



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



**Efeitos antiproliferativos sobre células tumorais das
secreções cutâneas dos anuros *Leptodactylus
Labyrinthicus* e *Phillomedusa azurea* e de seus
peptídeos biologicamente ativos sobre o fungo
*Candida albicans***

Aluna: Aline da Silva Chagas

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Brasília/DF

2014

Aline da Silva Chagas

Efeitos antiproliferativos sobre células tumorais das secreções cutâneas dos anuros *Leptodactylus Labyrinthicus* e *Phillomedusa azurea* e de seus peptídeos biologicamente ativos sobre o fungo *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Brasília/DF

2014



Aline da Silva Chagas

Título:

**Efeitos antiproliferativos sobre células tumorais das
secreções cutâneas dos anuros *Leptodactylus
Labyrinthicus* e *Phillomedusa azurea* e de seus peptídeos
biologicamente ativos sobre o fungo *Candida albicans***

Comissão Examinadora:

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

**Profa. Dra. Izabela M. Dourado Marques
Membro Titular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves
Membro Titular
Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade de Brasília**

**Profa. Dr. Sébastien Olivier Charneau
Membro Suplente
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília**

“Mas se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente, lutarmos pelo melhor... O melhor vai se instalar em nossa vida. Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura.”

Carlos Drummond de Andrade

À minha mãe, quem sempre me inspirou a querer mais, a me superar, quem sempre acreditou em mim quando eu mesma tive dúvidas e quem me deu forças pra continuar, seu amor me fez seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

À Professora Mariana S. Castro que desde o início me acolheu gentilmente, abriu as portas do laboratório para que eu pudesse conhecer o seu trabalho e me apoiou quando eu decidi ingressar na pesquisa.

Ao Professor Osmindo Júnior, cuja colaboração nesse trabalho foi fundamental e que me orientou durante toda a caminhada.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas e do Laboratório de Toxinologia por sua colaboração.

Aos colegas MSc Jéssica Macêdo e MSc César Augusto Prías pela colaboração com os ensaios antitumorais.

À colega MSc Anne Dias pela ajuda com aos ensaios antimicrobianos.

Aos meus colegas de laboratório Aline Guimarães, Andréa, Rosa, Diego, Fabiano, Luz Elena, Ana Carolline, Carolzinha, Harry, Adelson pela amizade e por suas contribuições no meu trabalho.

Ao Nuno Domingues pelo seu apoio técnico, colaboração e amizade.

Ao meu colega de graduação Marcos Vinícius, que me apresentou o LBQP sob seu olhar, o que me fez despertar o interesse por fazer parte dessa equipe.

Ao meu amigo Alison Alexandre que desde o início me inspirou, me incentivou e sempre me apoiou a persistir nesse sonho.

À minha família por seu amor e seu apoio incondicional.

Ao meu Deus, quem me sustenta, me fortalece e me guia no seu infinito amor. A Ele toda a honra e toda glória.

APOIO FINANCEIRO

A dissertação de mestrado intitulada “Purificação e avaliação da atividade anti-Candida de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*” desenvolvida por Aline da Silva Chagas sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq (processos no. 563972/2010-6, Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRÓ-CENTRO-OESTE nº 31/2010, no. 302925/2012-0, Produtividade em Pesquisa - PQ – 2012 e no. 407801-2013, Rede Centro-Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação - REDE PRÓ-CENTRO-OESTE), da FAPDF (processo no 193.000.461/2011, Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRÓ-CENTRO-OESTE nº 31/2010), da CAPES por meio da concessão de bolsa de estudos (nível mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

RESUMO

A secreção cutânea de anuros é reconhecida como uma rica fonte de compostos biologicamente ativos, incluindo amins biogênicas, alcaloides, bufadienolídeos, peptídeos e proteínas. Os peptídeos antimicrobianos constituem um sistema de defesa imediato, atuando sobre um grande espectro de microrganismos. A busca por novas alternativas terapêuticas no tratamento de infecções e câncer tem impulsionado nos estudos voltados à prospecção de novos peptídeos antimicrobianos. No presente trabalho, as secreções cutâneas de *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea* foram utilizadas para avaliar seus efeitos antiproliferativos e citotóxicos sobre células tumorais. Também foram submetidas a fracionamento cromatográfico a fim de se isolar peptídeos com atividade inibitória sobre a proliferação do fungo patogênico *Candida albicans*. As frações bioativas foram analisadas por MALDI-TOF MS e submetidas à recromatografia por RP-HPLC. De acordo com a estratégia experimental empregada foi possível a obtenção de duas frações homogêneas a partir da secreção de *P. azurea*, denominadas PaF31-7(F12) e PaF36-10(F13) que foram empregadas na determinação dos MICs para *C. albicans*. Tais frações mostraram-se capazes de inibir parcialmente o crescimento da levedura *C. albicans* na maior concentração empregada (128 µM). Também foram avaliados os efeitos citotóxicos e antiproliferativos das secreções brutas de *P. azurea* e *L. labyrinthicus* sobre as linhagens celulares HeLa, B16F10 e NIH3T3. Observou-se que a secreção bruta de *L. labyrinthicus* apresenta atividade antiproliferativa acentuada sobre células tumorais empregadas, especialmente células HeLa, com um IC₅₀ de 4,216 µg/mL sem apresentar citotoxicidade relevante contra células normais da linhagem NIH3T3. Ensaio adicionais de citometria de fluxo revelaram que a secreção bruta de *L. labyrinthicus* não interfere de forma significativa nas etapas do ciclo celular, no entanto, observa-se um aumento importante na fragmentação do DNA de células HeLa quando expostas à secreção, sugerindo que a morte celular ocorra por meio de apoptose. Mais estudos precisam ser realizados a fim de se determinar o mecanismo pelo qual a secreção bruta de *L. labyrinthicus* promove a morte das células tumorais.

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

ABSTRACT

The anurans skin secretion is recognized as a rich source of active biological compounds, including alkaloids, peptides and proteins. The antimicrobial peptides constitute an immediate defense system, acting on a wide spectrum of microorganisms. The quest for new therapeutics alternatives for infections treatments and cancer have been driven studies focused on prospecting for new antimicrobial peptides. In this present work, the skin secretions by *Leptodactylus labyrinthicus* and *Phyllomedusa azurea* were utilized for evaluating their antiproliferative and cytotoxic effects on tumor cells. Were also subjected the skin secretion to fractionation in order to isolate peptides with inhibitory activity on the proliferation of the pathogenic fungus *Candida albicans*. The bioactive fractions were analyzed by MALDI-TOF MS, and subjected to rechromatography by RP-HPLC. According to the experimental strategy used was possible to achieve two homogeneous fractions secretion from *P. azurea*, called PaF31 7 (F12) and PaF36 10 (F13). These fractions were capable of partially inhibiting the growth of the yeast *C. albicans* in greater concentration employed (128 μ M). We also evaluated the cytotoxic and antiproliferative crude secretions of *P. azurea* and *L. labyrinthicus* on cell lines HeLa, NIH3T3 and B16F10 effects. It was found that the crude secretion of *L. labyrinthicus* shows marked antiproliferative activity on tumor cells employed, especially HeLa cells with an IC_{50} of 4.216 μ g / ml without showing significant cytotoxicity against normal NIH3T3 cells lineage. Additional tests of flow cytometry showed that the crude secretion of *L. labyrinthicus* not significantly interfere with the stages of the cell cycle, however, there was a significant increase in DNA fragmentation in HeLa cells exposed to secretion, suggesting that cell death occurs by apoptosis. More studies need to be conducted to determine the mechanism by which the crude secretion of *L. labyrinthicus* promotes tumor cell death.

