. A quimioterapia envolve o uso de medicamentos de baixa massa molecular para destruir seletivamente o tumor ou limitar seu crescimento, entretanto o uso desses agentes citotóxicos possuem vários efeitos colaterais como supressão de medula óssea, lesões no trato gastrointestinal, náusea, além do desenvolvimento de resistência clínica (Nussbaumer *et al.*, 2011).

A resistência às drogas anticâncer vem sendo um fator limitante para o tratamento. A perda de receptores de superfície celular ou para um transportador da droga, bombas de efluxo que limitam a acumulação de fármacos no interior da

célula, reparação de danos no DNA são exemplos de resistências apresentadas pelas células tumorais (Gottesman, 2002).

Gaspar *et al.* (2013) sugerem que como o aumento do número de pessoas que sofrem com doenças relacionadas ao câncer aumentam a cada dia e as terapias convencionais reúnem um número preocupante de desvantagens, novas opções de tratamento representam uma demanda para aliviar os sintomas e erradicação da doença. Nesse contexto, os peptídeos anticâncer demonstram ser uma estratégia interessante para o desenvolvimento de novas drogas para combate ao câncer (Hoskin e Ramamoorthy, 2008).

Diversos peptídeos têm sido relatados com atividade anticâncer. Uma busca no banco de dados *The Antimicrobial Peptide Database* (APD) resultou em 183 entradas para o termo *anticâncer / antitumor peptide*, sendo que grande parte destes são originados de anfíbios (Wang *et al.*, 2009). O peptídeo magainina 2, identificado primariamente como peptídeo antimicrobiano, originado do sapo com garras africano *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987), mostrou-se bastante eficiente em inibir a proliferação de células cancerosas de bexiga e não apresentou efeito sobre fibroblastos não cancerosos (Lehmann *et al.*, 2006). As dermaseptinas B2 e B3, da espécie *Phyllomedusa bicolor*, também mostraram seletividade em relação a células cancerosas e células não cancerosas, além de uma baixa concentração efetiva (Zoggel *et al.*, 2010).

Os peptídeos anticâncer podem ser divididos em duas classes principais. A primeira classe inclui peptídeos que são extremamente potentes contra células cancerosas e bactérias, mas não contra células de mamíferos, como as cecropinas e magaininas. A segunda classe inclui peptídeos que são tóxicos para bactérias e para células de mamíferos tanto cancerosas quanto não cancerosas, como a

melitina isolada da peçonha de abelhas, a taquiplesina II isolado do caranguejo-ferradura e as defensinas de neutrófilos humanos.

Existem várias diferenças entre as membranas celulares das células cancerosas e células normais que podem ser usadas para explicar a toxicidade seletiva de alguns peptídeos catiônicos. As membranas das células de câncer tipicamente apresentam uma carga líquida negativa devido à presença de moléculas aniônicas, tais como a fosfatidilserina, mucinas O-glicosiladas e ganglicosídeos sialilados (Schweizer, 2009). Em contraste, as membranas celulares normais de mamíferos estão compostas essencialmente de fosfolipídeos neutros e esteróis zwitteriônicos (Hoskin e Ramamoorthy, 2008). O colesterol, um dos principais componentes das células eucarióticas (Simons e Ikonen, 2000), tem sido sugerido como protetor dos efeitos citolíticos dos peptídeos antimicrobianos através da alteração da fluidez da membrana, interferindo com a inserção dos peptídeos líticos (Leuschner e Hansel, 2004).

O mecanismo de ação dos peptídeos sobre células tumorais ainda não está totalmente esclarecido, porém há dois mecanismos melhor estudados: o mecanismo membranolítico e o não membranolítico. O modo de ação membranolítico é similar à ação antibacteriana, onde os peptídeos rompem a parede celular, os peptídeos lisam a membrana das células cancerosas ou penetram nas células e provocam permeação e inchaço nas mitocôndrias, resultando na liberação de citocromo c e indução de apoptose (Schweizer, 2009). O mecanismo não membranolítico foi observado estudando o peptídeo melitina, que especificamente seleciona células com o oncogene ras super expresso, atuando na hiperativação de fosfolipase A2 nestas células, resultando na sua destruição (Sharma, 1992). Outro estudo indicou que os peptídeos conhecidos como alloferons, derivados de insetos, são capazes de

promover a modulação de citosinas e versões sintéticas destas moléculas (alloferon 1 e alloferon 2) apresentaram atividades estimuladoras de linfócitos *natural killer* em ensaios *in vitro* e ensaios *in vivo* em camundongos indicaram a indução da produção de interferons, exibindo assim, atividades imunomoduladoras (Chernysh *et al.*, 2002; Schweizer, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

A pele de anfíbios é fonte de uma grande quantidade de moléculas biologicamente ativas, incluindo peptídeos, aminas biogênicas, alcaloides e proteínas, que funcionam como uma barreira eficiente no controle de infecção por micro-organismos. (Clarke, 1997; Daly *et al.*, 2005; Libério *et al.*, 2014). Atualmente é imenso o número de peptídeos antimicrobianos que já foram isolados a partir da pele de anfíbios. Uma busca no *UniProt Knowledgebase* pelo termo “*amphibian antimicrobial peptide*” resultou em 1.724 sequências (Magrane e Uniprot Consortium, 2011).

Os peptídeos antimicrobianos possuem um grande potencial terapêutico devido a sua capacidade lítica. Eles têm demonstrado habilidade em matar rapidamente um grande espectro de micro-organismos, incluindo as bactérias multirresistentes a drogas convencionais, exibindo atividade contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além da baixa probabilidade de resistência devido à sua interação com a membrana plasmática dos micro-organismos. Todavia alguns mecanismos de resistência em bactérias patogênicas humanas já foram descritos (Nizet, 2006). O processo de resistência aos peptídeos antimicrobianos é lento se comparado aos antibióticos atualmente

disponíveis e esta resistência pode ser superada alterando a estrutura do peptídeo ou incorporando D-aminoácidos à sua estrutura (Marr *et al.*, 2006).

O fato de que células tumorais são compostas por membranas celulares que estão alteradas em relação às células não neoplásicas, dando-lhes uma carga negativa aumentada, predispõe estas células a servirem como alvos dos peptídeos antimicrobianos (Oelkrug *et al.*, 2015), fazendo deste grupo de moléculas uma fonte muito interessante para investigação e desenvolvimento de novas drogas para complementar o combate do câncer.

O Brasil possui uma extensa fauna de anfíbios, mas poucas espécies foram estudadas. Pesquisas básicas relacionadas com o isolamento, caracterização química e biológica de novas moléculas da secreção cutânea de anuros tem revelados diversas moléculas com potencial biotecnológico promissor. O grupo da profa. Mariana S. Castro vem se dedicando há mais de uma década na busca de peptídeos biologicamente ativos da secreção cutânea de anuros da fauna brasileira, de modo a fomentar a indústria com novas drogas para tratamento de infecções por bactérias e fungos, bem como a descoberta de drogas que possam auxiliar no combate a câncer.

3. OBJETIVO E METAS

3.1. Objetivo geral

Identificar, isolar e caracterizar biologicamente peptídeos presentes na secreção cutânea de *Hypsiboas raniceps* com atividade antiproliferativa sobre bactérias e fungos patogênicos e sobre células tumorais.

3.2. Metas estabelecidas

1. Fracionar a secreção cutânea bruta de *H. raniceps* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C₈;
2. Avaliar os efeitos antiproliferativos e citotóxicos das frações cromatográficas resultantes do fracionamento da secreção cutânea de *H. raniceps* sobre bactérias, fungos e células tumorais;
3. Purificar os peptídeos bioativos identificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C₈;
4. Analisar as frações bioativas identificadas empregando espectrometria de massas dos tipos MALDI-TOF/MS e ESI-MS/MS;
5. Caracterizar química e biologicamente os peptídeos bioativos purificados;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção da secreção cutânea

Espécimes adultos de *H. raniceps* foram coletados durante a noite com o auxílio de uma lanterna, na fazenda Nossa Senhora Aparecida, no município de Monte Alegre - GO, divisa com o estado de Tocantins (licença SISBIO Nº 51541-1). A secreção cutânea foi obtida por meio de estimulação elétrica moderada. A secreção liberada foi recolhida por meio de lavagem do corpo do animal com água Milli Q e, em seguida, congelada, liofilizada e armazenada a -20°C até o momento do uso.

4.2. Fracionamento da secreção cutânea bruta de *H. raniceps* por cromatografia líquida de alta eficiência

Alíquotas de 5,0 mg da secreção liofilizada foram ressuspensas em 250 µL de TFA 0.1% (v/v) em água Milli Q (solvente A) e centrifugadas por 5 min a 15.800 g. Alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram aplicadas em uma coluna de fase

reversa C₈ (Vydac 208TP54) com fluxo de 1 mL/min e detecção em 216 nm. A coluna foi previamente equilibrada com solvente A (TFA 0,1%, v/v, em água Milli Q). As frações foram eluídas aplicando-se as seguintes condições: gradiente de 0 a 25% de solvente B (TFA 0,1%, v/v, em acetonitrila) em 5 min; de 25 a 45% de solvente B em 25 min, de 50 a 100% de solvente B em 10 min, seguido de lavagem final por 5 min com 100% de solvente B. As frações eluídas foram coletadas manualmente, secas em concentrador a vácuo e armazenadas a -20°C até utilização.

4.3. Purificação dos peptídeos bioativos

As frações de interesse foram recromatografadas usando a mesma coluna da etapa anterior (Vydac 208TP54) com as seguintes condições cromatográficas: a coluna foi previamente equilibrada com solvente A e a eluição foi realizada empregando-se o gradiente de 0 a 55% de solvente B em 5 minutos, de 55 a 65% de solvente B em 10 min, de 90 a 100% do solvente B em 5 min, seguida de uma lavagem a 100% por 5 min. A fração de interesse foi coletada e acumulada em quantidade suficiente e armazenada a -20°C até a realização dos experimentos.

4.4. Espectrometria de massas

As frações cromatográficas que exibiram atividade antiproliferativa e citotóxica nos ensaios realizados foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF modelo AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (AB Sciex, Framingham, MA, EUA). As frações foram ressuspensas em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v) e 1 µL de cada fração cromatográfica foi aplicada em placa de aço inoxidável juntamente com 1 µL de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 20 µg/µL) ressuspensa em acetonitrila 50% (v/v), contendo TFA 0,1% (v/v). O procedimento foi realizado no modo refletido positivo, sendo a faixa m/z analisada de 1500 a 4000 Da.

4.4.1. Sequenciamento *de novo*

As frações cromatográficas que exibiram atividade nos ensaios biológicos realizados também foram fragmentadas para obtenção de sequências de aminoácidos por meio de sequenciamento *de novo* usando um equipamento do tipo ESI LTQ Orbitrap Elite (Thermo Scientific, San Jose, CA). As amostras foram ressuspensas em 180 µL de ácido fórmico 0,1% (v/v) e, em seguida, foram adicionados 20 µL de acetonitrila, totalizando um volume de 200 µL. As amostras foram injetadas com fluxo de 5 µL por minuto e as fragmentações foram realizadas usando os modos CID, ETD e HCD e posteriormente analisadas pelo *software* PEAKS Studio 7.5 (Bioinformatics Solutions, Ontario, Canadá).

4.5. Ensaio antimicrobianos

4.5.1. Ensaio antibacteriano

As cepas das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e Gram-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) foram gentilmente cedidas pelo LACEN-DF.

As bactérias foram cultivadas ressuspensando 200 µL do estoque de bactérias em 6,8 mL de meio Mueller-Hinton sob agitação a 37°C por 24 horas e a densidade óptica foi ajustada para 1 a 590 nm. As bactérias, em fase logarítmica de crescimento, foram diluídas no mesmo meio de cultura nas proporções 1:50 para as Gram-negativas e 1:100 para as Gram-positivas. Uma alíquota de 50 µL de cada cultura bacteriana (contendo de 2 a 5 x 10⁵ CFUs) foi incubada por 22 h a 37°C com 50 µL de amostra ressuspensa em água Milli-Q estéril. Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v)

e água Milli-Q estéril ambos incubados com as suspensões bacterianas. A inibição do crescimento foi determinada pela leitura da densidade óptica a 595 nm com uma leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA).

4.5.2. Ensaio antifúngico

As cepas dos fungos *Candida albicans* (ATCC 90028) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) foram gentilmente cedidas pelo LACEN-DF e ressuspensas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Com o crescimento pleno das colônias, foram feitos estoques (glicerina 70% (v/v) e caldo rico em fungos na proporção 1:1) e armazenados a -20°C até o momento do uso.

Para os testes de sensibilidade, 200 µL dos fungos foram ressuspensos em 6,8 mL do meio BHI e foram mantidos sob agitação por 24 horas a 37°C em tubos de 15 mL e a densidade óptica foi ajustada para 1,0 a 590 nm, de acordo com a escala McFarland. As leveduras, em fase logarítmica, foram diluídas no mesmo meio de cultura na proporção 1:100. Uma alíquota de 50 µL desta suspensão de levedura a 1:100 (contendo aproximadamente 2×10^3 CFUs) foi incubada por 22 h a 37°C com 50 µL de cada fração cromatográfica resultante do fracionamento da secreção bruta de *H. raniceps* ressuspensa em água Milli Q estéril, em placas de 96 poços de fundo chato. Após a incubação, as amostras foram lidas a 595 nm em uma leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA). Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e água Milli Q estéril ambos incubados com as suspensões das leveduras.

4.5.3. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

Os peptídeos purificados que apresentaram atividade antifúngica ou atividade antibacteriana foram empregados na determinação da sua concentração inibitória mínima (MIC), ou seja, a menor concentração do peptídeo onde nenhum

crescimento celular é detectado por meio de leitura espectrofotométrica. Todos os micro-organismos supracitados foram testados na determinação das concentrações mínimas inibitórias (MICs). Alíquotas de 50 μ L em diluições seriadas de cada peptídeo puro, feitas a partir de uma solução-estoque de 256 μ M esterilizada por filtração em filtro Millex GV 0,22 μ m, foram incubadas com 50 μ L da suspensão de fungos ou bactérias. Após a incubação por um período de 22 h a 37°C, as placas foram lidas a 595 nm em leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6. Ensaios sobre células tumorais

4.6.1. Manutenção da cultura de células

Todos os procedimentos foram realizados com materiais rigorosamente esterilizados e em câmara de fluxo laminar, cuja luz ultravioleta permaneceu ligada de 30 a 40 minutos antes do uso. Alíquotas de células de câncer melanoma murino (B16F10) e fibroblastos murino (NIH3T3) foram removidas de um estoque em nitrogênio líquido e descongeladas a 37°C. Alíquotas de 500 μ L foram lentamente adicionadas em 3 mL de meio de cultura DMEM completo (tamponado com bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico). Esse meio de cultura foi utilizado em todos os outros procedimentos experimentais. Em seguida, as células foram centrifugadas a 750 g por 5 minutos, ressuspensas em 5 mL de meio de cultura DMEM, transferidas para um frasco de cultura de células e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Para assegurar a qualidade das células a serem utilizadas nos experimentos, a cada 48 horas o meio de cultura foi substituído por um meio de cultura novo. A cultura de células foi observada em microscópio de luz invertido e monitorada quanto ao crescimento celular, aspectos morfológicos e presença de contaminantes. Ao atingir o estágio de

confluência (elevada densidade de células em uma determinada área), as células foram removidas do frasco de cultura e recultivadas em uma densidade menor seguindo o procedimento descrito a seguir. O meio de cultura foi descartado e 2 mL de solução de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina contendo 0,53 mM de EDTA) foram adicionados ao frasco de cultura para a remoção da monocamada de células. Após 2 minutos de incubação em estufa a 37°C, a remoção das células foi observada em microscópio de luz invertido. Em seguida, foram acrescentados 2 mL de meio de cultura para inativar a atividade da tripsina. A suspensão de células foi centrifugada a 750 g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em meio de cultura. Aproximadamente 10% das células foram recultivadas em frascos de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O restante foi utilizado em experimentos ou recebeu a adição de hipoclorito de sódio e detergente e, após 24 horas, foram descartados. Após o término dos experimentos, as células de câncer e fibroblastos foram congeladas de acordo com o procedimento descrito a seguir. No estágio de confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura e centrifugadas (como descrito acima). Após o descarte do meio de cultura, as células foram ressuspensas em meio de congelamento (DMEM, 20% soro fetal bovino, 1% de antibiótico, 5% de DMSO). A suspensão celular foi rapidamente transferida para criotubos, os quais foram identificados e envolvidos por uma espessa camada de papel toalha e mantidos a -80°C por 24 horas. Em seguida, os criotubos foram estocados imersos em nitrogênio líquido.