Financial support: CNPq, CAPES, FINEP, FAPDF e FUB-UnB.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain Heart Infusion*

Da – Dalton

HCCA: Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

IC₅₀: Concentração capaz de inibir 50% das células testadas

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

MIC: Concentração inibitória mínima

PAM: Peptídeo antimicrobiano

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

TFA: Ácido trifluoroacético

UFC: Unidade formadora de colônia

ÍNDICE

| Tópico | Página |
|--|---------------|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| <i>A necessidade de se pesquisar novas alternativas de medicamentos antimicrobianos e antitumorais</i> | 1 |
| <i>Peptídeos antimicrobianos de anuros</i> | 1 |
| <i>Peptídeos antimicrobianos do gênero Leptodactylus</i> | 4 |
| <i>Peptídeos citolíticos estudados na secreção cutânea de <i>L. labyrinthicus</i></i> | 8 |
| <i>Peptídeos citolíticos estudados na secreção cutânea de <i>P. azurea</i></i> | 12 |
| <i>Candida albicans: aspectos biológicos, patogênicos e relevância clínica</i> | 17 |
| <i>Câncer: a importância de se investigar compostos com ação antitumoral na secreção de anuros</i> | 18 |
| JUSTIFICATIVA | 20 |
| OBJETIVO GERAL | 22 |
| METAS ESTABELECIDAS | 22 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| REAGENTES QUÍMICOS | 24 |
| COLETA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS SECREÇÕES CUTÂNEAS | 24 |
| FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DAS SECREÇÕES BRUTAS DE <i>L. labyrinthicus</i> e <i>P. azurea</i> | 24 |
| ENSAIO DE VARREDURA PARA IDENTIFICAR AS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS CAPAZES DE INIBIR O CRESCIMENTO DO FUNGO PATOGÊNICO <i>Candida albicans</i> | 25 |
| ENSAIO DE VARREDURA PARA IDENTIFICAR AS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS CAPAZES DE INIBIR O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS | 26 |
| ANÁLISES POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS | 27 |
| DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) | 27 |
| ENSAIO ANTITUMORAL – Teste de viabilidade celular (MTT) | 28 |
| ANÁLISES POR CITOMETRIA DE FLUXO | 30 |
| AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE A FRAGMENTAÇÃO DE DNA | 30 |
| AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE O CICLO CELULAR | 31 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 32 |
| CONCLUSÃO | 47 |
| PERSPECTIVAS | 48 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|---------------|
| Figura 1: Espécime adulto de <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> | 8 |
| Figura 2: Espécime adulto de <i>Phyllomedusa azurea</i> | 13 |
| Figura 3: Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de <i>L. labyrinthicus</i> | 33 |
| Figura 4: Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de <i>P. azurea</i> | 34 |
| Figura 5: Perfil cromatográfico típico da recromatografia da fração <i>L. labyrinthicus</i> F31(RT50,1) | 36 |
| Figura 6: Espectro de massas da fração LIF31-4(F10) | 37 |
| Figura 7: Perfil cromatográfico típico da recromatografia da fração <i>P. azurea</i> F31(RT38,26) | 37 |
| Figura 8: Espectro de massas da fração PaF31-7(F12) | 38 |
| Figura 9: Perfil cromatográfico típico da recromatografia da fração <i>P. azurea</i> F36(RT41,67) | 39 |
| Figura 10: Espectro de massas da fração PaF36-10(F13) | 39 |
| Figura 11: Efeito da incubação de doses crescentes da fração PaF31-7(F12) sobre a proliferação do fungo patogênico <i>Candida albicans</i> | 40 |
| Figura 12: Efeito da incubação de doses crescentes da fração PaF36-10(F13) sobre a proliferação do fungo patogênico <i>Candida albicans</i> . | 41 |
| Figura 13: Avaliação da viabilidade celular após incubação com a secreção bruta de <i>P. azurea</i> nas concentrações de 500 a 3,9 µg/mL | 42 |
| Figura 14: Avaliação da viabilidade celular após incubação com a secreção bruta de <i>L. labyrinthicus</i> nas concentrações de 500 a 3,9 µg/mL | 42 |
| Figura 15: Comparação dos IC ₅₀ obtidos após incubação das diferentes linhagens celulares com as secreções cutâneas de <i>P. azurea</i> e <i>L. labyrinthicus</i> | 43 |
| Figura 16: Efeito da incubação da secreção bruta de <i>L. labyrinthicus</i> sobre a fragmentação de DNA de células HeLa. | 44 |
| Figura 17: Efeito da incubação da secreção bruta de <i>L. labyrinthicus</i> sobre a distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular | 44 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela | Página |
|---|---------------|
| Tabela 1: Relação dos peptídeos antimicrobianos isolados das secreções cutâneas de espécies do gênero <i>Leptodactylus</i> | 7 |
| Tabela 2: Relação dos peptídeos isolados da secreção cutânea de <i>L. labyrinthicus</i> e suas respectivas atividades biológicas. | 10 |
| Tabela 3: Relação dos peptídeos isolados da secreção cutânea de <i>P. azurea</i> e suas respectivas atividades biológicas. | 15 |

INTRODUÇÃO

A necessidade de se pesquisar novas alternativas de medicamentos antimicrobianos e antitumorais

Atualmente a resistência aos antimicrobianos representa um sério problema de saúde pública, não somente no Brasil, mas no mundo todo. É um fenômeno que acontece quando um microrganismo, por meio de seleção natural, passa a apresentar mecanismos o torna refratário aos efeitos de um determinado fármaco, em relação ao qual apresentava sensibilidade anteriormente. Isso torna os tratamentos-padrão empregados ineficazes e infecções persistam podendo se espalhar e se tornar incontroláveis.

Aliada à perda de eficácia dos agentes antimicrobianos comercialmente disponíveis, há uma redução no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Se esta tendência não for alterada, os medicamentos para combater organismos resistentes em breve serão esgotadas (WHO, 2012). Estima-se que entre 1940 e 1962, mais de 20 novas classes de antibióticos foram comercializadas. Desde então, apenas duas novas classes teriam chegado ao mercado, o restante do que se têm desenvolvido são análogos daqueles previamente comercializados. De acordo com Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, pelo menos 10 novos antibióticos ativos contra microorganismos multirresistentes precisam chegar ao mercado nos próximos 10 anos e, em longo prazo, serão necessárias novas classes de antibióticos para que se possam combater as infecções que emergem com o aparecimento de resistência aos medicamentos atualmente disponíveis no mercado (Coates, Halls, & Hu, 2011).

Peptídeos antimicrobianos de anuros

A classe dos anfíbios é formada por um grupo monofilético de mais de seis mil espécies distribuídas em três ordens distintas que ocupam tanto o ambiente terrestre quanto o aquático: Anura (sapos, rãs e pererecas), Urodela (salamandras e tritões) e Gymnophiona (cecílias), sendo a Anura a maior

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

ordem com cerca de 6.300 espécies pertencentes a pelo menos 54 famílias (Frost, 2014).

Uma característica dos anfíbios é 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, que tem 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 as glândulas granulosas liberando seu conteúdo. Tais glândulas liberam secreções que contêm compostos ativos como aminas biogênicas, esteróides, alcalóides, bufodienolídeos, peptídeos e proteínas que podem ter efeito neurotóxico, vasoconstritor, alucinógeno, hipotensor, antimicrobiano e citotóxico (Nascimento *et al.*, 2004; Mangoni & Shai, 2009).

Dentre as três ordens conhecidas de anfíbios, a ordem Anura foi a que teve mais estudos acerca da composição e propriedades de sua secreção cutânea. Muitos peptídeos e proteínas são encontrados na secreção de anuros, vários deles possuindo análogos em tecidos gastrointestinais e neurais de mamíferos, superfícies mucosas, como a da traqueia, e em neutrófilos sugerindo que há uma relativa importância e aparente implicação nos sistemas de defesa de mamíferos, inclusive no homem (Lucca & Walsh, 1999).

A permeabilidade do tegumento à água limita a maioria dos anfíbios a microhabitats úmidos onde possam controlar o ganho e a perda de água (osmorregulação), além do controle da temperatura corporal. 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 anuros apresentam na sua secreção cutânea peptídeos antimicrobianos (PAMs) que

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

fazem parte do seu sistema imune inato (Nascimento *et al.*, 2004). A pele dos anfíbios pode ser o ambiente ideal para colonização e infecção de microrganismos, de onde eles podem obter um suprimento contínuo de nutrientes, uma vez que há oxigênio disponível e a transmissão ambiental pode ocorrer em habitats aquáticos e terrestres. Dessa forma, um mecanismo de defesa imune efetivo é crucial para proteger os anuros de infecções originadas em nível cutâneo. Dentre outros mecanismos imunológicos, os PAMs são os que mais contribuem para a proteção cutânea contra microrganismos patogênicos (Daum *et al.*, 2012).

Os peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea dos anuros são caracterizados por ter de 10 a 48 resíduos de aminoácidos, a maioria apresenta-se como moléculas catiônicas (carga líquida igual ou superior a +2) e, aproximadamente, 50% dos resíduos presentes são representados por aminoácidos hidrofóbicos (Reddy *et al.*, 2004; Marr *et al.*, 2006). A atividade bactericida dos peptídeos não é mediada por interações entre receptores específicos, mas pela interação direta entre o peptídeo e os fosfolípídeos da membrana plasmática (Nascimento *et al.*, 2004). Muitos peptídeos antimicrobianos 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 & Lohner, 2006; Conlon *et al.*, 2008).

A carga positiva dos peptídeos antimicrobianos favorece uma maior interação com os fosfolípídeos negativamente carregados (fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e cardiolipina) das membranas bacterianas do que com fosfolípídeos “zwitteriônicos” (neutros) presentes na face extracelular da membrana de células de mamíferos (Biggin & Sansom, 1999; Reddy *et al.*, 2004; Matsuzaki *et al.*, 1999; Ramamoorthy *et al.*, 2009), o que é uma característica que faz com que esses peptídeos tenham uma toxicidade seletiva intrínseca, tornando-os alvos interessantes de estudo para o desenvolvimento de novos agentes de uso farmacológico. Os peptídeos antimicrobianos possuem um grande potencial terapêutico devido a sua

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

propriedade lítica. Eles têm demonstrado habilidade em matar rapidamente um grande espectro de microrganismos, incluindo as bactérias multirresistentes a drogas, exibindo atividade contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Reddy *et al.*, 2004).

O interesse científico em pesquisar peptídeos antimicrobianos de anuros começou a emergir em 1970 depois de ser purificada a bombinina da espécie *Bombina variegata* e intensificou-se acentuadamente após o isolamento das magaininas da rã-africana *Xenopus laevis* em 1987 por Zasloff. As pesquisas nessa área têm sido facilitadas pelo fato de que peptídeos antimicrobianos estão disponíveis em grandes quantidades, sendo que às vezes é possível obter de um único animal material suficiente para a caracterização química e biológica dessas moléculas (Nascimento *et al.*, 2004). Atualmente há vários estudos sendo desenvolvidos que descrevem o isolamento e a caracterização de peptídeos com ação antimicrobiana isolados de várias espécies de anuros, sendo que, no caso dos PAMs isolados de anuros do gênero *Leptodactylus*, a descrição dos primeiros PAMs isolados de uma espécie desse gênero foi pelo nosso grupo em 2004, com o isolamento das ocellatinas a partir da secreção cutânea da rã Sul-Americana *L. latrans* (anteriormente denominada *L. ocellatus*, daí a denominação ocellatinas) (Nascimento *et al.*, 2004). Atualmente já existe um conjunto de resultados interessantes com PAMs para uso terapêutico isolados de anuros do gênero *Leptodactylus*.

Peptídeos antimicrobianos do gênero Leptodactylus

Uma espécie já bem estudada dentro desse gênero é a *Leptodactylus latrans* (como dito acima, anteriormente conhecida como *L. ocellatus*), da qual temos hoje isolados mais de uma dezena de PAMs. Esses peptídeos são conhecidos como ocellatinas sendo que a maioria delas apresenta atividade antimicrobiana. As três primeiras ocellatinas isoladas apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli*, mas também exibiram atividade hemolítica importante (Nascimento *et al.*, 2004). Posteriormente, uma quarta ocellatina foi identificada. A ocellatina 4 apresenta carga líquida neutra em pH fisiológico e

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

baixa atividade antimicrobiana, sendo que o baixo efeito antimicrobiano poderia estar relacionado com a sua carga neutra, o que faria com esse peptídeo interagisse fracamente com a membrana bacteriana carregada negativamente. Em contraposição, exibiu considerável atividade hemolítica, provavelmente por possuir faces polares e apolares pouco distinguíveis (Nascimento *et al.*, 2007).

Leite *et al.* (2010) isolaram as ocellatinas 5 e 6 (com 21 e 22 resíduos de aminoácidos, respectivamente) que exibiram potente atividade contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, mesmo em baixas concentrações. Algo interessante que se pode observar é que nos dois primeiros estudos, onde foram isoladas as ocellatinas 1, 2, 3 e 4 (Nascimento *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2007) foram utilizados indivíduos coletados no Cerrado e no trabalho descrevendo as ocellatinas 5 e 6 (Leite *et al.*, 2010) foram utilizados indivíduos da mesma espécie coletados em região de Mata Atlântica, tendo sido constatadas diferenças importantes nas estruturas primárias das ocellatinas dos animais coletados no Cerrado e daqueles coletados na Mata Atlântica, mesmo ambos pertencendo a uma única espécie. No geral, observa-se que os peptídeos isolados de *L. latrans* (*L. ocellatus*) do Cerrado e da Mata Atlântica exibem diferenças na porção C-terminal o que influenciaria de forma importante a atividade biológica dos mesmos.

Além dos peptídeos isolados de *L. latrans* (*L. ocellatus*), espécie a qual possui mais peptídeos com propriedades antimicrobianas conhecidos até o presente momento, análogos das ocellatinas foram encontrados na secreção cutânea de outras espécies no gênero *Leptodactylus*.

Da espécie *L. fallax* foi isolada a fallaxina, com atividade inibitória sobre bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae* e *K. pneumoniae*), embora com baixa potência (MIC \geq 20 μ M) e inativa contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e o fungo *Candida albicans*. A fallaxina também possui baixa atividade hemolítica (HC₅₀ > 200 μ M) (Rollins-Smith *et al.*, 2005).

Em uma análise peptidômica da secreção cutânea de *L. validus* foram identificados três peptídeos com sequências estruturalmente similares às ocellatinas. Os peptídeos foram denominados ocellatina V1, ocellatina V2 e

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

ocellatina V3, os quais possuem baixa potência antimicrobiana provavelmente devido a falta de anfipaticidade e pouca cationicidade quando comparados às demais ocellatinas (King *et al.*, 2008).

A leptoglicina, um peptídeo rico em glicina e leucina (GLLGLLGPLLGGGGGGGGLL) foi isolada da espécie *L. pentadactylus*, mostrando-se ativa contra bactéria Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. freundii*) em baixas concentrações e inativa sobre bactérias Gram-positivas, fungos e eritrócitos humanos (Sousa *et al.*, 2009). Dessa mesma espécie, já era conhecida a pentadactilina, que demonstrou ter atividade contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*), bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *Streptococcus* do grupo B) com potências relativamente baixas (valores de MIC na faixa de 25 a 200 μ M), tendo também baixa atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos (King *et al.*, 2005).

Mais recentemente, o nosso grupo isolou a pentadactilina da secreção do anuro *L. labyrinthicus* e constatou que esse peptídeo é capaz de reduzir a viabilidade celular de células de melanona B16F10. Os estudos relacionados com seu mecanismo de ação sugerem que as células B16F10 morrem por apoptose, uma vez que a pentadactilina promove alterações morfológicas nas células, ruptura na membrana plasmática, fragmentação de DNA, parada do ciclo celular na fase S e alteração no potencial de membrana mitocondrial (Libério *et al.*, 2011).

A syphaxina (SPX), com 25 resíduos de aminoácidos, foi isolada de *Leptodactylus syphax*, assim como dois peptídeos truncados, SPX(1–22) e SPX(1–16). Os peptídeos truncados foram testados contra *E. coli* e *S. aureus* demonstrando atividade inibitória mesmo em baixas concentrações e com toxicidade desprezível sobre células sanguíneas humanas (Dourado *et al.*, 2007).