4.6.2. Tratamento das células com os peptídeos de *H. raniceps*

Ao atingir o estágio de confluência, as células de câncer ou fibroblastos normais foram removidas do frasco de cultura e centrifugadas como descrito anteriormente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL

de meio de cultura. Para a determinação do número de células, um volume de 10 µL da suspensão de células foi adicionado a 30 µL de solução de azul tripan (0,4% diluídos em PBS, p/v). Uma alíquota de 8 µL dessa mistura foi depositada gentilmente em uma câmara de Neubauer, onde células presentes nos quatro quadrantes maiores laterais foram contadas em microscópio de luz. O número de células foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\text{Número de células / mL} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de quadrantes contados (=4)}} \times \text{fator de diluição (=4)} \times 10^4$$

As células contadas foram transferidas para placas de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas para a completa adesão das células no fundo da placa. As células foram transferidas para placas de tamanhos diferentes dependendo do experimento a ser realizado. Placas de 96 poços foram utilizadas para ensaios de viabilidade celular por MTT com concentração inicial de 5 x 10³ células/poço. Placas de 12 poços foram utilizadas no restante dos experimentos com concentração inicial de 5 x 10⁴ células/poço. Após o período de incubação na estufa, as placas de cultura foram observadas em microscópio de luz invertido para a avaliação da morfologia, dispersão das células pela placa e presença de contaminação. Essa análise foi realizada para decidir se as células estavam homogeneamente dispersas e saudáveis para serem submetidas aos ensaios com os peptídeos. Os peptídeos foram ressuspensos em ¼ de água e completados com ¾ do meio de cultura e plaqueados por diluição seriada das soluções estoque (256 µM) em meio de cultura, sendo que a concentração final por poço variou de 64 µM (mais concentrada) a 1 µM (menos concentrada) . Os grupos controle (ausência dos peptídeos) continham apenas ¼ de água e ¾ de meio de cultura, seguindo as mesmas proporções que foram adicionadas aos outros grupos experimentais. O meio de cultura das placas foi substituído pelo meio contendo os

peptídeos. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação, as células foram preparadas de maneira adequada para a realização dos testes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6.3. Viabilidade Celular (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada de acordo com o método MTT descrito por (Mosmann, 1983).

As células cancerosas (B16F10) e fibroblastos normais (NIH3T3) foram cultivadas e tratadas com os peptídeos de *H. raniceps* em placas de 96 poços como descrito no item acima. Após o período de incubação, o meio de cultura das placas foi removido e 150 µL de solução de uso de MTT (15 µL de MTT 5 mg/mL diluídos em 135 µL de DMEM completo) foram adicionados em cada poço. As células foram incubadas por 3 horas em estufa a 37° C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi removido e 200 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver o formazan formado. A quantificação do formazan foi feita pela medida da absorvância dos poços no comprimento de onda de 595 nm em uma leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA).

A viabilidade celular foi determinada pela média da triplicata de cada concentração testada. A concentração inibitória 50% (IC₅₀) representa a concentração em que a viabilidade celular foi reduzida em 50% e foi calculada utilizando-se o software *GraphPad Prism 5*.

4.6.4. Avaliação da integridade de membrana e proliferação celular

A integridade da membrana plasmática foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan. Em células viáveis, esse corante penetra pela membrana plasmática, mas é rapidamente externalizado. Já em células que apresentam a

membrana plasmática comprometida, o azul de tripan não sai da célula, a qual permanece corada de azul.

Após tratamento com 8,3 μM do peptídeo Hr22 ou 7,3 μM do peptídeo Hr24, as células B16F10 foram ressuspensas em 100 μL de meio de cultura (ver item 4.7.2). Uma alíquota de 10 μL dessa suspensão foi adicionada a 30 μL de solução de azul tripan, sendo que 8 μL dessa mistura foram lentamente depositados em câmara de Neubauer. As células foram contadas diferencialmente, sendo que células brancas foram consideradas com a membrana plasmática íntegra e células coradas de azul com a membrana plasmática danificada. Em seguida, a proporção de células coradas em azul em relação ao número total de células foi determinada.

A significância das proporções das médias das triplicatas foi analisada por Anova. Foi considerado estatisticamente significativo $P < 0,05$.

4.6.5. Efeitos apoptóticos

Durante o processo de apoptose, o fosfolípídeo fosfatidilserina é translocado para a camada externa da membrana funcionando assim como sinalizador para a fagocitose. A Anexina V é uma proteína utilizada para identificar as células em fase inicial de apoptose por possuir uma alta afinidade à fosfatidilserina. Nas análises por citometria de fluxo, a Anexina está associada a um fluorocromo tipo FITC e é usada simultaneamente com o Iodeto de Propídio (PI). Somente as células mortas ou com membrana danificada são permeáveis ao PI, que é um indicador de apoptose tardia e/ou de morte celular por necrose (BD Pharmingen).

O *pellet* das células de melanoma murinho (B16F10) tratadas foi ressuspendido em 500 μL de PBS gelado e centrifugado a 3083 g, por 5 minutos a 4°C. Após descartar o sobrenadante, 100 μL de tampão de ligação (0,1 M de HEPES pH 7.4, 1,4 M de NaCl e 25 mM de CaCl_2) foi adicionado ao *pellet*. Em seguida, 5 μL

de solução de Anexina V (BD, EUA) e 10 μ L de solução de PI (50 μ g/mL) foram acrescentados em cada microtubo. A mistura foi deixada por 15 minutos protegida da luz a temperatura ambiente. Logo em seguida, 300 μ L de tampão de ligação foram acrescentados. As amostras foram colocadas em gelo e analisadas no citômetro de fluxo BD FACSVerse™ (BD, EUA) .

4.6.6. Potencial de membrana mitocondrial

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi determinada pela adição de Rodamina 123 (Probes – Thermo Fisher, EUA). A Rodamina 123 é um composto catiônico de fluorescência verde que se associa às membranas das mitocôndrias de acordo com a sua polarização (Baracca *et al.*, 2003). A solução estoque de rodamina 123 foi preparada em etanol na concentração de 5 mg/mL. O volume de 300 μ L de rodamina 123 (5 μ g/mL) em PBS foi adicionado ao pellet das células de melanoma murinho (B16F10) tratadas e incubado por 15 minutos protegido da luz a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 3083 g, por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e 300 μ L de PBS foram acrescentados. Este processo de lavagem foi realizado duas vezes para retirar o excesso de rodamina 123. Em seguida as amostras foram colocadas em gelo e analisadas por citometria de fluxo.

4.6.7. Fragmentação de DNA e ciclo celular

A avaliação de fragmentação de DNA e ciclo celular das células tratadas foi determinada com a adição de iodeto de propídio (PI). Baseia-se no princípio de que as células apoptóticas, entre outras características típicas, são caracterizadas pela fragmentação do DNA e, conseqüentemente, a perda de conteúdo de DNA nuclear. O PI é capaz de se ligar e marcar o DNA, fazendo com que seja possível obter uma rápida e precisa avaliação do conteúdo de DNA celular por análise de citometria de

fluxo (Riccardi e Nicoletti, 2006). O *pellet* de células de melanoma murinho (B16F10) tratadas foi ressuspendido em 1 mL de etanol 70% gelado e armazenado a -20°C por, pelo menos, 24 horas ou até o dia da análise. No dia da análise, cada microtubo foi centrifugado a 3083 g, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas novamente. Após descartar o sobrenadante, 100 µL de PBS 1x contendo RNase (50 µM) foram adicionados ao *pellet*. As amostras foram incubadas na estufa a 37°C por 30 minutos protegidos da luz. Em seguida, 100 µL de PI (20 µg/mL) (Probes – Thermo Fisher, EUA) preparado em PBS foram adicionados à temperatura ambiente por 30 minutos protegidos da luz. Após esse procedimento, as células foram analisadas por citometria de fluxo.

4.7. Ensaio hemolítico

O ensaio hemolítico utilizado foi modificado do protocolo descrito por Onuma *et al.* (1999). Eritrócitos de sangue humano A⁻, obtidos de um doador sadio, foram separados do plasma por sedimentação e lavados três vezes com tampão NaCl 150 mM contendo Tris-HCl 10 mM pH 7,4. Utilizou-se o mesmo tampão para solubilizar as amostras e preparar uma solução 1% (v/v) de hemácias. As amostras ressuspendidas em 100 µL de tampão foram incubadas por 60 min à temperatura ambiente com 100 µL da suspensão de eritrócitos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 729 g por 2 min. Uma alíquota de 80 µL de cada sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços de fundo chato (TPP, Suíça) e a leitura da absorvância realizada a 405 nm (Multiskan FC, Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). Para as amostras de referência utilizou-se 100 µL da suspensão de eritrócitos 1% (v/v) incubado com 100 µL de Triton X-100 1% (v/v) como referência de 100% de lise e 100 µL da suspensão de eritrócitos 1% (v/v) no mesmo tampão supracitado como referência de 0% de hemólise.

4.7.1. Determinação da HC₅₀

Para a determinação da concentração capaz de promover 50% de hemólise (HC₅₀), os peptídeos de *H. raniceps* foram diluídos serialmente a partir de uma solução estoque de 256 µM e incubados com a solução de eritrócitos como descrito anteriormente. O ensaio foi realizado em triplicata. O valor de HC₅₀ foi obtido após ajuste por regressão logarítmica.

4.8. Bioinformática

O algoritmo *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990) foi utilizado para buscas de similaridade nos bancos de dados; o *Expasy pI/Mw tool* (http://web.expasy.org/compute_pi/) (Bjellqvist *et al.*, 1993) foi utilizado para o cálculo da massa teórica monoisotópica dos peptídeos; o *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers *et al.*, 2011) foi usado para o alinhamento de múltiplas seqüências; o software *Heliquest* (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParamsV2.py>) (Gautier *et al.*, 2008) foi usado para determinar a carga líquida dos peptídeos.

4.9. Análise estatística

As diferenças estatísticas entre o controle e as células tratadas com os peptídeos foram avaliadas através do teste Anova fator único, com nível de significância de $P < 0,05$ e teste de Tukey como pós-teste utilizando o programa software *GraphPad Prism 5.03* (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Todos os valores foram expressos como médias \pm DP (desvio padrão). Os valores significativamente diferentes do controle ($P < 0,05$) estão indicados nas figuras com asteriscos e a diferença entre os peptídeos estão identificadas com o *octothorpe* (#). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5. RESULTADOS

5.1. Fracionamento cromatográfico da secreção bruta e análises por espectrometria de massas

Alíquotas de 2,0 mg da secreção bruta de *H. raniceps* foram fracionadas em coluna C₈ por RP-HPLC a um fluxo de 1 mL/min, obtendo-se o perfil cromatográfico abaixo (Figura 7). Cada corrida cromatográfica resultou, em média, em 25 frações que foram coletadas manualmente.

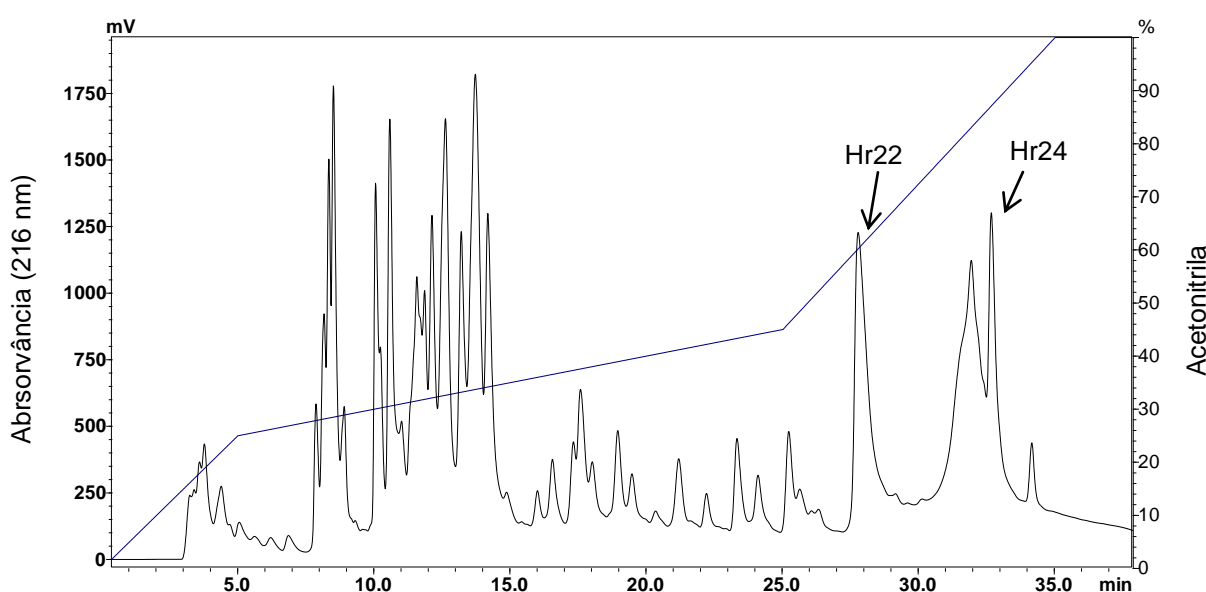


Figura 7. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *Hybsiboas raniceps* em uma coluna C₈ (Vydac 208TP54) em sistema HPLC com um fluxo de 1 mL/min e monitoramento realizado a 216 nm. As frações que apresentaram atividade biológica (antibacteriana e antiproliferativa) nos *screenings* realizados estão identificadas.

Após os *screenings*, duas frações ativas denominadas Hr22 e Hr 24 foram acumuladas e recromatografadas por RP-HPLC (Figura 8 e Figura 9, respectivamente) e submetidas à análise por espectrometria do tipo MALDI-TOF/MS e os espectros foram obtidos plaqueando-se as amostras com HCCA 20 µg/µL e analisadas na faixa de 1.500 a 4.000 Da no modo refletido positivo. Dois peptídeos foram observados, um com massa monoisotópica protonada ($M+H^+$) de 3006,41 Da resultante da fração Hr22 (Figura 10) e outro com massa de 1914,78 Da resultante

da fração Hr24 (Figura 11).

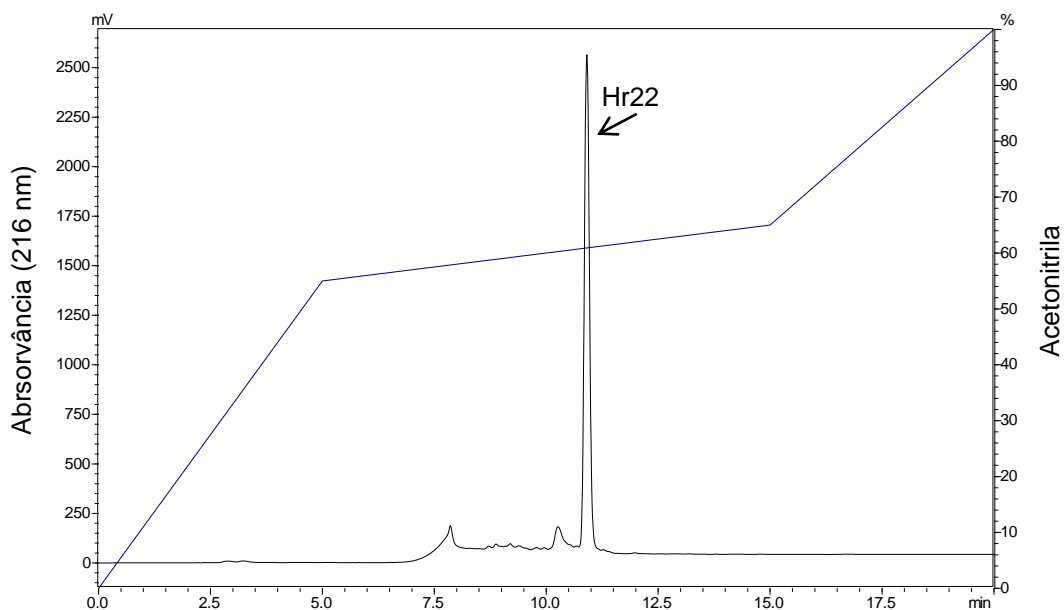


Figura 8. Recromatografia da fração Hr22 de *H. raniceps* em uma coluna Vydac C₈ (Vydac 208TP54) a um fluxo de 1 mL/min. A coluna foi previamente equilibrada com solvente A e a eluição foi realizada empregando-se o gradiente: de 0 a 55% de solvente B em 5 minutos, de 55 a 65% de solvente B em 10 min, de 65 a 100% do solvente B em 5 min. A absorvância foi monitorada a 216 nm.