Além da presença dos peptídeos com atividade antimicrobiana, o gênero pode ser considerado um alvo interessante de estudos envolvendo o isolamento de peptídeos com outras propriedades terapêuticas. Um bom

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

exemplo disso é um estudo feito com peptídeos extraídos da secreção cutânea de *L. laticeps*, ricos em arginina e leucina, denominados plasticinas, análogos a peptídeos previamente isolados de phyllomedusídeos (Hylidae). Um peptídeo isolado dessa espécie, denominado plasticina-L1, e um peptídeo análogo das ocellatinas, denominado ocellatina L2, não demonstraram atividade antimicrobiana nos ensaios realizados, porém demonstraram serem capazes de aumentar a liberação de insulina em culturas de células pancreáticas de rato (Conlon *et al.*, 2009).

Tabela 1: Relação dos peptídeos antimicrobianos isolados das secreções cutâneas de espécies do gênero *Leptodactylus*.

| Espécie | Nome e estrutura primária do peptídeo | Referência |
|---|--|--|
| <i>Leptodactylus fallax</i> | Fallaxina: GVVDILKGAALKDIAGHLASKVMNKL | Rollins-Smith <i>et al.</i> 2005 |
| <i>Leptodactylus laticeps</i> | Laticeptina: GVVDILKGAALKDLAGHLATKVMNKL | Conlon <i>et al.</i> 2006 |
| <i>Leptodactylus ocellatus</i> | Ocellatina VVDILKGAGKDLLAHLVGKISEKV Ocellatina 2: GVLDIFKDAAKQILAHAAEQI Ocellatina 3: GVLDILKNAAKNILAHAAEQI Ocellatina 4: GLLDFVTGVGKDIFAQLIKQI Ocellatina 5: AVLDILKDVGKGLLSHFMEKV Ocellatina AVLDFIKAAGKGLVTNIMEKVG | 1: NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2004; Nascimento <i>et al.</i> , 2007; Leite Júnior <i>et al.</i> , 2010 6: |
| <i>Leptodactylus pentadactylus</i> | Pentadactilina: GLLDTLKGAALKNVVGSLSASKVMEKL Leptoglicina: GLLGLLGPLLGGGGGGGGLL | King <i>et al.</i> , 2005 Sousa <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Leptodactylus syphax</i> | Syphaxina: GVLDILKGAALKDLAGHVATKVINKI Syphaxina (1-22): GVLDILKGAALKDLAGHVATKVI Syphaxina (1-16): GVLDILKGAALKDLAGH | Dourado <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Leptodactylus validus</i> | OcellatinaV1: GVVDILKGAGKDLLAHALSKLSEKV OcellatinaV2: GVLDILKGAGKDLLAHALSKISEKV | King <i>et al.</i> , 2008 |

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

Ocelltina V3:
GVLDILTGAGKDLLAHALSKLSEKV

Peptídeos citolíticos estudados na secreção cutânea de L. labyrinthicus

Leptodactylus labyrinthicus (Spix, 1824) (Figura 1), espécie alvo do presente estudo, pertence à família Leptodactylidae, atualmente com mais de 200 espécies catalogadas (Frost, 2014), estando incluída no grupo pentadactylus. Trata-se de uma rã de grande porte conhecida popularmente como rã-pimenta, em virtude da abundância de histamina em sua secreção cutânea (Erspamer *et al.*, 1964). É generalista quanto à utilização de seu habitat e adapta-se facilmente aos ambientes com ocupação humana, poças temporárias, podendo ser encontrada nos Cerrados, Caatingas do Brasil central e no sudeste, costa da Venezuela, leste do Paraguai, Bolívia e norte da Argentina. O seu *status* de conservação é definido como de menor preocupação pela IUCN, apesar de ser uma espécie caçada para consumo humano (Heyer *et al.*, 2004, Frost, 2014).



Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

Figura 1: Espécime adulto de *Leptodactylus labyrinthicus*. Foto: Pedro H. Martins (imagem obtida do sítio <http://www.flickr.com/photos/pedrohmartins/9402817415/sizes/k/in/photostream/>).

Há até o momento dois estudos sobre os peptídeos encontrados na secreção cutânea de *L. labyrinthicus*. No primeiro, feito por Libério (2008) foram isolados dessa secreção dois peptídeos previamente descritos na literatura, a pentadactilina (King *et al.*, 2005) e a fallaxina (Rollins-Smith *et al.*, 2005) as quais se mostraram ativas contra bactérias Gram-negativas e contra células tumorais das linhagens HeLa, MCF-7 e B16F10, sendo pouco seletivos, já que apresentaram também toxicidade contra células de fibroblastos humanos saudáveis. Foi constatada também a presença da leptoglicina, um peptídeo rico em glicina e leucina que fora previamente descrito por Sousa *et al.* (2009).

No estudo desenvolvido por Prías-Márquez (2012) foi identificado um novo peptídeo, análogo da pentadactilina denominado G16OCP1, que se mostrou ativo contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas sem exibir toxicidade relevante sobre células sanguíneas. Tal peptídeo apresenta as características típicas de um peptídeo antimicrobiano, tais como amidação na porção C-terminal, propensão a formar estruturas em α -hélice quando em ambientes hidrofóbicos e carga líquida positiva.

Na tabela a seguir estão descritos os peptídeos estudados que foram encontrados na secreção cutânea de *L. labyrinthicus* e suas respectivas atividades biológicas.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

Tabela 2: Relação dos peptídeos isolados da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* e suas respectivas atividades biológicas.

| Nome | Estrutura Primária | Massa Molecular (Daltons) | Atividade Biológica | Referência |
|----------------|---|---------------------------|--|---|
| Pentadactilina | GLLDTLKGAAKNVVGSLASKVMEKL-NH ₂ | 2.540,5 Da | Atividade antitumoral sobre células tumorais humanas Atividade antimicrobiana Bactérias Gram-negativas: <i>Escherichia coli</i> (25 µM) <i>Enterobacter cloacae</i> (50 µM) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (100 µM) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (100 µM) Bactérias Gram-positivas: <i>B. subtilis</i> (2 µM) <i>Staphylococcus aureus</i> (200 µM) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (100 µM) <i>Enterococcus faecalis</i> (200 µM) <i>Streptococcus Group B</i> (50 µM) <i>P. mirabilis</i> (>200 µM) Fungos: <i>Candida albicans</i> (>200 µM) Atividade hemolítica muito baixa > 400 µM | King <i>et al.</i> , 2005; Libério 2008 |

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

| | | | | |
|-----------|--|------------|--|--|
| Fallaxina | GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL- NH ₂ | 2.546,5 Da | <p>Atividade antitumoral sobre células tumorais humanas</p> <p>Atividade antimicrobiana</p> <p>Bactérias Gram-negativas:</p> <p><i>Enterobacter cloacae</i> (20 µM)</p> <p><i>Escherichia coli</i> (40µM)</p> <p><i>Klebsiella pneumoniae</i> (80 µM)</p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> (80µM)</p> <p><i>P. mirabilis</i> (>160 µM)</p> <p>Bactérias Gram-positivas:</p> <p><i>B. subtilis</i> (16 µM)</p> <p>Inativa sobre <i>S.aureus</i></p> <p>Fungos:</p> <p>Inativa sobre <i>C. albicans</i></p> <p>Fraca atividade hemolítica</p> | Rollins-Smith <i>et al.</i> , 2005; Libério 2008 |
| G16OCP1 | GLLDTLKGAAKNVVGGGLASKVMEKL-NH ₂ | 2.510,5 Da | <p>Atividade antimicrobiana</p> <p>Bactérias Gram-negativas:</p> <p><i>Enterobacter cloacae</i> (>128 µM)</p> <p><i>Escherichia coli</i> (32 µM)</p> <p><i>Klebsiella pneumoniae</i> (32 µM)</p> <p>Inativo sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>Bactérias Gram-positivas:</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> (>128)</p> <p><i>Staphylococcus epidermidis</i> (128 µM)</p> <p>Inativo sobre <i>Enterococcus faecalis</i></p> <p>Sem atividade hemolítica</p> | Prías Márquez, 2012 |