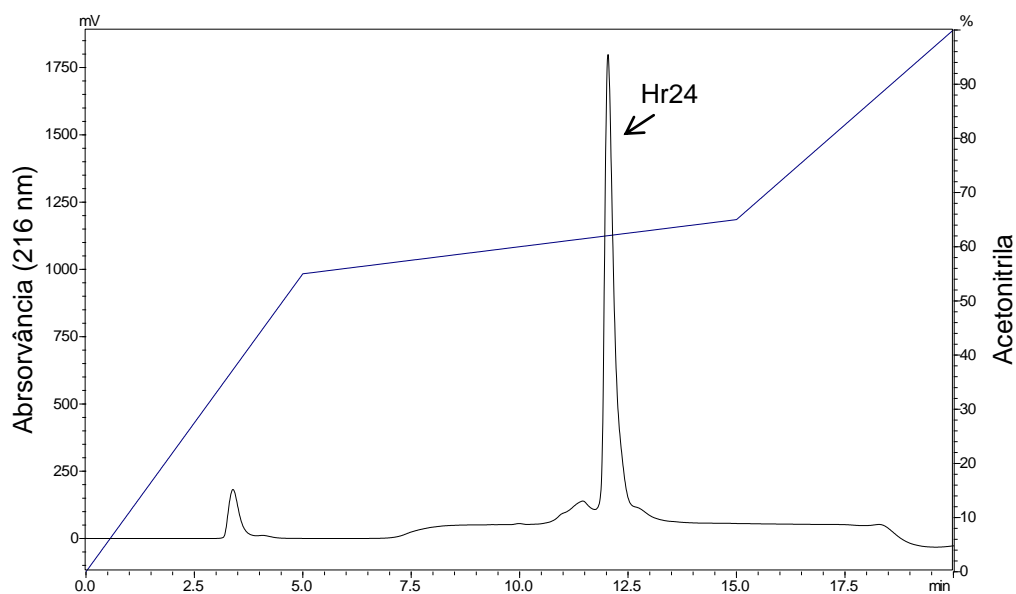


Figura 9. Recromatografia da fração Hr24 de *H. raniceps* em uma coluna Vydac C₈ (Vydac 208TP54). A coluna foi previamente equilibrada com solvente A e a eluição foi realizada empregando-se o gradiente: de 0 a 55% de solvente B em 5 minutos, de 55 a 65% de solvente B em 10 min, de 65 a 100% do solvente B em 5 min. A absorvância foi monitorada a 216 nm.

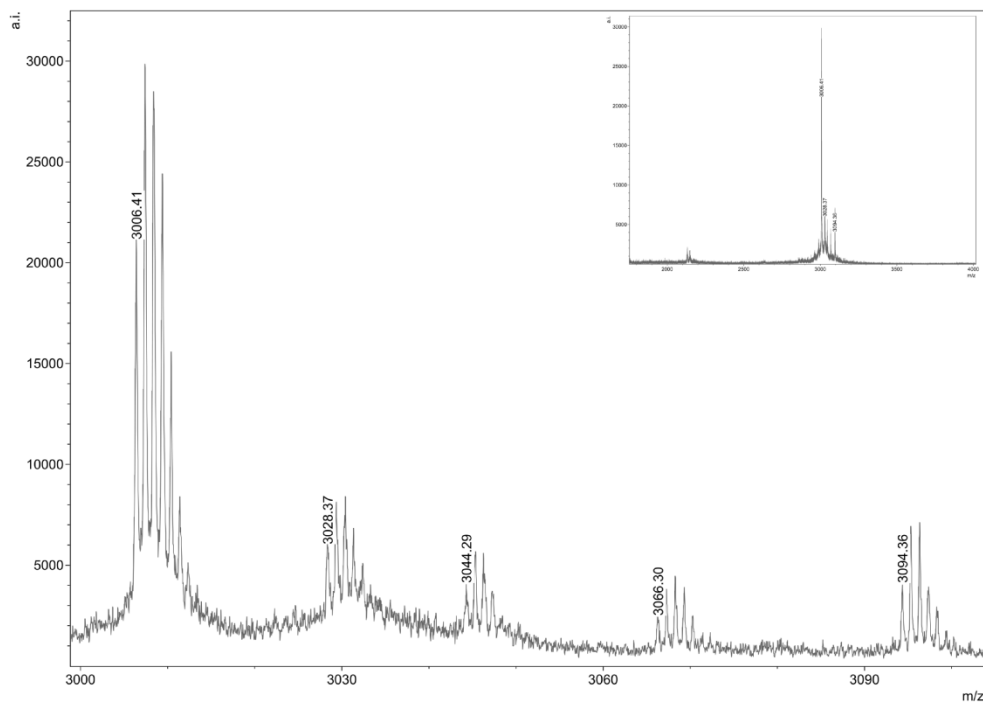


Figura 10. Espectro de massa monoisotópica ($M+H^+$) da fração Hr22 com 3006,41 Da. As massas moleculares 3028,37 e 3044,29 Da são adutos de sódio e potássio, respectivamente. Os espectros foram obtidos plaquenado as amostras com matriz HCCA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e analisadas no modo refletido positivo.

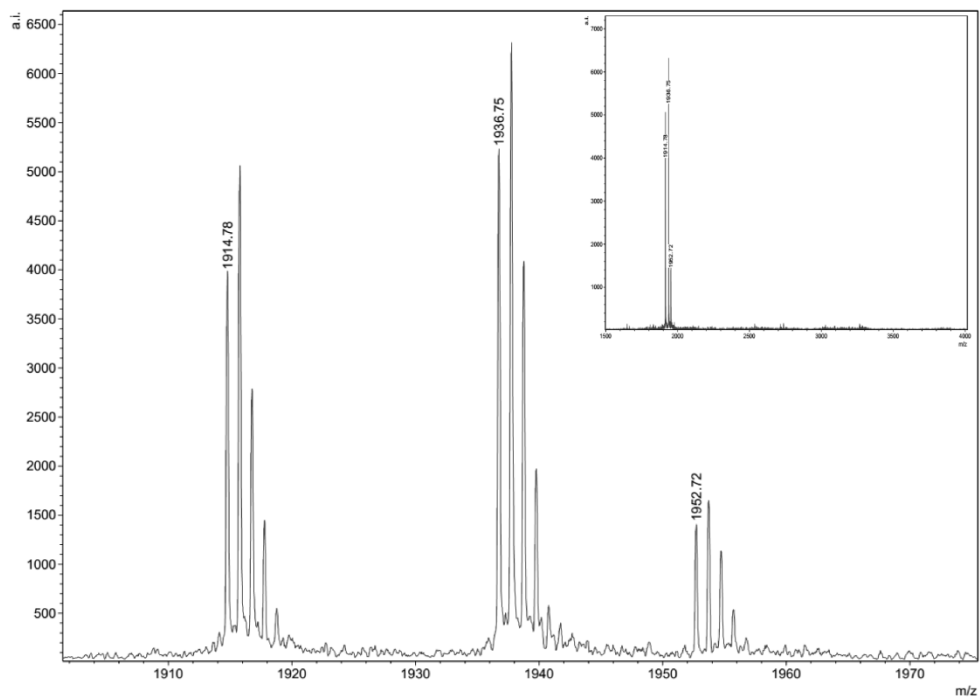


Figura 11. Espectro de massa monoisotópica ($M+H^+$) da fração Hr24 com 1914,78 Da. As massas moleculares 1936,75 e 1952,72 Da são adutos de sódio e potássio, respectivamente. Os espectros foram obtidos plaquenado as amostras com matriz HCCA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e analisadas no modo refletido positivo.

A estrutura primária dos peptídeos Hr22 e Hr24 foram determinadas por sequenciamento *de novo* após a fragmentação em equipamento LC-MS/MS Orbitrap Elite por infusão direta e analisadas pelo software Peaks Studio 7.5.

O peptídeo Hr22 foi observado apresentando-se triplamente carregado (+3) e uma provável sequência primária contendo 27 resíduos de aminoácidos $^1\text{KLLFLQLGHALAKTVLPMVTNAFKPKK}^{27}$ (Figura 12) foi obtida e o peptídeo Hr24 foi observado duplamente carregado (+2), resultando em uma provável sequência de 17 resíduos de aminoácidos $^1\text{FNGTLLPLAVVKKKLFK}^{17}$ (Figura 13). Apesar de usados os três modos de fragmentação (CID, ETD e HCD), as fragmentações obtidas por CID foram as obtiveram uma maior similaridade com os peptídeos descritos na literatura.

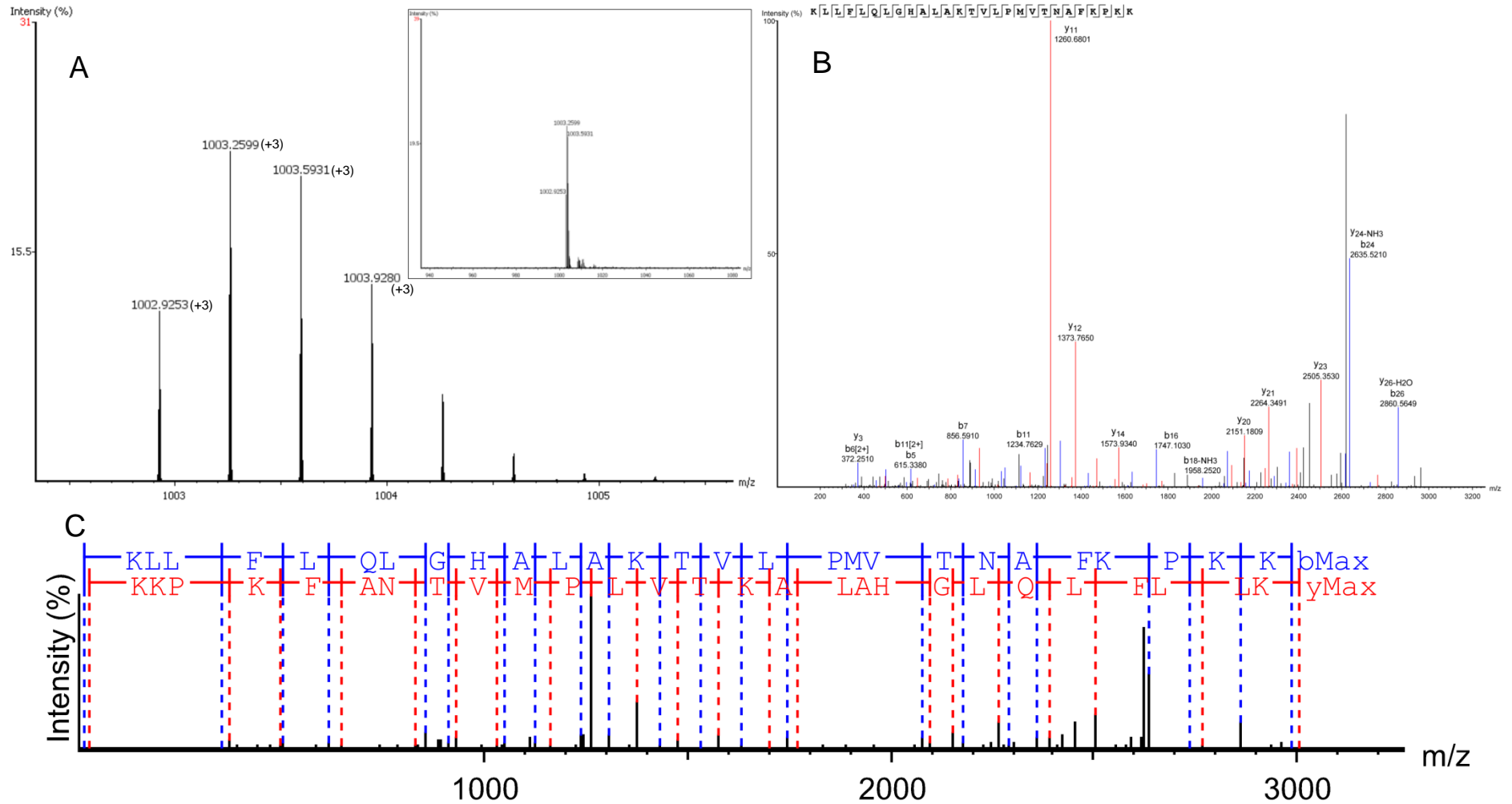


Figura 12. A) Espectro MS do peptídeo Hr22 obtido no Orbitrap Elite que foi fragmentado para obtenção da sequência mostrando 3 cargas e sua respectiva distribuição isotópica. B) Íons das séries b e y obtidos por fragmentação do tipo CID, e C) estrutura primária resultante do sequenciamento *de novo* do peptídeo Hr 22: KLLFLQLGHALAKTVLPMVTNAFKPKK. Tabela de íons e mapa de erro no Anexo 1.

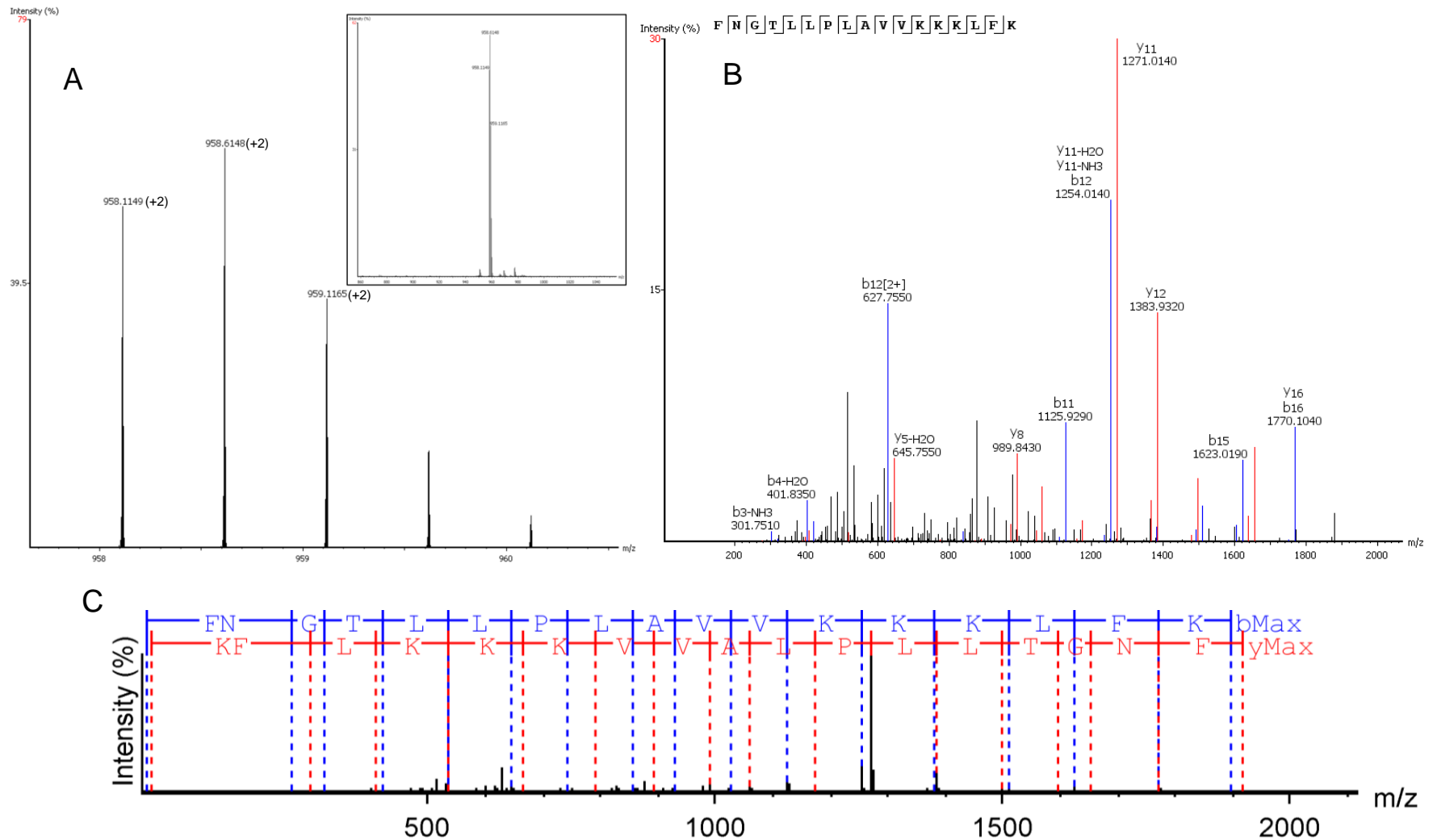


Figura 13. A) Espectro MS/MS do peptídeo Hr24 obtido no Orbitrap Elite que foi fragmentado para obtenção da sequência mostrando 2 cargas e sua respectiva distribuição isotópica. B) Íons das séries b e y obtidos por fragmentação do tipo CID. C) Estrutura primária resultante do sequenciamento de novo do peptídeo Hr24: FNGTLLPLAVVKKKLFK. Tabela de íons e mapa de erro no Anexo 2.

O peptídeo Hr22 possui uma alta similaridade com um peptídeo figainina 4 predito por Barbosa (2010), a partir de cDNA de *H. raniceps* (Figura 14), já o peptídeo Hr24 possui uma similaridade em torno de 40% com o peptídeo citolítico hilina a1 descrito por Castro *et al.* (2009), isolado da espécie *H. albopunctatus* (Figura 15).

```

Hr22                -KLLFLQLGHALAKTVLPMVTNAFKPKK
Figainina-4         FLGAILKIGHALAKTVLPMVTNAFKPKQ
                    : * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * :

```

Figura 14. Alinhamento do peptídeo Hr22 com o peptídeo predito figainina-4.

```

Hr24                FNGTLLPLAVVKKKL-FK
Hilina-a1           IFGAILPLALGALKNLIK
                    : * : : * * * * :      *      : *

```

Figura 15. Alinhamento do peptídeo Hr24 com o peptídeo hilina a1

5.2. Determinação de MIC, HC₅₀ e IC₅₀.

Os peptídeos Hr22 e Hr24 foram testados contra 6 espécies bacterianas e contra 2 espécies de fungos, além de eritrócitos humanos. O peptídeo Hr22 foi bastante efetivo na inibição do crescimento das bactérias Gram-positivas com um MIC de 4 µM e entre 4 e 8 µM para as bactérias Gram-negativas. O peptídeo Hr24 também foi mais efetivo contra as bactérias Gram-positivas, com seus MICs variando entre 4 e 16 µM e não foi observada inibição de 100% para o crescimento das bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae* (Tabela 2) na presença desse peptídeo.

Ambos os peptídeos não apresentaram inibição total para o crescimento de *C. albicans* e *C. parapsilosis* na dose máxima testada de 128 µM. Quanto à

capacidade de lizar eritrócitos humanos, o peptídeo Hr22 apresentou um HC_{50} de 38,6 μM e o peptídeo Hr24 de 18,9 μM (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antimicrobiana (MIC) e hemolítica (HC_{50}) dos peptídeos Hr22 e Hr24 isolados da secreção cutânea de *H. raniceps*.

	Peptídeos (μM)	
	Hr22	Hr24
<i>E. coli</i>	8	sa
<i>P. aeruginosa</i>	8	16
<i>K. pneumoniae</i>	4	sa
<i>S. aureus</i>	4	4
<i>E. faecalis</i>	4	16
<i>S. epidermidis</i>	4	4
<i>C. albicans</i>	sa	sa
<i>C. parapsilosis</i>	sa	sa
Eritrócitos	38,6	18,9

sa - sem atividade na concentração máxima testada de 128 μM .

Os dois peptídeos mostraram-se bastante citotóxicos, reduzindo a viabilidade em doses baixas tanto para células tumorais quanto para células normais, sendo que o peptídeo Hr22 inibiu a proliferação tanto das células cancerosas quanto das células normais em doses muito próximas (Figura 16-A), já peptídeo Hr24 mostrou uma tendência à seletividade para as células tumorais, apresentando um IC_{50} quase metade do valor determinado para a linhagem de células normais, como pode ser observado na figura 16-B.

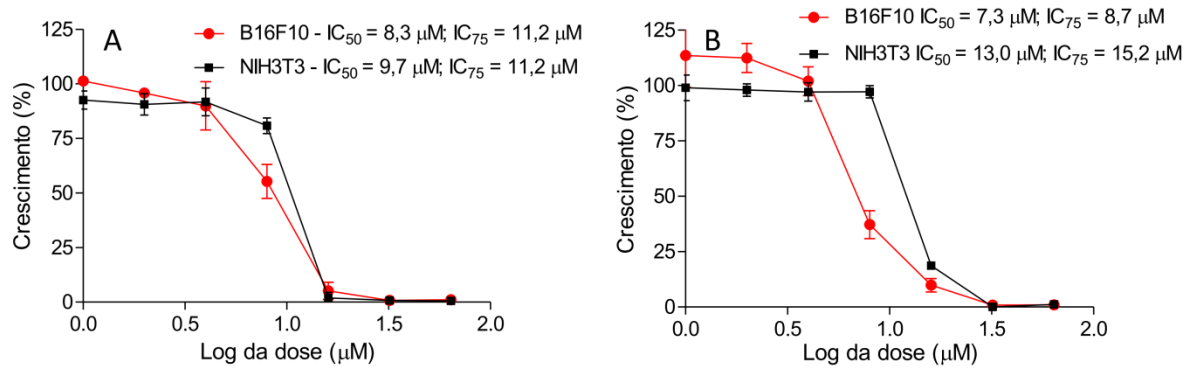


Figura 16. Porcentagem de células viáveis pelo ensaio de MTT nas concentrações de 1 a 64 μM após incubação por 24 horas do peptídeo Hr22 (A) e do peptídeo Hr24 (B) sobre as linhagens celulares de câncer de pele murino (B16F10) e fibroblasto normal murino (NIH3T3) e suas respectivas concentrações inibitórias 50 (IC_{50}) e 75% (IC_{75}).

5.3. Efeitos citotóxicos e citostáticos

A integridade da membrana plasmática foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan. Quando as células foram tratadas com o IC_{50} , o peptídeo Hr22 não afetou significativamente a proliferação celular quando comparado com o controle, já o peptídeo Hr24 foi capaz de inibir significativamente ($P = 0,0339$) o número de células quando comparado com o controle (Figura 17-A). Observou-se também a relação membrana intacta e membrana danificada, porém não houve diferença significativa entre o tratamento com os peptídeos e o controle (Figura 17-B).

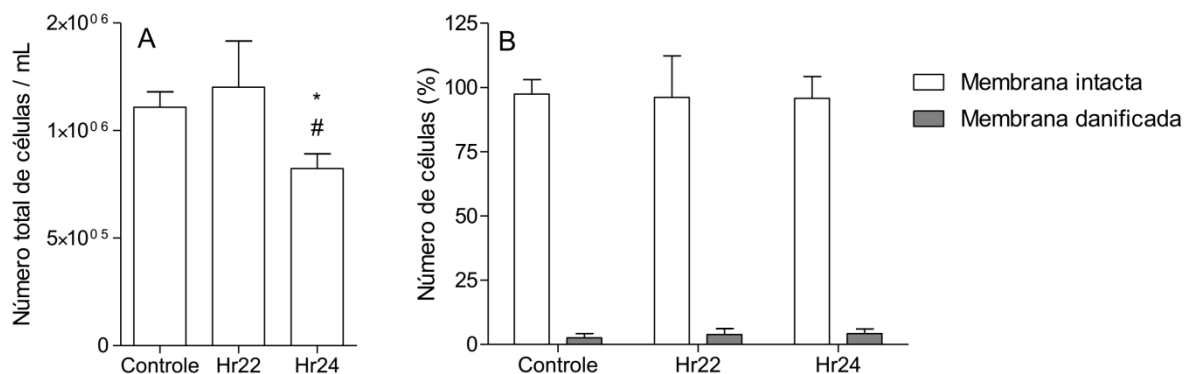


Figura 17. Contagem de células B16F10 tratadas com água (controle) e após o tratamento com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC_{50} . **A)** Número total de células observadas por microscopia de luz pela exclusão do azul de tripan e **B)** Percentual de células com membrana intacta ou danificada. Os resultados estão expressos pela média e seu respectivo desvio

padrão. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: * $P < 0,05$; # $P < 0,05$ em relação ao peptídeo Hr22.

Quando as células foram tratadas com o IC_{75} , o peptídeo Hr22 reduziu significativamente o número de células ($P = 0,0053$) tanto em relação ao controle, quanto em relação ao Hr24 (Figura 18-A). O Hr24, por sua vez, não influenciou no número final de células nem foi danoso para a membrana plasmática, o que pode indicar algum erro possivelmente no processo de pesagem deste peptídeo. O peptídeo Hr22 afetou significativamente a membrana plasmática (Figura 18-B) tanto em relação ao controle quanto ao peptídeo Hr24.

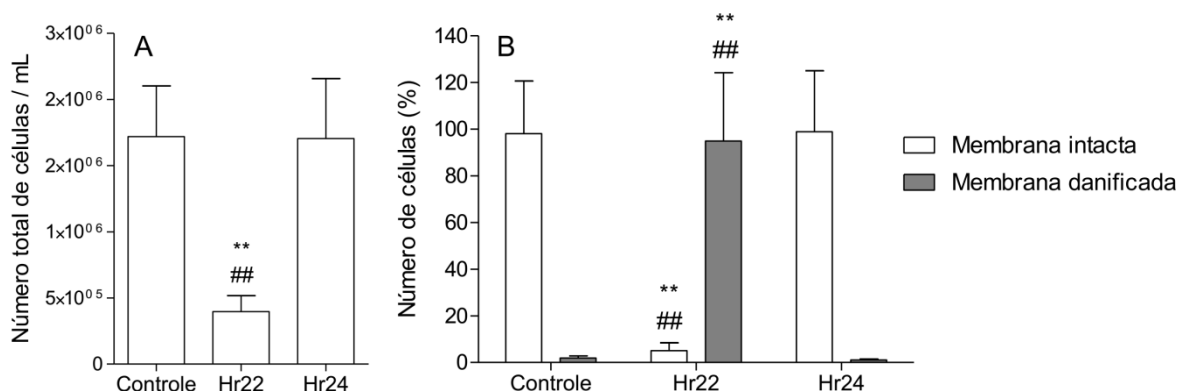


Figura 18. Contagem de células B16F10 tratadas com água (controle) e após o tratamento com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC_{75} . **A)** Número total de células observadas por microscopia de luz pela exclusão do azul de tripan e **B)** Percentual de células com membrana intacta ou danificada. Os resultados estão expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: ** $P < 0,01$; ## $P < 0,01$ em relação ao peptídeo Hr24.

A morfologia celular foi avaliada por citometria de fluxo quanto à granulosidade (SSC-H) e também quanto ao tamanho celular (FSC-H) e não houve diferença estatisticamente significativa entre as células do controle (**A**) e as células tratadas com o peptídeo Hr22 (**B**) ou com o peptídeo Hr24 (**C**) quando foram tratadas com o IC_{50} , como pode ser observado na figura abaixo.

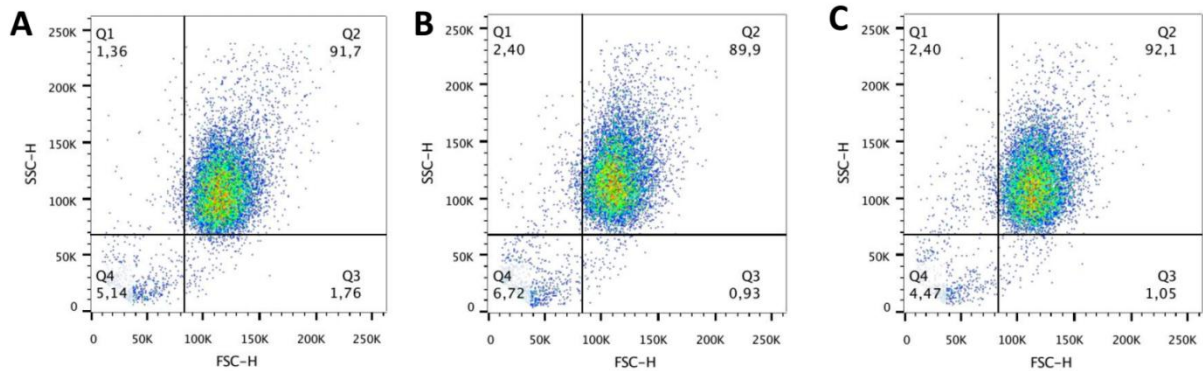


Figura 19. Avaliação da morfologia celular quanto à granulosidade (SSC-H) e ao tamanho (FSC-H) das células B16F10 do controle **(A)**, tratadas com o peptídeo Hr22 na concentração correspondente ao IC_{50} . **(B)** e tratadas com o peptídeo Hr24 na concentração correspondente ao IC_{50} **(C)**. Não houve diferença significativa das células tratadas com os peptídeos em relação ao controle.

Quando foram tratadas com a concentração correspondente ao IC_{75} , o peptídeo Hr22 alterou acentuadamente a morfologia das células, como pode ser observado na figura 20-**B**, já o peptídeo Hr24 não provocou nenhuma alteração significativa nas células, como foi dito anteriormente, isto pode ter ocorrido devido a algum erro durante a pesagem.

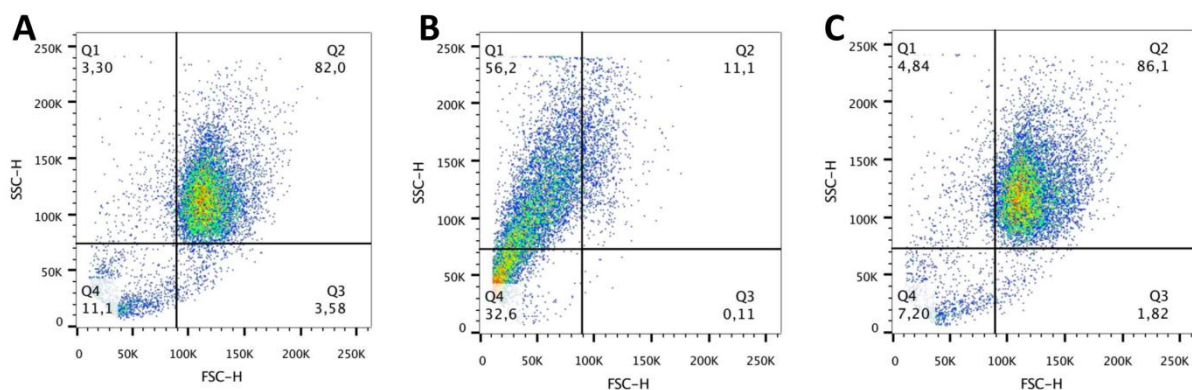


Figura 20. Avaliação da morfologia celular quanto à granulosidade (SSC-H) e ao tamanho (FSC-H) das células B16F10 do controle **(A)**, tratadas com o peptídeo Hr22 na concentração correspondente ao IC_{75} . **(B)** e tratadas com o peptídeo Hr24 na concentração correspondente ao IC_{75} **(C)**.

Com intuito de avaliar um possível mecanismo de ação dos peptídeos Hr22 e Hr24 sobre as células de melanoma murino, as células foram marcadas com anexina V-FITC (como indicativo de apoptose) e iodeto de propídio (PI) (como indicativo de necrose). Como controle positivo (Figura 21-**A**) para dano celular tanto para apoptose quanto para necrose, as células foram tratadas com peróxido de hidrogênio. Quando definido para a marcação com anexina V-FITC, no primeiro gráfico, as células ocupam majoritariamente o quadrante 3 (Q3), quando observado apenas a marcação com PI (segundo gráfico), as células ocupam majoritariamente o quadrante 1 (Q1) e quando observado os dois marcadores (anexina V-FITC e PI), as células ocupam o quadrantes 2 (Q2). Na Figura 21-**B**, no gráfico controle, é possível observar que as células ocupam predominantemente o primeiro quadrante (Q1), no segundo gráfico mostra as células que foram tratadas com o peptídeo Hr22 na concentração correspondente ao IC_{50} e no terceiro gráfico as células que foram tratadas com o peptídeo Hr24 na concentração correspondente ao IC_{50} , sendo possível visualizar um espalhamento considerável das células (Hr24 - Q3) quando comparado ao controle.

Quando tratadas com o peptídeo Hr22 na concentração correspondente ao IC_{75} , a maioria das células foram marcadas com anexina e PI (Figura 21-**C**, Hr22 - Q2) e apenas anexina (Q3), indicando que o peptídeo provocou sérios danos às células, induzindo tanto apoptose, apoptose tardia e necrose. As células tratadas com o peptídeo Hr24 não tiveram alterações devido, possivelmente, a pesagem deste peptídeo.