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

| | | | | |
|--------------|----------------------|-------|--|--------------------|
| Leptoglicina | GLLGLLGPLLGGGGGGGGLL | 1.761 | Atividade antimicrobiana Bactérias Gram-negativas: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (8µM) <i>Escherichia coli</i> (50 µM) <i>Citrobacter freundii</i> (75 µM) Sem atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos Sem atividade hemolítica | Sousa et al., 2009 |
|--------------|----------------------|-------|--|--------------------|

Peptídeos citolíticos estudados na secreção cutânea de P. azurea

Phyllomedusa azurea (Cope, 1862) (Figura 2), também empregada no presente estudo, é uma espécie que atualmente pertence ao grupo *P. hyponchondrialis*, redefinido em 2006 por Ulisses Caramaschi. Por essa razão a busca pelos trabalhos disponíveis na literatura com essa espécie foi realizado também para o grupo *P. hyponchondrialis*. Trata-se de uma perereca arbícola de tamanho mediano, ocupando áreas de influência chaquenha (semelhantes ao Pantanal brasileiro) na Bolívia, norte da Argentina (Provincias Salta, leste de Jujuy, Formosa, Chaco, norte de Santiago del Estero, Santa Fe e Corrientes) e áreas de influência das regiões do Pantanal e Cerrados no Brasil Central (Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás, Distrito Federal e Minas Gerais) (Frost, 2014).

Leite et al. (2005) estudaram a secreção cutânea de *P. hypochondrialis* e *P. oreades* e identificaram seis peptídeos antimicrobianos que foram denominados phylloseptinas, peptídeos com cadeias primárias contendo entre 19 e 21 resíduos de aminoácidos, com porção N-terminal altamente conservada e amidação da porção C-terminal. A phylloseptina1 (PS-1) se mostrou ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em baixas concentrações, sem atividade hemolítica significativa. Nesse mesmo trabalho, foram identificados dois peptídeos com atividade antiparasitária contra formas epimastigotas de *T. cruzi* denominados PS-4 e PS-5.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

Em um trabalho realizado por Conceição *et al.* (2006), a phylloseptina PS-7 se mostrou ativa contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Utilizando técnicas de proteômica e genômica, Cheng *et al.* (2006) identificaram mais cinco phylloseptinas (PS-7, PS-8, PS-9, PS-10 E PS-11), sendo que Thompsom *et al.* (2007) identificaram mais quatro phylloseptinas (PS-12, PS-13, PS-14 e PS-15).

Estudos da atividade protozoaricida da phylloseptina 1 foram realizados por Kückelhaus *et al.* (2009) avaliando sua atividade contra *Leishmania amazonenses* e *Plasmodium falciparum*. O peptídeo se mostrou eficaz contra ambos os parasitas em baixas concentrações, com potência comparável a medicamentos conhecidos no mercado como antimoniato de n-metil-glucamina e artesunato, sem, no entanto exibir toxicidade contra células de mamíferos.



Figura 2: Espécime adulto de *Phyllomedusa azurea*. Foto: Gabriel Horta (imagem obtida do sítio <http://www.flickr.com/photos/gabrielhorta/4606985486/sizes/l/in/photostream/>).

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

Além das phylloseptinas, um outro grupo de PAMs encontrados em abundância na secreção cutânea de *P. azurea* é representado pelas dermaseptinas.

Brand *et al.* (2006) isolaram e caracterizaram seis novas dermaseptinas denominadas DShypo 01, 02, 03, 04, 06 e 07 de secreção de *P. hypochorialis*. Também relataram a ocorrência da DS 01, previamente descrita pelo mesmo grupo ao estudar a secreção cutânea de *Phyllomedusa oreades*. DShypo 01 foi testada contra *S. aureus* e *E. coli*, mostrando-se mais ativa contra *E. coli*. Também foi avaliada contra formas promastigotas de *L. amazonenses* e revelou-se eficiente contra esse protozoário.

As dermaseptinas H-4 e H-5 foram identificadas por Thompsom *et al.* (2007) e exibiram atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Conceição *et al.* (2006) isolaram uma dermaseptina denominada Dph-1 que foi testada contra *M. luteus*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* e se mostrou eficaz contra todas as bactérias testadas.

Recentemente, Xi *et al.* (2013) identificaram, na secreção de *P. hypochondrialis*, uma nova classe de peptídeos denominados medusinas os quais se mostraram ativos contra *S. aureus* e *C. albicans*.

Na tabela a seguir estão descritos os peptídeos estudados que foram encontrados na secreção cutânea de *P. azurea/P. hypochondrialis* e suas respectivas atividades biológicas.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

Tabela 3: Relação dos peptídeos isolados da secreção cutânea de *P. azurea* e suas respectivas atividades biológicas.

| Nome | Estrutura Primária | Massa Molecular (Daltons) | Atividade Biológica | Referência |
|-----------------|--|---------------------------|--|--|
| DPh-1 | GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL-NH ₂ | 2408.40 | Atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas | Conceição <i>et al.</i> , 2006 |
| DS-01 | GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL-NH ₂ | 2793.39 | Atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas. Gram-negativas, <i>T. cruzi</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i> | Brand <i>et al.</i> , 2002; Brand <i>et al.</i> , 2006; Zampa <i>et al.</i> , 2009 |
| DShypo 01 | GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL-NH ₂ | 2409.41 | Atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e <i>L. amazonensis</i> | Brand <i>et al.</i> , 2006 |
| Dermaseptina H4 | GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL-NH ₂ | 2408.40 | Atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas | Thompson <i>et al.</i> 2007 |
| Dermaseptina H5 | GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAVLGSL-NH ₂ | 2452.42 | Atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas e | Thompson <i>et al.</i> 2007 |

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

| | | | | |
|------------------|-------------------------------------|---------|--|---|
| | | | Gram-negativas | |
| Phylloseptina 1 | FLSLIPHAINAVSAIAKHN-NH ₂ | 2015.25 | Atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, <i>C. albicans</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>P. falciparum</i> | Leite <i>et al.</i> 2004; Kückelhau <i>et al.</i> 2009 |
| Phylloseptina 4 | FLSLIPHAINAVSTLVHHS-NH ₂ | 2112.18 | Atividade antimicrobiana sobre <i>T. cruzi</i> | Leite <i>et al.</i> 2004 |
| Phylloseptina 5 | FLSLIPHAINAVSAIAKHS-NH ₂ | 1988.15 | Atividade antimicrobiana sobre <i>T. cruzi</i> | Leite <i>et al.</i> 2004 |
| Phylloseptina 7 | FLSLIPHAINAVSAIAKHF-NH ₂ | 2047.21 | Atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas | Conceição <i>et al.</i> 2006; Thompson <i>et al.</i> 2007 |
| Phylloseptina 12 | FLSLLPSIVSGAVSLAKKL-NH ₂ | 1941.19 | Atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas | Thompson <i>et al.</i> 2007 |
| Medusin-PH | LLGMIPVAISALSALSKAL-NH ₂ | 1796.3 | Atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas e <i>C. albicans</i> | Xi <i>et al.</i> 2013 |

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

Candida albicans: aspectos biológicos, patogênicos e relevância clínica

Candida albicans é um fungo patogênico aos seres humanos e é hoje o mais bem estudado por ser o mais prevalente nas infecções fúngicas. A biologia de *C. albicans* apresenta diferentes aspectos, entre eles, a habilidade de se apresentar com distintas morfologias. *Candida spp* são fungos que crescem como leveduras e que são “imperfeitos”, o que significa que aparentemente falta um ciclo sexual completo, ainda, *C. albicans* e várias espécies de *Candida* relatadas claramente possuem potencial para se desenvolver de forma parassexual. Antes, pensava-se que eram diploides obrigatórios, mas hoje se sabe que também podem também formar hifas verdadeiras filamentosas em adição ao brotamento de leveduras e pseudo-hifas, que na verdade são leveduras alongadas, unidas entre si. A mudança na morfologia de fase leveduriforme para filamentosa pode ser induzida por uma variedade de fatores ambientais como variação de temperatura e pH. Essa flexibilidade morfológica também pode estar associada a uma possível virulência, levando a uma transição do estado comensal para patológico quando se leva em consideração sua relação com o hospedeiro (Barbedo, 2010; Berman, 2012).