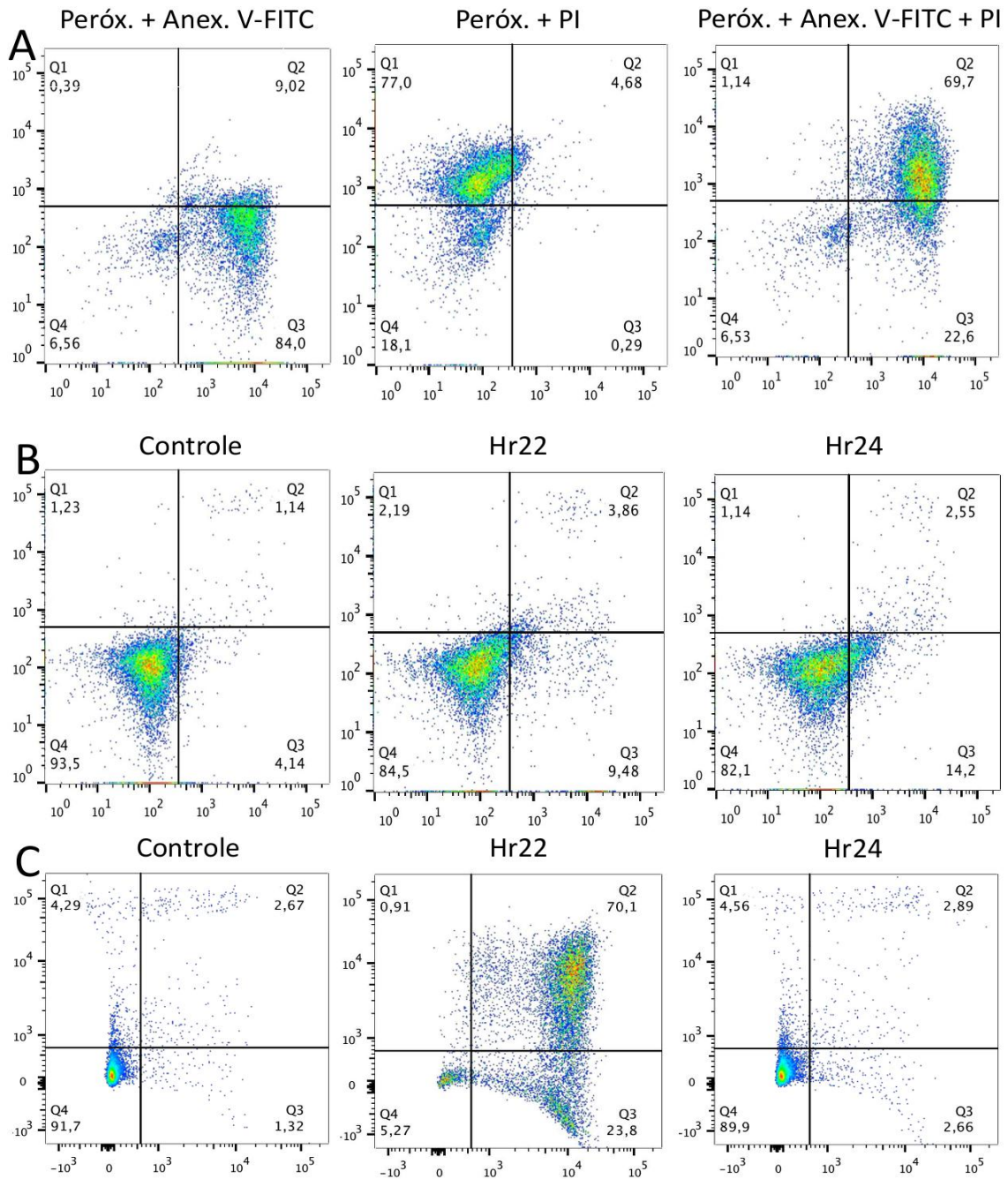


Figura 21. Efeito dos peptídeos Hr22 e Hr24 sobre as células utilizando os marcadores anexina V-FITC (apoptose) e iodeto de propídio (necrose). **(A)** Controle positivo para dano celular com peróxido de hidrogênio (Peróx.) marcado com anexina (Anex. V-FITC) no primeiro gráfico, com iodeto de propídio (PI) no segundo e anexina e iodeto de propídio no terceiro. **(B)** Controle negativo pra dano celular no primeiro gráfico (controle), no segundo as células foram tratadas com o peptídeo Hr22 na concentração correspondente ao IC_{50} e no terceiro com o peptídeo Hr24 na concentração correspondente ao IC_{50} . **(C)** As células foram tratadas com os peptídeos na concentração correspondente ao IC_{75} . No caso do tratamento com o peptídeo Hr22 é possível observar que a maioria das células foi marcada com anexina V-FITC + PI (quadrante 2). Já no caso do peptídeo Hr24 não foram observados efeitos deletérios sobre as células.

Quando foram avaliados os efeitos da dose IC_{50} dos peptídeos Hr22 e Hr24 nas células em reação ao controle marcado apenas com iodeto de propídio (PI) (Q1) não houve diferença estatisticamente significativa ($P= 0,0574$). Já no quadrante 2 (Q2), que indica a marcação com anexina V-FITC (A) e PI, houve uma diferença significativa no número de células que foram marcadas quando tratadas com o peptídeo Hr22 ($P= 0,0134$) em relação ao controle. No quadrante 3 (Q3), marcado apenas com anexina V-FITC (A), houve diferença significativa ($P= 0,0005$) tanto para o peptídeo Hr22, onde $9,1 \pm 0,58\%$ das células foram marcadas, quanto para o peptídeo Hr24 com $14,1 \pm 2,45\%$ das células marcadas em relação ao controle $2,1 \pm 1,77\%$. No quadrante 4 (Q4), que mostra o percentual de células que não foram marcadas por anexina V-FITC (A) e PI, houve uma redução significativa ($P= 0,0007$) de células não marcadas tanto para o peptídeo Hr22 ($86 \pm 1,70\%$), quanto para o peptídeo Hr24 ($81,8 \pm 3,05\%$) em relação ao controle ($95,8 \pm 2,05\%$) (Figura 22).

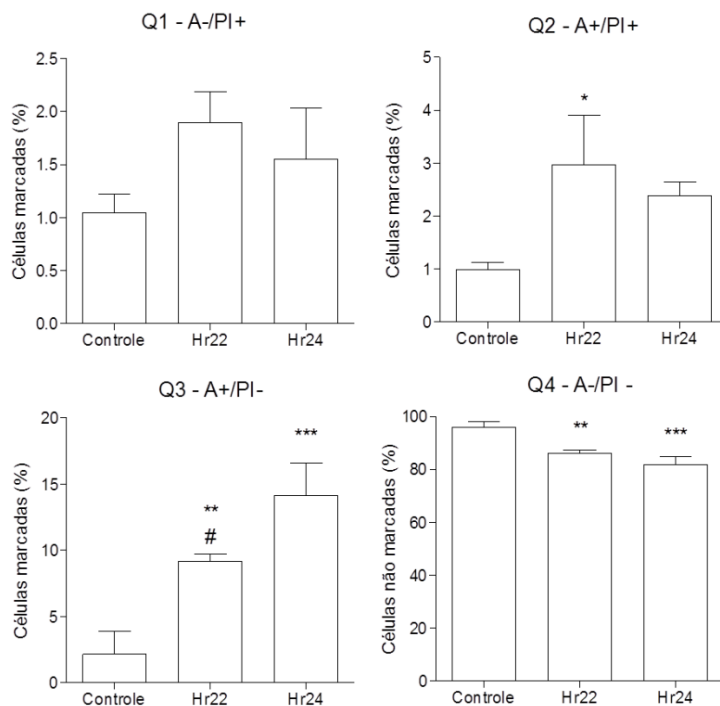


Figura 22. Comparação entre os efeitos dos tratamentos com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC_{50} e o controle nos quatro quadrantes (Q) analisados. Marcação de iodeto de propídio (PI) (Q1); duplamente marcadas com anexina V-FITC (A) e PI (Q2); marcadas apenas com A (Q3) e não marcadas (Q4). Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; # $P<0,05$ em relação ao peptídeo Hr24.

Quando as células foram tratadas com os peptídeos na concentração correspondente ao IC_{75} , houve uma redução significativa ($P= 0,0006$) no número de

células marcadas com PI no quadrante 2 (Q2) para o peptídeo Hr22 em relação ao controle e ao Hr24. No quadrante 2 (Q2), a maioria das células tratadas com peptídeo Hr22 ($66 \pm 3,9\%$) foram marcadas com anexina e PI, apresentando significância em relação ao controle e ao peptídeo Hr24 ($P = <0,0001$), indicando possivelmente diferentes estágios de apoptose das células. Quando observadas apenas para o fluoróforo anexina (Q3) mais uma vez houve uma significativa marcação ($25 \pm 1,12\%$, $P = <0,0001$) das células tratadas com o peptídeo Hr22 em relação ao controle e ao peptídeo Hr24. No quadrante quatro (Q4), que apresenta o percentual de células que não foram marcadas por anexina e PI, mais uma vez, devido ao grande dano causado pelo peptídeo Hr22, poucas células não foram marcadas ($7,9 \pm 3,07\%$, $P = <0,0001$) quando comparado ao controle e ao peptídeo Hr24, como pode ser observado na figura a seguir.

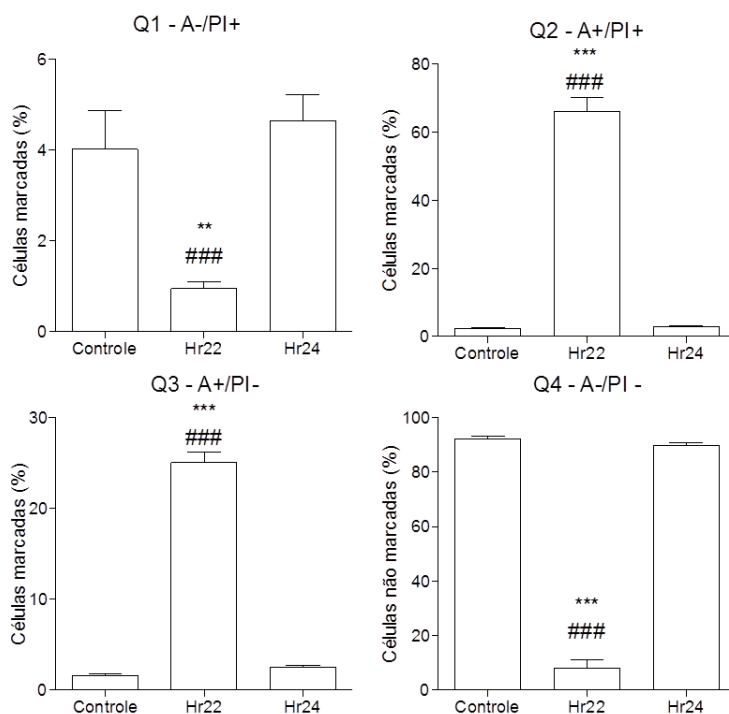


Figura 23. Comparação entre os efeitos dos tratamentos com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC_{75} e o controle nos quatro quadrantes (Q) analisados. Marcação de Iodeto de propídio (PI) (Q1); duplamente marcadas com anexina V-FITC (A) e PI (Q2); marcadas apenas com A (Q3) e não marcadas (Q4). Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ### $P < 0,001$ em relação ao peptídeo Hr24.

A energização mitocondrial induz a diminuição de fluorescência da rodamina 123 e a taxa de diminuição de fluorescência é proporcional ao potencial da

membrana mitocondrial (Baracca *et al.*, 2003). Tendo como referência o controle, a membrana mitocondrial foi classificada como despolarizada, normal ou hiperpolarizada após ser submetida ao tratamento com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC_{50} , de acordo com a figura abaixo.

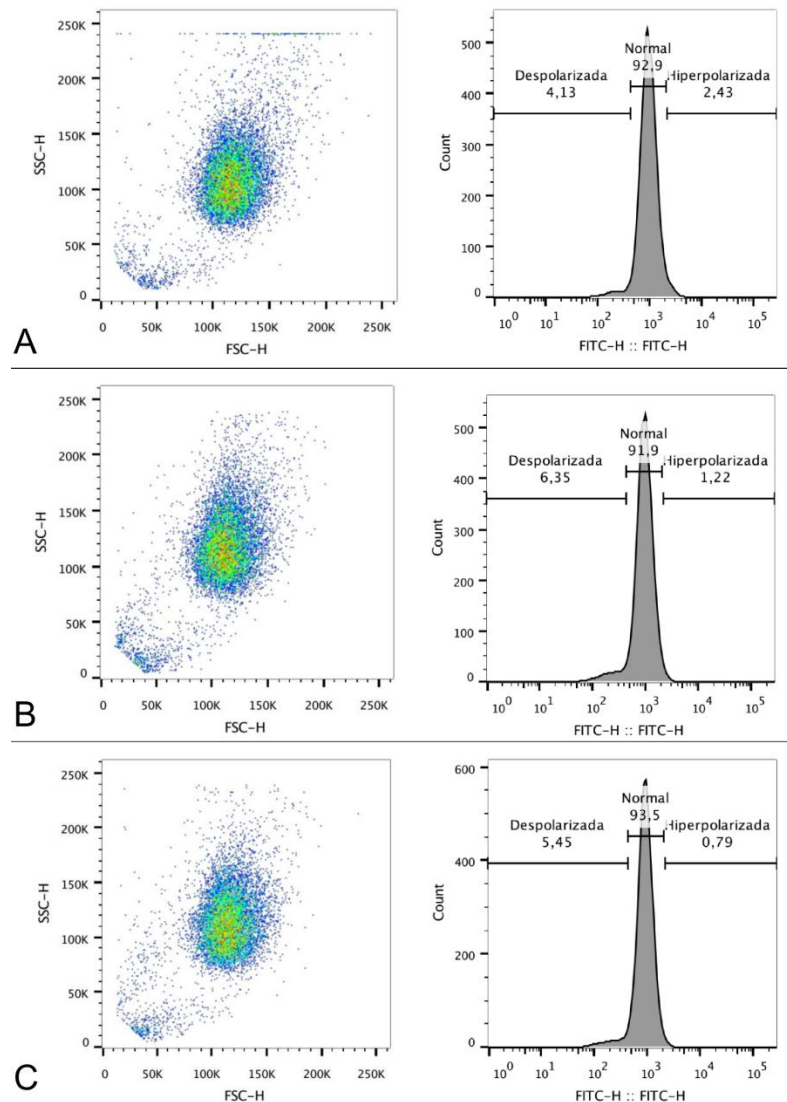


Figura 24. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial classificada como despolarizada, normal e hiperpolarizada. **(A)** Controle, **(B)** células B16F10 tratadas com o peptídeo Hr22 na concentração correspondente ao IC_{50} e **(C)** células tratadas com o peptídeo Hr24 na concentração correspondente ao IC_{50} .

Usando o critério mencionado na figura 21, quando analisado estatisticamente, observou-se que o peptídeo Hr22 apresentou um número

significativamente maior de células na condição de despolarizadas ($7,1 \pm 0,97\%$ e $P = 0,0158$) quando comparado ao controle ($4,4 \pm 0,49\%$). Para as células com potencial de membrana normal não houve diferença significativa no percentual de células tratadas com os peptídeos Hr22 e Hr24 em relação ao controle, contudo, houve diferença significativa entre os peptídeos ($P = 0,0233$). Para as células com potencial de membrana hiperpolarizado, houve redução significativa ($P = 0,004$) no número de células após tratamento com os peptídeos Hr22 ($1,2 \pm 0,08\%$) e Hr24 ($0,9 \pm 0,16\%$), quando comparado com o controle ($2,14 \pm 0,41\%$) como pode ser observado na figura abaixo. Quando calculado a área geométrica dos histogramas, observou-se que não houve diferença estatística das amostras tratadas com os peptídeos em relação ao controle.

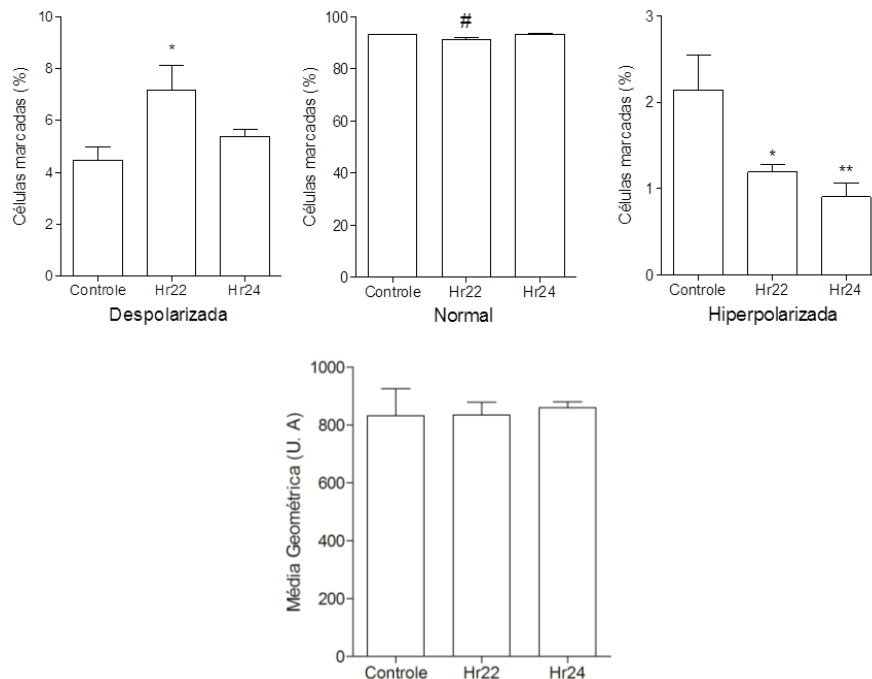


Figura 25. Efeito do tratamento com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC_{50} sobre o potencial de membrana mitocondrial de células de melanoma murino B16F10. As células na presença de rodamina 123 foram classificadas como despolarizada, normal e hiperpolarizada. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; # $P < 0,05$ em relação ao peptídeo Hr24.

Quando as células foram tratadas na concentração correspondente ao IC₇₅, o peptídeo Hr22 apresentou efeito sobre as mitocôndrias, causando a despolarização da membrana em $32 \pm 9,75\%$ das células analisadas e diferiu significativamente ($P=0,0040$) das células do controle e do peptídeo Hr24. O peptídeo Hr24 não apresentou efeitos sobre a despolarização de membrana mitocondrial. Devido ao aumento do número de células com potencial de membrana alterado, o percentual de células com potencial de membrana normal foi reduzido significativamente ($P=0,0048$), quando comparadas ao controle e ao peptídeo Hr24, da mesma forma houve uma redução significativa ($P= <0,0001$) no número de células com potencial de membrana hiperpolarizado quando tratadas com o peptídeo Hr22. Houve diferença significativa do peptídeo Hr24 quando comparadas ao controle em relação ao percentual de células com potencial de membrana hiperpolarizado, como pode ser observado na figura abaixo. A média geométrica dos histogramas apresentou diferença significativa ($P= 0,0004$), quando comparadas ao controle e ao peptídeo Hr24 (Figura 26). Na figura 27-**A** é possível observar que o histograma migra para a direita, indicando despolarização da membrana quando as células foram tratadas com o peptídeo Hr22, o mesmo não acontece com peptídeo Hr24 (Figura 27-**B**).