Espécies desse gênero residem no organismo do ser humano como comensais, habitando membranas mucosas do corpo, como a cavidade oral e órgãos genitais, podem estar em áreas quentes e úmidas como as dobras da pele e nos dedos dos pés e fazem parte da microbiota normal do trato digestório de cerca de 80% dos indivíduos saudáveis. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização vaginal por *Candida*. Todavia, quando há uma ruptura no balanço normal da microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies do gênero *Candida* tendem a se tornarem patogênicas. Em hospitais, infecções fúngicas documentadas são causadas em cerca de 80% das vezes por fungos desse gênero sendo que em cerca de 42% desses casos, a espécie causadora é *C. albicans*. A infecção pode ser de origem endógena ou exógena, como nos casos de doenças sexualmente transmissíveis. Essas infecções envolvem um espectro amplo de

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

doenças superficiais e invasivas de caráter oportunista, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco tais como rompimento das barreiras cutâneas e mucosas (casos de queimaduras, ferimentos), disfunção de neutrófilos, defeito na imunidade mediada por células, desordens metabólicas, extremos de idade (recém-nascidos e idosos), desnutrição aguda, tratamentos quimioterápicos, desenvolvimento de resistência a antifúngicos. Infecções fúngicas invasivas têm tido um aumento significativo nos anos recentes, principalmente devido ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos, como por exemplo, aqueles que sofrem de HIV/AIDS; também ao aumento do número de pacientes transplantados, devido ao desenvolvimento e aprimoramento das técnicas de transplante de órgãos; pacientes de UTI's submetidos a intubação traqueal, uso de sondas e cateteres, técnicas endoscópicas e também o uso de extensivo de antibióticos de amplo espectro, imunossupressores e corticosteroides (Barbedo, 2010; Liu *et al.*, 2014).

Câncer: a importância de se investigar compostos com ação antitumoral na secreção de anuros

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2014).

O tratamento do câncer costuma envolver mais de uma estratégia, sendo a cirurgia o método mais empregado e de escolha para tumores sólidos localizados e também a radioterapia que geralmente é utilizada como adjuvante e/ou após a cirurgia; assim como a quimioterapia que pode ser o tratamento de escolha para os tumores generalizados ou também como tratamento adjuvante à cirurgia e/ou radioterapia. A maioria dos fármacos antineoplásicos são agentes antiproliferativos que interferem no ciclo celular, uma vez que as células tumorais multiplicam-se mais rapidamente que a maioria das normais.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

Comumente, quando se administra um fármaco antineoplásico, apenas uma pequena fração da dose reage com os sítios de ação. A maior parte é distribuída aos órgãos sadios, provocando-lhes toxicidade (Anchiêta Jr. , 2012).

Apesar da quimioterapia hoje ser um dos principais modos de tratar o câncer, sua efetividade é limitada pelo desenvolvimento de resistência pelas células tumorais. Essa resistência pode ser intrínseca, quando antes de receber a quimioterapia, existem fatores de mediação ou resistência da maioria das células, o que torna a quimioterapia ineficaz, ou adquirida que se desenvolve durante o tratamento de um tumor que inicialmente era sensível, cujas células podem sofrer mutações, bem como ter outras respostas adaptativas, como aumento da expressão do alvo terapêutico ou ativação de vias de sinalização alternativas *et al.*, 2013; Masui *et al.*, 2013).

Drogas antitumorais desenvolvidas a partir de recursos naturais são pesquisadas em todo o mundo. Venenos de animais e toxinas são recursos potentes e ferramentas terapêuticas conhecidas pelo homem há séculos através dos conhecimentos popular e tradicional. O uso da secreção cutânea e pele de anfíbios tem sido documentado em várias culturas e folclores em várias regiões do planeta. O conhecimento tradicional tem sido envolvido no conceito de que a pele dos anfíbios pode ser um tesouro de compostos biologicamente ativos. Buscas por secreções tóxicas ou nocivas e a presença de aminas biogênicas, peptídeos, bufadienólídeos, tetrodotoxinas, alcaloides lipofílicos foram descritas há alguns anos. Desde então, investigações têm sido feitas, adicionando centenas de compostos a essa lista de substâncias ativas isoladas da pele de anfíbios (Sciani *et al.*, 2013).

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

JUSTIFICATIVA

Atualmente existe uma necessidade muito grande de identificação de novos compostos com atividade citolítica, pois tem sido crescente o aparecimento de linhagens de microrganismos com resistência ampla aos antibióticos. Nos últimos anos, o uso abusivo de antimicrobianos tem incrementado o número e os tipos de microrganismos resistentes, em consequência, muitas enfermidades infecciosas podem se tornar incontroláveis. Ao passo que acontece a perda da eficácia dos antimicrobianos conhecidos, há uma redução no desenvolvimento de novos antimicrobianos, o tempo estimado de pesquisa e desenvolvimento de um novo medicamento é de 10 a 20 anos e se seguirmos essa tendência, o arsenal terapêutico contra os microrganismos resistentes se esgotarão em pouco tempo (WHO, 2012).

O desenvolvimento de resistência farmacológica não é um problema apenas dos antimicrobianos. Os medicamentos que temos hoje para o tratamento de tumores malignos ainda causam muitos efeitos deletérios a células saudáveis, além de haver também um alto índice de refratariedade de alguns tipos de células tumorais a vários tratamentos. O câncer é hoje a segunda maior causa de morte no mundo e no Brasil, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Somente no Brasil estima-se que pelo menos 3.459.552 pessoas tenham morrido entre 1979 e 2011 vítimas de neoplasias (INCA, 2014).

As pesquisas com secreção cutânea de anuros têm revelado diversos compostos bioativos com potencial terapêutico promissor, provando que esse é um material riquíssimo em moléculas de interesse para a pesquisa e produção de novos medicamentos, dentre as quais os peptídeos antimicrobianos têm despertado grande interesse, devido às suas características estruturais e mecanismos de ação, que tende a torná-los mais seletivos contra células de microrganismos (Prates, 1999; Rodrigues *et al.*, 2009).

Através de mecanismos muito semelhantes aos que os tornam ativos contra microrganismos, esses peptídeos também podem exercer ação citolítica/citotóxica contra células tumorais, já que elas têm uma importante

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

característica em comum com células microbianas, que é a carga líquida negativa em suas membranas devido a maior expressão de fosfatidilserinas e mucinas o-glicosiladas, diferente de células normais que tendem a ter carga neutra em sua superfície. Esses peptídeos costumam interagir com células tumorais com alta afinidade e especificidade, o que os torna menos tóxicos se comparados aos quimioterápicos, além do mais, seu mecanismo de ação é diferente, enquanto quimioterápicos em sua maioria atuam interferindo no ciclo celular, peptídeos antitumorais costumam levar essas células a processos apoptóticos ou necróticos, não possuindo atividade genotóxica e podendo atuar de forma sinérgica aos quimioterápicos convencionais (Bhutia & Maiti, 2008; Hoskin & Ramamoorthy, 2008; Libério *et al.*, 2011; Riedl *et al.*, 2011).

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

OBJETIVO GERAL

Identificar, purificar e caracterizar química e biologicamente peptídeos antimicrobianos inéditos presentes nas secreções cutâneas dos anuros *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*. Aliado a isso, avaliar os efeitos citotóxicos sobre células tumorais das secreções brutas de *L. labyrinthicus* e *P. azurea*.