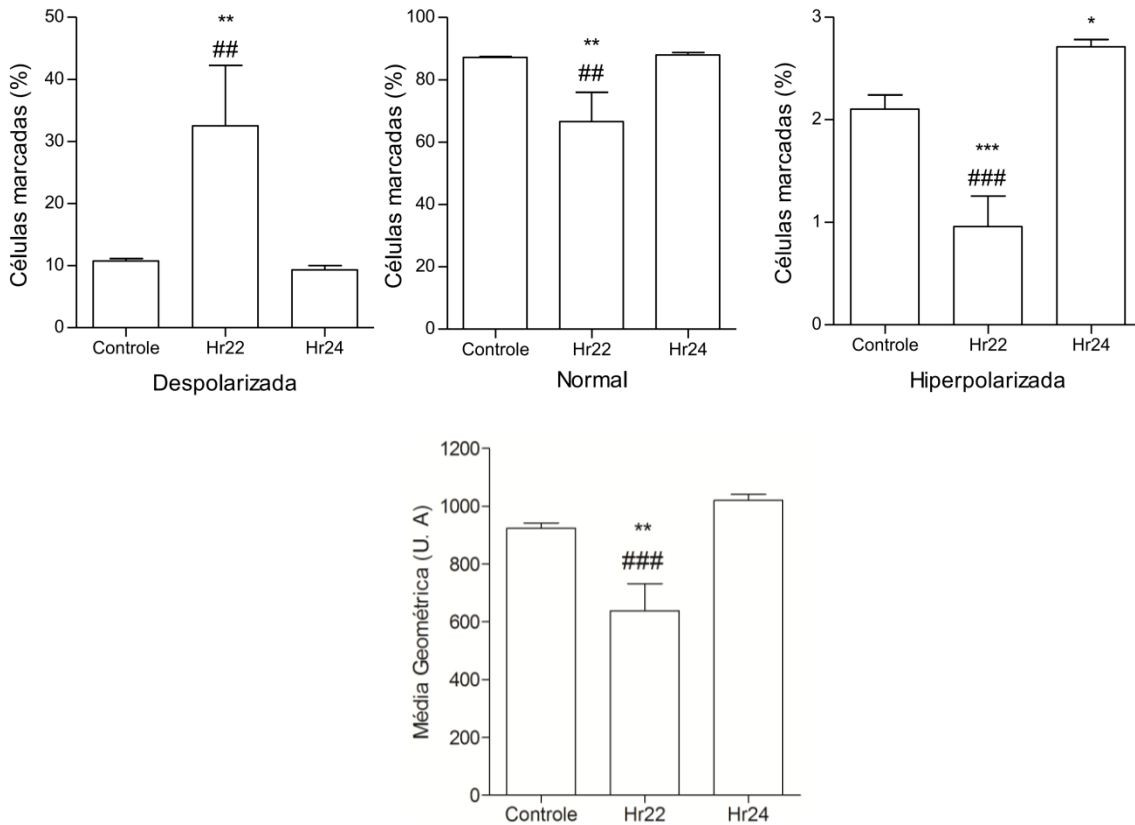


Figura 26. Efeito do tratamento com os peptídeos Hr22 e Hr24 na concentração correspondente ao IC_{75} sobre o potencial de membrana mitocondrial de células de melanoma murino B16F10. As células na presença de rodamina 123 foram classificadas como despolarizada, normal e hiperpolarizada. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ em relação ao peptídeo Hr24.

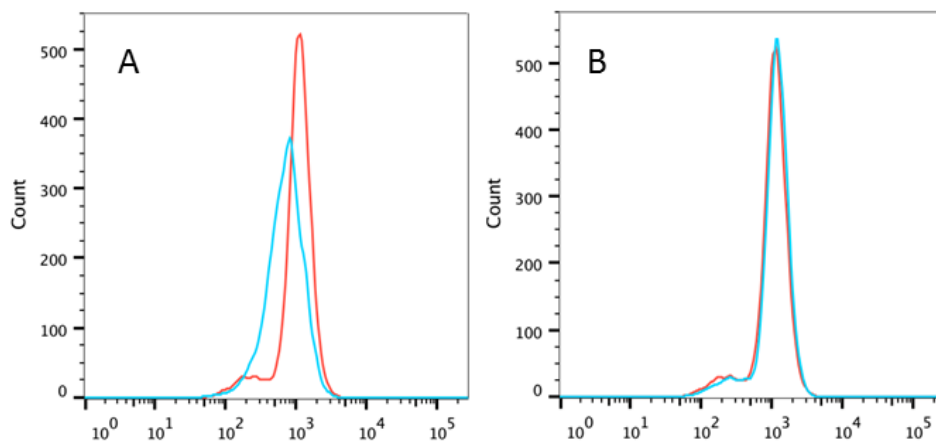


Figura 27. Sobreposição dos histogramas de potencial de membrana mitocondrial. A linha de cor laranja é referente ao controle, (A) linha de cor azul indica o potencial de membrana mitocondrial após tratamento com o peptídeo Hr22 e (B) linha azul indica o potencial de membrana mitocondrial após tratamento com o peptídeo Hr24. Em A é possível observar claramente a migração do histograma para a esquerda, indicando despolarização do potencial de membrana mitocondrial.

Os peptídeos Hr22 e Hr24 foram testados quanto à interação com o DNA das células B16F10. Observou-se que na concentração correspondente ao IC₅₀ não houve diferença significativa das células tratadas com os peptídeos em relação ao controle, como pode ser observado na figura 28-A. Quando tratadas com a concentração correspondente ao IC₇₅, o peptídeo Hr22 causou uma significativa fragmentação no DNA das células ($P = <0,0001$), totalizando $88 \pm 4,9\%$ do número de células (Figura 28-B).

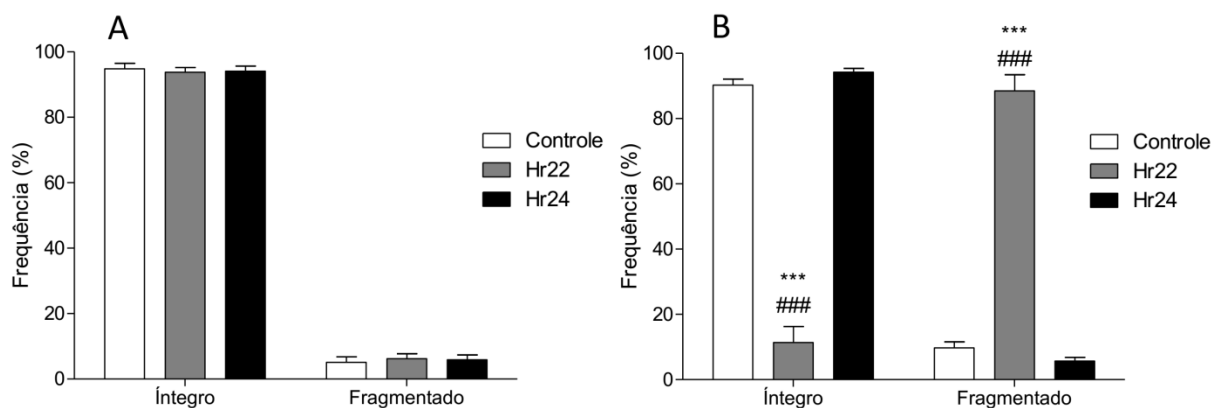


Figura 28. Percentual de células B16F10 com DNA fragmentado quando tratados com os peptídeos em diferentes concentrações. **(A)** Células tratadas na concentração correspondente ao IC₅₀ dos peptídeos Hr22 e Hr24. **(B)** Células tratadas na concentração correspondente ao IC₇₅ dos peptídeos Hr22 e Hr24. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: *** $P < 0,001$; ### $P < 0,001$ em relação ao peptídeo Hr24.

Ao analisar os efeitos dos peptídeos sobre o ciclo celular, observou-se que na concentração correspondente ao IC₅₀ praticamente não houve alterações em relação ao controle e a maioria das células estavam em estado quiescente (G1). Houve diferença significativa ($P = 0,0145$) no número de células em fase de síntese de DNA (S) quando tratadas com o peptídeo Hr22 relação ao controle e ao peptídeo HR24 (Figura 29). Não houve diferença das células tratadas com o peptídeo Hr24, como referido anteriormente, possivelmente devido a algum erro no processo de pesagem.

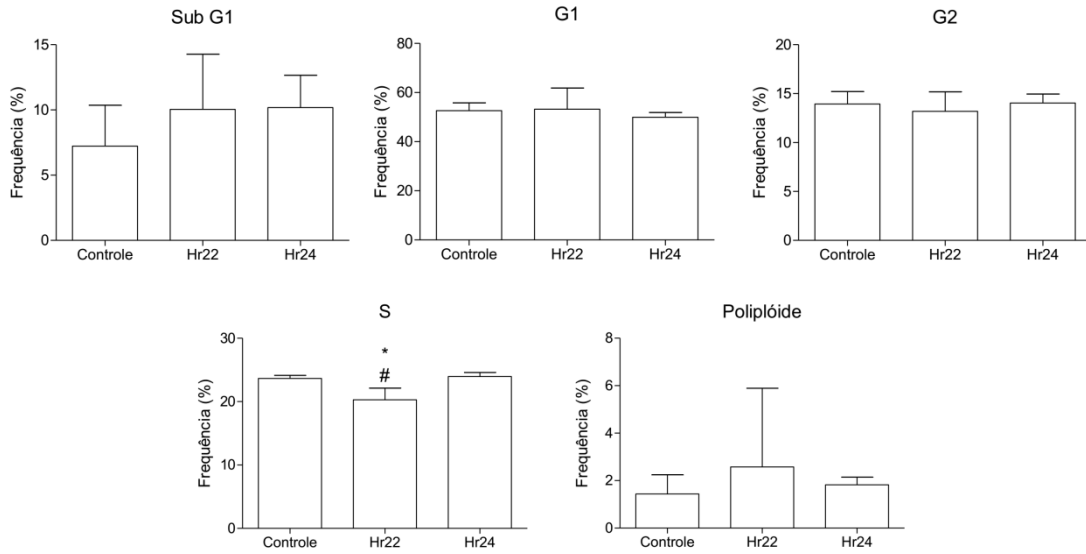


Figura 29. Proporção de células nas diferentes fases do ciclo celular tratadas na concentração correspondente ao IC₅₀ dos peptídeos Hr22 e Hr24. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: * P<0,05; # P<0,05 em relação ao peptídeo Hr24.

Quando tratadas na concentração correspondente ao IC₇₅ do peptídeo Hr22, a grande maioria das células ($89,5 \pm 4,40\%$) estavam em estado Sub G1, indicando apoptose, levando desta forma a uma redução significativa em todos os outros estágios do ciclo celular analisados, como pode ser observado na figura 30. O peptídeo Hr24 apresentou diferença significativa nas células marcadas em G1 e também em células marcadas como poliplóides (Figura 30)

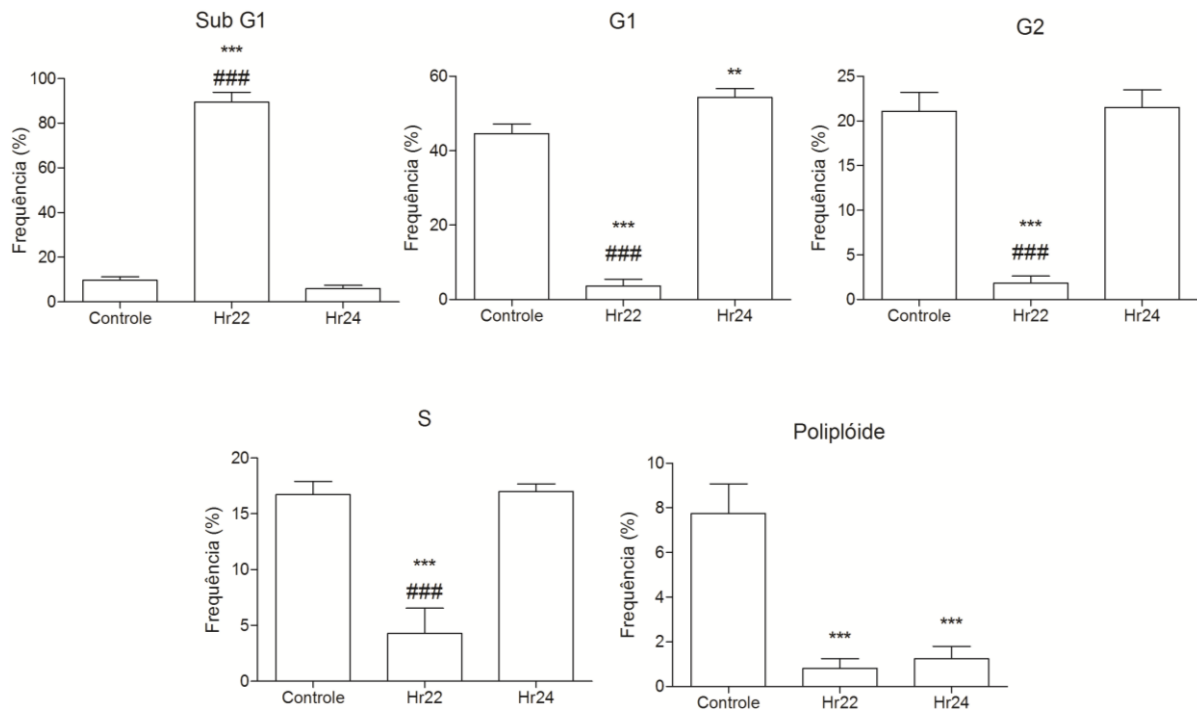


Figura 30. Proporção de células nas diferentes fases do ciclo celular tratadas na concentração correspondente ao IC_{75} dos peptídeos Hr22 e Hr24. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ### $P < 0,001$ em relação ao peptídeo Hr24.

6. DISCUSSÃO

A secreção de *H. raniceps* foi estudada preliminarmente por Magalhães *et al.* (2008), onde foi identificado o peptídeo raniseptina-1 (Tabela 1) com atividade antimicrobiana sobre vários micro-organismos e com baixa atividade hemolítica, além da predição por cDNA de outros 8 peptídeos (raniseptinas 2-9). Outro trabalho realizado por Barbosa (2010) identificou, por meio de cDNA, um peptídeo denominado figainina 4.

Os peptídeos que apresentaram atividade biológica com os quais foi desenvolvido o presente trabalho encontram-se no final do perfil cromatográfico, sendo eluídos a partir de 45% do gradiente de acetonitrila empregado (Figura 7). Estudos demonstram que um maior tempo de retenção em HPLC está associado a uma maior hidrofobicidade e, geralmente, uma carga líquida positiva menor, resultando em um aumento da atividade hemolítica e uma redução da atividade antimicrobiana dessas moléculas (Kim *et al.*, 2005; Conlon *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2009).

A alta hidrofobicidade é resultado da presença de aminoácidos apolares como leucina (L), isoleucina (I), valina (V), metionina (M) e prolina (P) e a carga líquida positiva está associada ao número de aminoácidos carregados positivamente, como lisina (K) e arginina (R). Ao analisar as sequências dos peptídeos Hr22 e Hr24 é possível observar que são compostos por um percentual elevado de aminoácidos hidrofóbicos, justificando os tempos retenção observados durante a cromatografia.

O peptídeo Hr22 possui mais de 70% de similaridade com peptídeo figainina 4 identificado por Barbosa (2010) (Figura 14), embora há de se considerar que, devido a possíveis incertezas resultantes do sequenciamento *de novo* do peptídeo

Hr22 para os aminoácidos leucina (L), isoleucina (I), glutamina (Q) e lisina (K), esta taxa de similaridade pode aumentar ou diminuir.

Da mesma forma, o peptídeo Hr24 possui em torno de 40% de similaridade com o peptídeo hilina a1 (Figura 15) isolada por Castro *et al.* (2009) e que, devido à limitação do sequenciamento *de novo*, pode aumentar ou diminuir decorrente da confirmação ou não dos resíduos de leucina (L) e lisina (K) observados na sequência.

O peptídeo Hr22 apresentou uma atividade bactericida com uma dose de 4 μM para patógenos Gram-positivos e entre 4 e 8 μM para bactérias Gram-negativas e não apresentou atividade para as espécies de fungo do gênero *Candida* utilizadas diferentemente dos peptídeos hilina a1 e cinerascetina-01 que inibiram o crescimento em doses de aproximadamente 16 μM (Castro *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2015) e 8 μM do peptídeo Ctx-Ha (Cespedes *et al.*, 2012). Da mesma forma, o peptídeo Hr24 foi mais ativo contra as bactérias Gram-positivas do que contra as Gram-negativas (Tabela 2), o que parece ser uma tendência com os peptídeos do gênero *Hypsiboas* com exceção do peptídeo raniseptina-1 (Prates *et al.*, 2004; Magalhães *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2009; Cespedes *et al.*, 2012; Siano *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2015; Nacif-Marçal *et al.*, 2015).

Tanto o peptídeo Hr22 quanto o Hr24 apresentaram atividade hemolítica em baixas concentrações (ver Tabela 2). Este efeito pode ser resultado do caráter catiônico desses peptídeos, sendo favorecidas as interações com moléculas de ácido siálico carregados negativamente presentes na superfície dos eritrócitos (Viitala e Järnefelt, 1985; Blondelle *et al.*, 1999). Curiosamente o peptídeo Hr24 apresentou praticamente o mesmo HC_{50} que o peptídeo hilina a1.

Quanto à citotoxicidade, tanto o peptídeo Hr22 quanto o Hr24 foram capazes de inibir a proliferação de células de melanoma murino (B16F10) com um IC_{50} relativamente baixo. O peptídeo Hr22 foi tóxico tanto para as células cancerosas quanto para as não cancerosas com um IC_{50} muito próximo e um mesmo IC_{75} para ambas as células. Já o peptídeo Hr24 indicou uma possível seletividade em relação às células tumorais com um IC_{50} quase metade do valor do IC_{50} determinado para as células não cancerosas.

Estes resultados vêm a somar com um número crescente de trabalhos que têm abordado as secreções cutâneas de anuros como fontes de substâncias com potencial antiproliferativo.

Sciani e colaboradores (2013) mostraram que a secreção cutânea de várias espécies do gênero *Rhinella*, além de *Phyllomedusa hypocondrialis*, foram capazes de inibir a proliferação de linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), atuando principalmente sobre o ciclo celular, reduzindo a proliferação celular e promovendo apoptose .

Libério e colaboradores (2011) observaram que o peptídeo pentadactilina reduziu a viabilidade celular de B16F10 promovendo rompimento da membrana plasmática, fragmentação de DNA, alteração no potencial de membrana mitocondrial, entre outros efeitos, sugerindo que o peptídeo induz a apoptose, um resultado semelhante foi observado por Carvalho e colaboradores (2015), estudando os efeitos citotóxicos da secreção cutânea bruta de *Physalaemus nattereri*.

Os peptídeos dermaseptinas B2 e B3 apresentaram um IC_{50} baixo (entre 2-3 μ M) sobre proliferação de células de adenocarcinoma prostático humano (PC-3) e não apresentaram atividade sobre células normais de camundongo (NIH3T3),

além de inibir a proliferação de células endoteliais aórticas bovinas, indicando, também, um potencial angiostático (Zoggel *et al.*, 2010). WAN e colaboradores (2015) observaram que o peptídeo Phylloseptin-PBa reduziu a viabilidade celular de várias linhagens de células de câncer com o IC_{50} inferior ao de células normais.

Quanto à proliferação celular analisada pelo método de azul de tripan, o peptídeo Hr22 não reduziu o número de células, já o peptídeo Hr24 reduziu em 25% o número de células quando comparado ao controle (Figura 17-A). Estes resultados condizem com o encontrado por Libério e colaboradores (2011) onde o peptídeo pentadactilina reduziu significativamente o número de células, além de provocar um aumento significativo de dano na membrana plasmática, algo que não foi observado neste trabalho empregando-se a dose correspondente ao IC_{50} . Mas ao se realizar o tratamento com a concentração correspondente ao IC_{75} , o peptídeo Hr22 reduziu o número de células e danificou a membrana plasmática da maioria das células observadas (Figura 18). Também não foi observada uma diferença significativa na morfologia celular quanto ao tamanho e à granulosidade quando estas foram tratadas com os peptídeos Hr22 e Hr24 (Figura 19) nas doses de suas respectivas IC_{50} . Empregando-se a dose correspondente ao IC_{75} do peptídeo Hr22 houve uma alteração significativa na morfologia das células (Figura 20-B), assim como observado por Carvalho e colaboradores (2015).

Quando as células tratadas com os peptídeos foram marcadas com anexina V e iodeto de propídio, observou-se que não houve diferenças significativas para a marcação somente com iodeto de propídio sugerindo que os peptídeos não provocam necrose tanto para a dose correspondente ao IC_{50} quanto para o IC_{75} . Para a marcação com anexina e PI verificou-se que com a dose do IC_{50} e do IC_{75} a tendência de marcação celular se manteve para peptídeo Hr22 em relação ao

controle (Figura 22 e Figura 23), bem como a marcação somente com anexina e no número de células que não foram marcadas por nenhum dos fluoróforos. Estes resultados estão novamente de acordo com os achados de Carvalho e colaboradores (2015) e Wang e colaboradores (2013) sugerem uma ruptura de membrana induzindo a exposição de fosfatidilserina da superfície celular.

Estudos prévios já relataram que peptídeos podem alterar o potencial de membrana mitocondrial (Liu *et al.*, 2011; Wang, Tian, *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2015). Com a permeabilização da membrana mitocondrial externa, uma série de proteínas localizadas no espaço intramembranar são liberadas e acabam servindo como ativadores de caspases no citosol ou estimulando endonucleases no núcleo, induzindo a apoptose das células (Henry-Mowatt *et al.*, 2004).

Neste trabalho, observamos que houve um número significativo de células marcadas com membrana mitocondrial despolarizada quando tratadas com a dose correspondente ao IC_{50} do peptídeo Hr22 (7,1%) como pode ser observado na figura 22, porém não houve redução significativa no número de células marcadas com potencial de membrana normal. Da mesma forma houve uma diminuição significativa de células marcadas com potencial de membrana despolarizado quanto tratadas com a dose correspondente ao IC_{50} dos peptídeos Hr22 e Hr24 em relação ao controle, indicando que os peptídeos podem estar interagindo com a membrana mitocondrial. Este resultado fica mais evidente quando testado com a dose correspondente ao IC_{75} do peptídeo Hr22, que mostrou claramente que houve despolarização do potencial de membrana mitocondrial (Figura 26 e 27), algo que não tinha ficado muito claro quando as células foram tratadas com a dose correspondente ao IC_{50} deste peptídeo. Isso pode ser explicado pelo fato de que

com a variação de dosagem de alguma droga, o mecanismo de ação pode ser modificado (Jordan, 2002).

Chan e colaboradores (2006) mostraram que, em doses mais baixas, 25 μM , a curcumina induz apoptose pela ativação de JNK (c-Jun N-terminal quinase), ativação de caspase-3 e clivagem de PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) e PAK2 (P21-activated protein kinase 2), já em doses mais altas (50-200 μM), a curcumina não induz apoptose e sim morte celular por necrose. Algo semelhante pode ocorrer com o peptídeo Hr22.

No ensaio de fragmentação de DNA, o tratamento com a dose correspondente ao IC_{50} dos peptídeos Hr22 e Hr24 não interferiu significativamente na integridade do DNA quando comparados ao controle (Figura 28-A) e uma variação mínima foi observada no ciclo celular (Figura 29). Quando testado com a dose correspondente ao IC_{75} , a maior parte das células foram marcadas como tendo seu DNA fragmentado depois de tratadas com o peptídeo Hr22 (Figura 28-B) e da mesma forma houve alteração no ciclo celular (Figura 30), com quase a totalidade das células no estágio Sub G1. Alterações no DNA ativam mecanismos que interrompem o ciclo celular e podem induzir a apoptose por meio da via p53, entre outras (Igney e Krammer, 2002).

O peptídeo Hr22 atuou em vários níveis da maquinaria celular, indicando apoptose. Entretanto estudos posteriores são necessários para elucidar os seus possíveis mecanismos de ação. Além do mais ainda não se sabe se os mecanismos de necrose, apoptose, autofagia, entre outros, são totalmente independentes ou sobrepostos (Okada e Mak, 2004)

7. CONCLUSÃO

Neste estudo identificamos dois peptídeos inéditos com massas moleculares de 3006 e 1914 Da a partir da secreção cutânea da rã *Hypsiboas raniceps* com potente atividade bactericida contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, variando seus MICs entre 4 e 16 μ M, sendo mais ativos contra bactérias Gram-positivas. Tais peptídeos exibiram atividade hemolítica superior aos valores dos seus MICs e não apresentaram inibição total sobre leveduras do gênero *Candida* mesmo nas doses mais elevadas empregadas.

Estes dois peptídeos apresentaram toxicidade sobre células cancerosas (B16F10) e também para fibroblastos normais (NIH3T3), sendo que um destes peptídeos (Hr22) apresentou concentrações efetivas muito próximas para as duas linhagens celulares, já o outro (Hr24) indicou uma possível seletividade em relação à linhagem cancerosa.

Ensaio de citometria de fluxo indicaram que os dois peptídeos provocam modificações nas células cancerosas. Entretanto apenas para o peptídeo Hr22 foi possível observar os resultados deletérios empregando-se a dose correspondente ao IC₇₅, mostrando-se ativo em diferentes locais da célula.

Estudos posteriores serão necessários para testar a atividade do peptídeo Hr24 usando o IC₇₅, visto que nos estudos preliminares indicava uma possível seletividade.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para o presente trabalho, destacamos:

- ✓ Sequenciamento químico para elucidar os resíduos de aminoácidos isóbaros observados por meio do sequenciamento *de novo*;
- ✓ Repetir os ensaios de citometria de fluxo com o peptídeo Hr24;
- ✓ Realizar ensaios adicionais para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dos peptídeos Hr22 e Hr24 sobre células de melanoma murino (B16F10), bem como realizar experimentos com outras linhagens celulares humanas como MCF-7 e HeLa;
- ✓ Avaliação destes peptídeos sobre a inibição de diferentes organismos patogênicos como o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, bactérias resistentes *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*;
- ✓ Produção, por síntese química, de análogos dos peptídeos com o objetivo de melhorar a atividade e seletividade destas moléculas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. A.; GORDO, M.; SILVA, F. M. A. D.; ARAÚJO, R. C. D.; RAMADA, M. H. S.; ABRÃO, F. Y.; COSTA, T. O. G.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L. D.; BLOCH JR., C. Cinerascetins, New Peptides from *Hypsiboas cinerascens*: MALDI LIFT-TOF-MS/MS de novo sequence and imaging analysis. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 26, p. 2290-2297. 2015.

ALMEIDA, V. D.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova.** v. 28, n. 1, p. 118-29. 2005.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** v. 215, n. 3, p. 403-10. 1990.

AZEVEDO CALDERON, L.; SILVA ADE, A.; CIANCAGLINI, P.; STABELI, R. G. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. **Amino Acids.** v. 40, n. 1, p. 29-49. 2011.

BALMAIN, A.; BARRETT, J. C.; MOSES, H.; RENAN, M. J. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. **Mol. Carcinog.** v. 7, n. 3, p. 139-146. 1993.

BARACCA, A.; SGARBI, G.; SOLAINI, G.; LENAZ, G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. **B.B.A. Bioenergetics.** v. 1606, n. 1–3, p. 137-146. 2003.

BARBOSA, E. A. **Avaliação da transcrição, expressão e indução de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em *Hypsiboas raniceps* por ferramentas de biologia molecular e espectrometria de massa.** Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). 2010. 92 p. Universidade de Brasília.

BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **B.B.A. Biomembranes.** v. 1758, n. 9, p. 1529-1539. 2006.

BERMAN, J. *Candida albicans*. **Curr. Biol.** v. 22, n. 16, p. R620-R622. 2012.

BIGGIN, P. C.; SANSOM, M. S. Interactions of α -helices with lipid bilayers: a review of simulation studies. **Biophys. Chem.** v. 76, n. 3, p. 161-183. 1999.

BJELLQVIST, B.; HUGHES, G. J.; PASQUALI, C.; PAQUET, N.; RAVIER, F.; SANCHEZ, J. C.; FRUTIGER, S.; HOCHSTRASSER, D. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. **Electrophoresis.** v. 14, n. 1, p. 1023-1031. 1993.

BLONDELLE, S. E.; LOHNER, K.; AGUILAR, M.-I. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. **B.B.A. Biomembranes.** v. 1462, n. 1, p. 89-108. 1999.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat. Rev. Microbiol.** v. 3, n. 3, p. 238-50. 2005.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.** v. 9, n. 7, p. 327-335. 2001.

CARVALHO, A.; MÁRQUEZ, C.; AZEVEDO, R.; JOANITTI, G.; JÚNIOR, O.; FONTES, W.; CASTRO, M. Cytotoxic activity and antiproliferative effects of crude skin secretion from *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) on in vitro melanoma cells. **Toxins.** v. 7, n. 10, p. 3989-4005. 2015.

CASTRO, M. S.; FERREIRA, T. C. G.; CILLI, E. M.; CRUSCA, E.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SEBBEN, A.; RICART, C. A. O.; SOUSA, M. V.; FONTES, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides.** v. 30, n. 2, p. 291-296. 2009.

CASTRO, M. S.; MATSUSHITA, R. H.; SEBBEN, A.; SOUSA, M. V.; FONTES, W. Hylinins: bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the Brazilian tree-frog *Hyla biobeba*. **Protein. Pept. Lett.** v. 12, n. 1, p. 89-93. 2005.

CESPEDES, G.; LORENZÓN, E.; VICENTE, E.; MENDES-GIANNINI, M.; FONTES, W.; CASTRO, M.; CILLI, E. Mechanism of action and relationship between structure

and biological activity of Ctx-Ha: a new ceratotoxin-like peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. **Protein. Pept. Lett.** v. 19, n. 6, p. 596. 2012.

CHAN, W.-H.; WU, H.-Y.; CHANG, W. H. Dosage effects of curcumin on cell death types in a human osteoblast cell line. **Food Chem. Toxicol.** v. 44, n. 8, p. 1362-1371. 2006.

CHERNYSH, S.; KIM, S. I.; BEKKER, G.; PLESKACH, V. A.; FILATOVA, N. A.; ANIKIN, V. B.; PLATONOV, V. G.; BULET, P. Antiviral and antitumor peptides from insects. . **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 99, n. 20, p. 12628-12632. 2002.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.** v. 72, n. 03, p. 365-379. 1997.

CONLON, J. M. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 68, n. 13, p. 2303-2315. 2011.

CONLON, J. M.; IWAMURO, S.; KING, J. D. Dermal cytolytic peptides and the system of innate immunity in anurans. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1163, n. 1, p. 75-82. 2009.

CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; COQUET, L.; JOUENNE, T.; IWAMURO, S. Cytolytic peptides belonging to the brevinin-1 and brevinin-2 families isolated from the skin of the Japanese brown frog *Rana dybowskii*. **Toxicon.** v. 50, n. 6, p. 746-756. 2007.

DALY, J. W.; SPANDE, T. F.; GARRAFFO, H. M. Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. **J. Nat. Prod.** v. 68, n. 10, p. 1556-1575. 2005.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int. J. Cancer.** v. 136, n. 5, p. E359-E386. 2015.

FOX, N. K.; BRENNER, S. E.; CHANDONIA, J.-M. SCOPe: Structural Classification of Proteins—extended, integrating SCOP and ASTRAL data and classification of new structures. **Nucleic Acids Res.** v. 42, n. D1, p. D304-D309. 2014.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (16/01/2016). Electronic Database accessible at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA. 2016. Acesso em 20/12/2015.

GASPAR, D.; VEIGA, A. S.; CASTANHO, M. A. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. **Front. Microbiol.** v. 4, p. 294. 2013.

GAUTIER, R.; DOUGUET, D.; ANTONNY, B.; DRIN, G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. **Bioinformatics.** v. 24, n. 18, p. 2101-2102. 2008.

GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annu. Rev. Med.** v. 53, n. 1, p. 615-627. 2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, ROBERT A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell.** v. 144, n. 5, p. 646-674. 2011.

HENRY-MOWATT, J.; DIVE, C.; MARTINOU, J.-C.; JAMES, D. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. **Oncogene.** v. 23, n. 16, p. 2850-2860. 2004.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **B.B.A. Biomembranes.** v. 1778, n. 2, p. 357-375. 2008.

HUANG, H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. **Biochemistry.** v. 39, n. 29, p. 8347-52. 2000.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat. Rev. Cancer.** v. 2, n. 4, p. 277-288. 2002.

JIANG, Z.; VASIL, A. I.; HALE, J. D.; HANCOCK, R. E. W.; VASIL, M. L.; HODGES, R. S. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. **Biopolymers.** v. 90, n. 3, p. 369-383. 2008.

JORDAN, M. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. **Curr. Med. Chem. Anticancer Agents**. v. 2, n. 1, p. 1-17. 2002.

KIM, S.; KIM, S. S.; LEE, B. J. Correlation between the activities of α -helical antimicrobial peptides and hydrophobicities represented as RP HPLC retention times. **Peptides**. v. 26, n. 11, p. 2050-2056. 2005.

LA MARCA, E.; AZEVEDO-RAMOS, C.; SILVANO, D.; SCOTT, N. A., L.; FAIVOVICH, J. *Hypsiboas raniceps*. The IUCN red list of threatened species. Version 2014.3. www.iucnredlist.org. 2004. Acesso em 15 de Maio de 2015.

LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A. K. M.; WERTHEIM, H. F. L.; SUMPRADIT, N.; VLIEGHE, E.; HARA, G. L.; GOULD, I. M.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.; SO, A. D.; BIGDELI, M.; TOMSON, G.; WOODHOUSE, W.; OMBAKA, E.; PERALTA, A. Q.; QAMAR, F. N.; MIR, F.; KARIUKI, S.; BHUTTA, Z. A.; COATES, A.; BERGSTROM, R.; WRIGHT, G. D.; BROWN, E. D.; CARS, O. Antibiotic resistance—the need for global solutions. **Lancet. Infect. Dis**. v. 13, n. 12, p. 1057-1098. 2013.