METAS ESTABELECIDAS

- ✓ Coletar indivíduos das espécies *L. labyrinthicus* e *P. azurea* e obter suas secreções cutâneas por meio de estimulação elétrica moderada;
- ✓ Fracionar as secreções cutâneas liofilizadas de *L. labyrinthicus* e *P. azurea* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna de fase reversa C₁₈;
- ✓ Avaliar os efeitos inibitórios das frações cromatográficas resultantes do fracionamento secreções cutâneas liofilizadas de *L. labyrinthicus* e *P. azurea* por RP-HPLC sobre fungo patogênico *Candida albicans*;
- ✓ Analisar, por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, as frações cromatográficas que exibiram atividade inibitória sobre o crescimento de *C. albicans* relevante de modo a determinar seu grau de homogeneidade, bem como as massas moleculares dos componentes presentes;
- ✓ Obter, em alto grau de pureza e em quantidade suficiente para permitir sua caracterização química e biológica, os peptídeos antifúngicos identificados no presente trabalho, mediante recromatografia em coluna de fase reversa C₁₈;
- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima (MIC) dos peptídeos PaF31-1-(7) e Pa F36-1-(10) isolados a partir da secreção cutânea do anuro *P. azurea*, sobre o fungo patogênico *Candida albicans*.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

- ✓ Avaliar os efeitos citotóxicos sobre células tumorais humanas das secreções brutas de *L. labyrinthicus* e *P. azurea*, assim como determinar seus valores de IC₅₀ sobre as células utilizadas;
- ✓ Investigar os possíveis mecanismos de citotoxicidade empregando citometria de fluxo.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

MATERIAIS E MÉTODOS

REAGENTES QUÍMICOS

Todos os experimentos foram realizados com reagentes comerciais de grau analítico utilizando apenas água Mili-Q (Milipore Reagent Water System, USA) para o preparo das soluções. Os solventes utilizados nas etapas foram todos grau HPLC de diversos fornecedores.

COLETA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS SECREÇÕES CUTÂNEAS

Um total de 32 espécimes adultos de *Phyllomedusa azurea* e 5 espécimes adultos de *Leptodactylus labyrinthicus* 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 sob a licença de coleta no. 17682-1 (MMA/ICMBio/SISBIO). 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.

FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DAS SECREÇÕES BRUTAS DE *L. labyrinthicus* e *P. azurea*

Alíquotas de 3 mg para a secreção de *P. azurea* e 10 mg para a secreção de *L. labyrinthicus* foram diluídas em 200 µL de uma solução de TFA 0,12% (v/v) em água Milli-Q (solvente A) e submetidas a centrifugação para separar o sobrenadante da parte insolúvel. O sobrenadante recolhido foi submetido a fracionamento em coluna de fase reversa C₁₈ (coluna semi-preparativa Vydac, 238TP1010, 10 x 250 mm, fluxo de 1,5 mL/min. Para secreção de *L. labyrinthicus* e coluna analítica Phenomenex Synergi 4µ Fusion-RP 80Å, 4,6 x 250 mm mm, fluxo de 1 mL/min para secreção de *P. azurea*) previamente equilibrada com solvente A. A eluição foi realizada aplicando-se um gradiente linear de TFA 0,12% (v/v) em acetonitrila (solvente B), elevando-se a concentração de acetonitrila de 0 a 60% em 60 minutos. As frações eluídas

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

correspondentes aos picos no cromatograma foram monitoradas por absorvância UV em 216 nm, sendo coletadas manualmente, secadas a vácuo e armazenadas a -20°C. As frações de interesse detectadas no ensaio antimicrobiano preliminar foram recromatografadas em coluna Phenomenex Synergi 4 μ Fusion-RP 80Å, 4,6 x 250 mm, com fluxo de 1 mL/min, equilibrada em solvente A e monitorada em detecção UV a 216 nm. A eluição foi realizada aplicando-se gradiente linear de acetonitrila. As frações cromatográficas foram coletadas, secadas a vácuo e armazenadas a -20°C para posterior utilização.

ENSAIO DE VARREDURA PARA IDENTIFICAR AS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS CAPAZES DE INIBIR O CRESCIMENTO DO FUNGO PATOGÊNICO *Candida albicans*

A cepa ATCC 14053 do fungo *Candida albicans* foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Micologia do LACEN/DF. O fungo foi cultivado em Ágar Sabouraud dextrose sendo executadas passagens (repiques) para assegurar sua pureza e viabilidade. Após 24 horas de incubação a 37°C, foi feito o inóculo de colônias frascas em 5 mL de meio BHI, sob agitação, a 37°C. Quando a densidade ótica em 595 nm atingiu o valor de 1.0, a suspensão fúngica inicial foi diluída em meio BHI fresco, na proporção de 1:100. As frações cromatográficas provenientes de uma corrida cromatográfica foram solubilizadas em 120 μ L de água Milli-Q estéril e 50 μ L de cada amostra foi incubada com 50 μ L da suspensão fúngica.

Como controle representativo da ausência de proliferação do fungo, foi realizada a incubação da suspensão fúngica com formaldeído 0,4% (v/v) e; como controle representativo da proliferação máxima, foi feita a incubação da suspensão fúngica com água Milli-Q estéril.

Após a incubação por um período de 20 a 24 horas, a 37°C, as placas foram analisadas a 595 nm em leitora de microplacas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, USA).

O ensaio de varredura (*screening*) foi realizado com o fungo *C. albicans* a fim de se verificar quais componentes da secreção cutânea de *L. labyrinthicus*

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

e *P. azurea* apresentam atividade inibitória sobre a proliferação fúngica. Cada fração cromatográfica de uma corrida de RP-HPLC foi solubilizada em água Milli-Q e incubada com a suspensão fúngica a fim de obter-se o perfil de inibição sobre o crescimento de *C. albicans*.

ENSAIO DE VARREDURA PARA IDENTIFICAR AS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS CAPAZES DE INIBIR O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

As linhagens referenciais de *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923 foram obtidas do banco de culturas da Fundação André Tosello (Campinas/SP). O inóculo de colônias congelado foi misturado a 5 mL de meio Mueller-Hinton e incubado sob agitação, a 37°C, durante a noite. Quando a densidade ótica em 595 nm atingiu o valor de 1.0, as suspensões bacterianas foram diluídas em meio meio Mueller-Hinton nas proporções de 1:100 para *S. aureus* e 1:50 para *E. coli*. As frações cromatográficas provenientes de uma corrida cromatográfica foram solubilizadas em 120 µL de água Milli-Q estéril e 50 µL de cada amostra foi incubada com 50 µL da suspensão bacteriana.

Como controle representativo da ausência de proliferação da bactéria, foi realizada a incubação da suspensão bacteriana com formaldeído 0,4% (v/v) e; como controle representativo da proliferação máxima, foi feita a incubação da suspensão bacteriana com água Milli-Q estéril.

Após a incubação por um período de 20 a 24 horas, a 37°C, as placas foram analisadas a 595 nm em leitora de microplacas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, USA).