LEHMANN, J.; RETZ, M.; SIDHU, S. S.; SUTTMANN, H.; SELL, M.; PAULSEN, F.; HARDER, J.; UNTEREGGER, G.; STÖCKLE, M. Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. **Eur. Urol**. v. 50, n. 1, p. 141-147. 2006.

LEUSCHNER, C.; HANSEL, W. Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments. **Curr. Pharm. Des**. v. 10, n. 19, p. 2299-2310. 2004.

LIBÉRIO, M. S.; BASTOS, I.; PIRES JÚNIOR, O. R.; FONTES, W.; SANTANA, J. M.; CASTRO, M. S. The crude skin secretion of the pepper frog *Leptodactylus labyrinthicus* is rich in metallo and serine peptidases. **PLoS One**. v. 9, n. 6, p. e96893-1. 2014.

LIBÉRIO, M. S.; JOANITTI, G. A.; AZEVEDO, R. B.; CILLI, E. M.; ZANOTTA, L. C.; NASCIMENTO, A. C.; SOUSA, M. V.; JÚNIOR, O. R. P.; FONTES, W.; CASTRO, M. S. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. **Amino Acids**. v. 40, n. 1, p. 51-59. 2011.

LIU, S.; YANG, H.; WAN, L.; CAI, H.-W.; LI, S.-F.; LI, Y.-P.; CHENG, J.-Q.; LU, X.-F. Enhancement of cytotoxicity of antimicrobial peptide magainin II in tumor cells by bombesin-targeted delivery. **Acta. Pharmacol. Sin.** v. 32, n. 1, p. 79-88. 2011.

MAGALHÃES, B. S.; MELO, J. A. T.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; VINECKY, F.; BARBOSA, E. A.; VERLY, R. M.; MEHTA, A.; NICOLI, J. R.; BEMQUERER, M. P.; ANDRADE, A. C.; BLOCH JR, C. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 377, n. 4, p. 1057-1061. 2008.

MAGRANE, M. UniProt Consortium. UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. **Database.** v. 2011, p. bar009. 2011.

MANSOUR, S. C.; HANCOCK, R. E. Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. **J. Pept. Sci.** v. 21, n. 5, p. 323-329. 2015.

MANSOUR, S. C.; PENA, O. M.; HANCOCK, R. E. Host defense peptides: front-line immunomodulators. **Trends Immunol.** v. 35, n. 9, p. 443-450. 2014.

MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. **Curr. Opin. Pharmacol.** v. 6, n. 5, p. 468-472. 2006.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. **B.B.A. Biomembranes.** v. 1462, n. 1, p. 1-10. 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** v. 65, n. 1, p. 55-63. 1983.

NACIF-MARÇAL, L.; PEREIRA, G. R.; ABRANCHES, M. V.; COSTA, N. C. S.; CARDOSO, S. A.; HONDA, E. R.; DE PAULA, S. O.; FEIO, R. N.; OLIVEIRA, L. L. Identification and characterization of an antimicrobial peptide of *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) (Amphibia, Hylidae). **Toxicon.** v. 99, p. 16-22. 2015.

NASCIMENTO, A. C.; FONTES, W.; SEBEN, A.; CASTRO, M. S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. **Protein. Pept. Lett.** v. 10, n. 3, p. 227-38. 2003.

NIELSEN, S. L.; FRIMODT-MØLLER, N.; KRAGELUND, B. B.; HANSEN, P. R. Structure–activity study of the antibacterial peptide fallaxin. **Prot. Sci.** v. 16, n. 9, p. 1969-1976. 2007.

NIZET, V. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. **Curr. Issues Mol. Biol.** v. 8, n. 1, p. 11. 2006.

NUSSBAUMER, S.; BONNABRY, P.; VEUTHEY, J.-L.; FLEURY-SOUVERAIN, S. Analysis of anticancer drugs: A review. **Talanta.** v. 85, n. 5, p. 2265-2289. 2011.

OELKRUG, C.; HARTKE, M.; SCHUBERT, A. Mode of action of anticancer peptides (ACPs) from amphibian origin. **Anticancer Res.** v. 35, n. 2, p. 635-643. 2015.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat. Rev. Cancer.** v. 4, n. 8, p. 592-603. 2004.

ONUMA, Y.; SATAKE, M.; UKENA, T.; ROUX, J.; CHANTEAU, S.; RASOLOFONIRINA, N.; RATSIMALOTO, M.; NAOKI, H.; YASUMOTO, T. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. **Toxicon.** v. 37, n. 1, p. 55-65. 1999.

PAPO, N.; SHAI, Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 62, n. 7, p. 784-790. 2005.

PFALLER, M.; MESSER, S.; HOLLIS, R.; JONES, R.; DIEKEMA, D. In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6,970 clinical isolates of *Candida* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 46, n. 6, p. 1723-1727. 2002.

POUNY, Y.; RAPAPORT, D.; MOR, A.; NICOLAS, P.; SHAI, Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. **Biochemistry.** v. 31, n. 49, p. 12416-12423. 1992.

PRATES, M. V.; SFORÇA, M. L.; REGIS, W. C.; LEITE, J. R.; SILVA, L. P.; PERTINHEZ, T. A.; ARAÚJO, A. L.; AZEVEDO, R. B.; SPISNI, A.; BLOCH, C. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. **J. Biol. Chem.** v. 279, n. 13, p. 13018-13026. 2004.

RAMAMOORTHY, A. Beyond NMR spectra of antimicrobial peptides: dynamical images at atomic resolution and functional insights. **Solid State Nucl. Magn. Reson.** v. 35, n. 4, p. 201-7. 2009.

REDDY, K. V.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **Int. J. Antimicrob. Agents.** v. 24, n. 6, p. 536-47. 2004.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nat. Protoc.** v. 1, n. 3, p. 1458-1461. 2006.

ROLLINS-SMITH, L. A.; KING, J. D.; NIELSEN, P. F.; SONNEVEND, A.; CONLON, J. M. An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura: Leptodactylidae). **Regul. Pept.** v. 124, n. 1, p. 173-178. 2005.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat. Rev. Immunol.** v. 11, n. 4, p. 275-288. 2011.

SCHWEIZER, F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. **Eur. J. Pharmacol.** v. 625, n. 1-3, p. 190-194. 2009.

SCIANI, J. M.; DE-SÁ-JÚNIOR, P. L.; FERREIRA, A. K.; PEREIRA, A.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; PIMENTA, D. C. Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. **Biomed. Prev. Nutr.** v. 3, n. 1, p. 10-18. 2013.

SENGUPTA, D.; LEONTIADOU, H.; MARK, A. E.; MARRINK, S.-J. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. **B.B.A. Biomembranes.** v. 1778, n. 10, p. 2308-2317. 2008.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **B.B.A. Biomembranes**. v. 1462, n. 1-2, p. 55-70. 1999.

SHAI, Y.; OREN, Z. From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. **Peptides**. v. 22, n. 10, p. 1629-41. 2001.

SHARMA, S. Melittin resistance: a counterselection for ras transformation. **Oncogene**. v. 7, n. 2, p. 193-201. 1992.

SIANO, A.; HÚMPOLA, M. V.; DE OLIVEIRA, E.; ALBERICIO, F.; SIMONETTA, A. C.; LAJMANOVICH, R.; TONARELLI, G. G. Antimicrobial Peptides from Skin Secretions of *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). **J. Nat. Prod.** v. 77, n. 4, p. 831-841. 2014.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol. Syst. Biol.** v. 7, n. 1. 2011.

SIMMACO, M.; MIGNOGNA, G.; BARRA, D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? **Biopolymers**. v. 47, n. 6, p. 435-50. 1998.

SIMONS, K.; IKONEN, E. How cells handle cholesterol. **Science**. v. 290, n. 5497, p. 1721-1726. 2000.

SPELLBERG, B.; GILBERT, D. N. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. **Clin. Infect. Dis.** v. 59, n. suppl 2, p. S71-S75. 2014.

SPELLBERG, B.; POWERS, J. H.; BRASS, E. P.; MILLER, L. G.; EDWARDS, J. E. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. **Clin. Infect. Dis.** v. 38, n. 9, p. 1279-1286. 2004.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA: Cancer J. Clin.** v. 65, n. 2, p. 87-108. 2015.

VIITALA, J.; JÄRNEFELT, J. The red cell surface revisited. **Trends Biochem. Sci.** v. 10, n. 10, p. 392-395. 1985.

WAN, Y.; MA, C.; ZHOU, M.; XI, X.; LI, L.; WU, D.; WANG, L.; LIN, C.; LOPEZ, J.; CHEN, T.; SHAW, C. Phylloseptin-PBa – A Novel Broad-Spectrum Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Peruvian Purple-Sided Leaf Frog (*Phyllomedusa baltea*) Which Exhibits Cancer Cell Cytotoxicity. **Toxins.** v. 7, n. 12, p. 4878. 2015.

WANG, C.; TIAN, L.-L.; LI, S.; LI, H.-B.; ZHOU, Y.; WANG, H.; YANG, Q.-Z.; MA, L.-J.; SHANG, D.-J. Rapid cytotoxicity of antimicrobial peptide tempoprin-1CEa in breast cancer cells through membrane destruction and intracellular calcium mechanism. **PLoS One.** v. 8, n. 4, p. e60462. 2013.

WANG, C.; ZHOU, Y.; LI, S.; LI, H.; TIAN, L.; WANG, H.; SHANG, D. Anticancer mechanisms of temporin-1CEa, an amphipathic α -helical antimicrobial peptide, in Bcap-37 human breast cancer cells. **Life Sciences.** v. 92, n. 20, p. 1004-1014. 2013.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Res.** v. 37, n. suppl 1, p. D933-D937. 2009.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 84, n. 15, p. 5449-53. 1987.

_____. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature.** v. 415, n. 6870, p. 389-95. 2002.

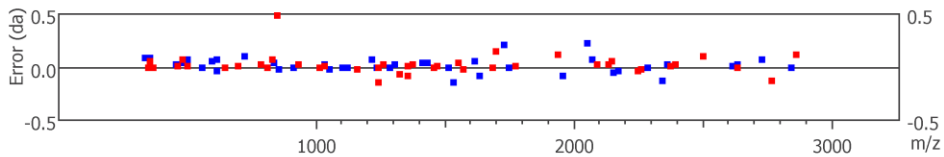
ZHANG, L.-J.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Curr. Biol.** v. 26, n. 1, p. R14-R19. 2016.

ZOGGEL, H.; HAMMA-KOURBALI, Y.; GALANTH, C.; LADRAM, A.; NICOLAS, P.; COURTY, J.; AMICHE, M.; DELBÉ, J. Antitumor and angiostatic peptides from frog skin secretions. **Amino Acids.** v. 42, n. 1, p. 385-395. 2010.

ANEXOS

Anexo 1. Tabela de íons e mapa de erro do sequenciamento do peptídeo Hr22.

#	Immonium	b	b-H2O	b-NH3	b (2+)	Seq	y	y-H2O	y-NH3	y (2+)	#
1	101.1078	129.1028	111.0922	112.0758	65.0514	K					27
2	86.0969	242.1868	224.1763	225.1598	121.5934	L	2878.7102	2860.5649	2861.6831	1439.8551	26
3	86.0969	355.1680	337.1680	338.2439	178.1354	L	2765.7620	2747.6157	2748.5991	1383.3131	25
4	120.0812	502.2530	484.3287	485.2530	251.6696	F	2652.5422	2634.5317	2635.5210	1326.8480	24
5	86.0969	615.3380	597.3380	598.3964	308.2117	L	2505.3530	2487.4631	2488.4465	1253.2368	23
6	101.0714	743.4819	725.4714	726.3400	372.2510	Q	2392.3540	2374.3511	2375.3625	1196.6948	22
7	86.0969	856.5910	838.5080	839.5390	428.7830	L	2264.3491	2246.3206	2247.3491	1132.6655	21
8	30.0343	913.5920	895.5769	896.5605	457.2530	G	2151.1809	2133.2366	2134.1809	1076.1235	20
9	110.0717	1050.6700	1032.5900	1033.6194	525.8232	H	2094.1809	2076.2151	2077.1985	1047.6128	19
10	44.0499	1121.6780	1103.6780	1104.6565	561.3370	A	1957.1666	1939.1561	1940.0110	979.0833	18
11	86.0969	1234.7629	1216.6790	1217.7406	617.9210	L	1886.1295	1868.1190	1869.1025	943.5648	17
12	44.0499	1305.7640	1287.7942	1288.7640	653.4023	A	1773.0250	1755.0349	1756.0184	887.0227	16
13	101.1078	1433.8490	1415.8390	1416.8727	717.4498	K	1701.8530	1684.0090	1684.9813	851.0080	15
14	74.0605	1535.1000	1516.9330	1517.9203	767.9736	T	1573.9340	1555.8510	1556.8865	787.4240	14
15	72.0812	1634.1021	1615.9351	1616.9888	817.5079	V	1472.8500	1454.8552	1455.8490	736.9329	13
16	86.0969	1747.1030	1729.0892	1729.8530	874.0499	L	1373.7650	1355.7650	1356.8480	687.3987	12
17	70.0656	1844.1525	1826.1420	1827.1255	922.5762	P	1260.6801	1242.8459	1243.6801	630.8566	11
18	104.0533	1975.1930	1957.1825	1958.2520	988.0965	M	1163.6790	1145.6500	1146.6335	582.3303	10
19	72.0812	2074.1809	2056.0129	2057.2344	1037.6307	V	1032.5900	1014.6094	1015.5930	516.8100	9
20	74.0605	2175.3491	2157.3491	2158.2820	1088.1545	T	933.5090	915.5410	916.5246	467.2530	8
21	87.0558	2289.3511	2271.3416	2272.3250	1145.1760	N	832.4240	814.5070	815.4769	416.7520	7
22	44.0499	2360.3511	2342.5171	2343.3621	1180.6946	A	718.4609	700.4230	701.4340	359.7305	6
23	120.0812	2507.4575	2489.4470	2490.4304	1254.2288	F	647.4220	629.4133	630.3969	324.2119	5
24	101.1078	2635.5210	2617.5210	2618.5254	1318.2762	K	500.3370	482.2530	483.3285	250.6777	4
25	70.0656	2732.5229	2714.5947	2715.5781	1366.8026	P	372.2510	354.2510	355.1680	186.6302	3
26	101.1078	2860.5649	2842.6909	2843.6731	1430.8501	K	275.2077	257.1972	258.1808	138.1039	2
27	101.1078					K	147.1128	129.1022	130.0858	74.0564	1



Anexo 2. Tabela de íons e mapa de erro do sequenciamento do peptídeo Hr24.

#	Immonium	b	b-H2O	b-NH3	b (2+)	Seq	y	y-H2O	y-NH3	y (2+)	#
1	120.0812	148.0762	130.0657	131.0492	74.5381	F					17
2	87.0558	262.1191	244.1086	245.0921	131.5596	N	1768.6770	1751.1306	1752.1870	885.0706	16
3	30.0343	318.6680	301.1301	301.7510	160.0703	G	1655.1021	1637.0876	1638.1021	828.0491	15
4	74.0605	419.7520	401.8350	403.1613	210.5941	T	1598.0767	1580.0662	1581.0497	799.5383	14
5	86.0969	533.2723	515.2618	516.2454	267.1362	L	1496.9120	1479.0184	1480.0170	749.0145	13
6	86.0969	646.3564	628.3459	629.3295	323.6782	L	1383.9320	1365.9344	1366.9320	692.4725	12
7	70.0656	743.4092	725.3986	726.3822	372.2046	P	1271.0140	1253.0140	1254.0140	635.9304	11
8	86.0969	856.4932	838.4827	839.7580	428.7466	L	1174.0129	1155.7976	1156.9290	587.4041	10
9	44.0499	927.5303	909.5198	910.5034	464.2652	A	1060.8440	1042.7135	1043.8440	530.8620	9
10	72.0812	1026.5988	1008.5882	1009.5718	513.7994	V	989.8430	971.6764	972.8430	495.3435	8
11	72.0812	1125.9290	1107.8450	1108.6401	563.3336	V	890.8420	872.2580	873.5916	445.8093	7
12	101.1078	1254.0140	1236.0129	1236.7351	627.7550	K	791.5501	773.5396	774.6740	395.9190	6
13	101.1078	1381.9320	1363.8466	1364.8301	691.4285	K	663.4551	645.7550	646.4282	332.2276	5
14	101.1078	1509.9340	1491.9340	1492.6730	755.4760	K	535.3602	517.7540	518.3333	268.1801	4
15	86.0969	1623.0190	1604.9430	1606.0092	812.0181	L	406.8350	389.2547	389.9190	204.1326	3
16	120.0812	1770.1040	1752.1870	1753.0775	885.5522	F	294.1812	276.6670	276.6670	147.5906	2
17	101.1078					K	147.1128	129.1022	130.0858	74.0564	1