ANÁLISES POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS

As frações cromatográficas que apresentaram atividade anti-*Candida* no ensaio de varredura foram analisadas em um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF modelo Autoflex II (Bruker, Rheinstten, Alemanha) de modo a se determinar a massa molecular dos componentes presentes e o grau de homogeneidade das amostras analisadas. As frações foram dissolvidas em

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q e 1 µL de cada fração foi aplicada em placa de aço inoxidável juntamente com 1 µL da matriz reconstituída de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 20 µg/µL). As análises foram realizadas com as frações no modo refletor de íons positivos tendo sido utilizada a solução Peptide Mix (Brucker Daltonics) para calibração, sendo a faixa analisada de 500 a 5000 Da. As frações bioativas recromatografadas foram submetidas ao mesmo procedimento descrito acima para a verificação do seu grau de homogeneidade antes da realização dos ensaios de atividade biológica.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC)

A cepa ATCC 14053 do fungo *Candida albicans* foram inoculadas em 5 mL de meio BHI fresco sob agitação contínua a 37° C até atingir densidade óptica igual a 1 em 595 nm. As leveduras em fase logarítmica foram diluídas no mesmo meio de cultura na proporção de 1:100 (contendo aproximadamente 2×10^3 UFCs). Foram pipetados 50 µL da suspensão fúngica em placas de microtitulação estéreis de 96 poços previamente preenchidos com 50 µL dos peptídeos a serem testados, diluídos de forma seriada em água Milli-Q estéril, partindo de uma concentração inicial de 128 µM até 4 µM atingindo dessa forma um volume final de 100 microlitros em cada poço. Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram respectivamente 50 µL de formaldeído 0,4% (v/v) e 50 µL de água Milli-Q estéril, ambos incubados com 50 µL de suspensão de leveduras. As placas foram levadas à estufa a 37° C onde permaneceram por 23 horas. Foi feita então a leitura espectrofotométrica em leitora de microplacas (Multiskan FC® Thermo Scientific, USA) com leitura de absorbância em 595 nm a fim de se verificar o crescimento fúngico em cada poço. A concentração inibitória mínima (CIM) para cada peptídeo foi assumida como sendo a menor concentração onde não houve crescimento detectável espectrofotometricamente.

ENSAIO ANTITUMORAL – Teste de viabilidade celular (MTT)

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

Foram utilizadas as linhagens de células tumorais Hela (derivada de câncer cervical, humana) e B16F10 (modelo murinho de melanoma). Como modelo de células saudáveis foram utilizadas linhagens de células NIH3T3 (células embrionárias de camundongo) para realização de ensaios antitumorais com as secreções brutas de *L. labyrinthicus* e *P. azurea*. Alíquotas de células de câncer e fibroblastos foram removidas de um estoque em nitrogênio líquido e descongeladas rapidamente a 37°C. Alíquotas de 500 µL foram lentamente adicionados 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). Em seguida, as células foram centrifugadas a 1000 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 1 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 re-cultivadas em uma densidade menor seguindo o procedimento descrito a seguir. O meio de cultura foi descartado e 2 mL de solução de tripsina-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 1000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em meio de cultura. Aproximadamente, 10% das células foram re-cultivadas em frascos de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ e o restante utilizada para fazer estoque criogênico. Ao atingir o estágio de confluência, as células de câncer ou fibroblastos normais foram removidas do frasco de cultura e centrifugadas

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

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, 10 μ L da suspensão de células foi adicionado a 40 μ L de solução de azul tripan (0,4% diluídos em PBS, p/v). Uma alíquota de 8 μ L 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:

$$\text{Número de células/mL} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Numero de quadrantes contados (=4)}} \times \text{fator de diluição (=5)} \times 10^4$$

As células contadas foram transferidas para placas de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 12 a 16 horas para a completa adesão das células no fundo da placa. As células foram transferidas para placas de 96 poços em triplicata para ensaios de viabilidade celular por MTT (ver descrição abaixo) com concentração inicial de 5 x 10³ células/poço. O meio de cultura contendo as secreções brutas de interesse foi preparado a partir da diluição seriada de soluções das secreções brutas centrifugadas em meio de cultura. As doses utilizadas nos experimentos variaram a partir de 500 μ g/mL a 3,9 μ g/mL para o primeiro ensaio de viabilidade celular com MTT; e para o segundo ensaio de viabilidade celular com MTT utilizou-se a dose calculada para o IC₅₀. O meio de cultura do grupo controle (ausência da secreção) continha apenas água Milli-Q estéril na mesma proporção que foi adicionada aos outros grupos experimentais. O meio de cultura das placas foi substituído pelo que continha os peptídeos. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação, o meio de cultura contendo a secreção bruta foi substituído por 150 μ L de um novo meio de cultura contendo MTT (15 μ L de MTT 5 mg/mL diluídos em 135 μ L de meio DMEM) e as placas foram incubadas novamente nas mesmas condições acima por 3 horas. Após esse período, as placas foram retiradas da estufa, o meio de cultura descartado, preservando-se as células com o MTT, foram então adicionados 100 μ L de DMSO e a leitura da placa foi feita a 595 nm em

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

espectrofotômetro conjugado a uma leitora de microplacas (Multiskan FC® Thermo Scientific, USA). A concentração inibitória 50% (IC₅₀) representa a concentração em que a viabilidade celular foi reduzida em 50% e foi calculada utilizando-se o software *Graph Pad Prism 5*.

ANÁLISES POR CITOMETRIA DE FLUXO

AValiação DOS EFEITOS SOBRE A FRAGMENTAÇÃO DE DNA

A determinação da fragmentação de DNA foi realizada de acordo com protocolo já descrito (PERES *et al.*, 2005). Após o tratamento com a secreção bruta de *L. labyrinthicus* na concentração de 4,216 µg/mL, células Hela foram ressuspensas em 100 µL de meio de cultura foram incubadas em 200 µL de tampão de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% Triton X-100 e 20 µg/mL de iodeto de propídio diluído em PBS, pH 7,4) por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram protegidas da luz durante o tempo de incubação. Em seguida, essa suspensão foi avaliada em citômetro de fluxo no canal FL2-H (sensível a detecções na faixa de 560 e 580 nm). Os dados obtidos foram analisados no programa *CellQuest 3.0.1* (Becton & Dickinson, EUA).

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE O CICLO CELULAR

A identificação das fases do ciclo celular foi realizada de acordo com protocolo descrito por Peres e Curi (2005). Após o tratamento com a secreção bruta de *L. labyrinthicus* na concentração de 4,216 µg/mL, células Hela foram ressuspensas em 100 µL de meio de cultura DMEM foram incubadas em 200 µL de tampão de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% Triton X-100 e 20 µg/mL de iodeto de propídio diluído em PBS, pH 7,4) por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram protegidas da luz durante o tempo de incubação. Em seguida, essa suspensão foi avaliada em citômetro de fluxo no canal FL2-A (sensível a detecções na faixa de 560 e 580 nm) para a identificação das fases do ciclo celular. Os dados obtidos foram analisados com o programa *CellQuest 3.0.1* (Becton & Dickinson, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A etapa inicial do trabalho consistiu no fracionamento das secreções brutas de *L. labyrinthicus* e *P. azurea* por RP-HPLC e a identificação das frações cromatográficas capazes de inibir a proliferação do fungo *C. albicans*.

As secreções cutâneas de ambas as espécies apresentaram, em geral, um padrão cromatográfico complexo com a eluição de uma média de 50 frações para *L. labyrinthicus* (Figura 3) e 40 frações no caso de *P. azurea* (Figura 4), perfis compatíveis com os obtidos por pesquisadores que já trabalharam com o fracionamento dessas mesmas secreções (Brand *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2007; Libério *et al.*, 2011).

A identificação das frações capazes de inibir a proliferação do fungo patogênico *C. albicans* e das bactérias *E. coli* e *S. aureus* foi realizada empregando-se ensaio em meio líquido em placas de microtitulação e permitiu a identificação de duas frações ativas na secreção cutânea de *L. labyrinthicus* contra *E. coli* com tempo de retenção igual a 50 minutos e 54 minutos (Figura 3), sendo que essas duas frações também mostraram-se capazes de inibir a proliferação de *C. albicans* e ainda um amplo leque de frações ativas contra *E. coli* e *S. aureus* na secreção cutânea de *P. azurea*, com tais frações ativas eluindo com tempos de retenção que variaram entre 36 e 54 minutos (Figura 4). Com relação à capacidade de inibir a proliferação do fungo *C. albicans*, duas dessas frações mostraram-se ativas (Figura 4).

Optou-se por dar continuidade ao trabalho concentrando-se no isolamento e caracterização dos peptídeos que exibiram atividade inibitória sobre a proliferação de *C. albicans*, visto que a maioria dos estudos realizados com essas mesmas espécies de anuros tiveram maior enfoque em peptídeos com atividade antibacteriana (Leite *et al.*, 2005; Brand *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2007; Libério *et al.*, 2011; Xi *et al.*, 2013).

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

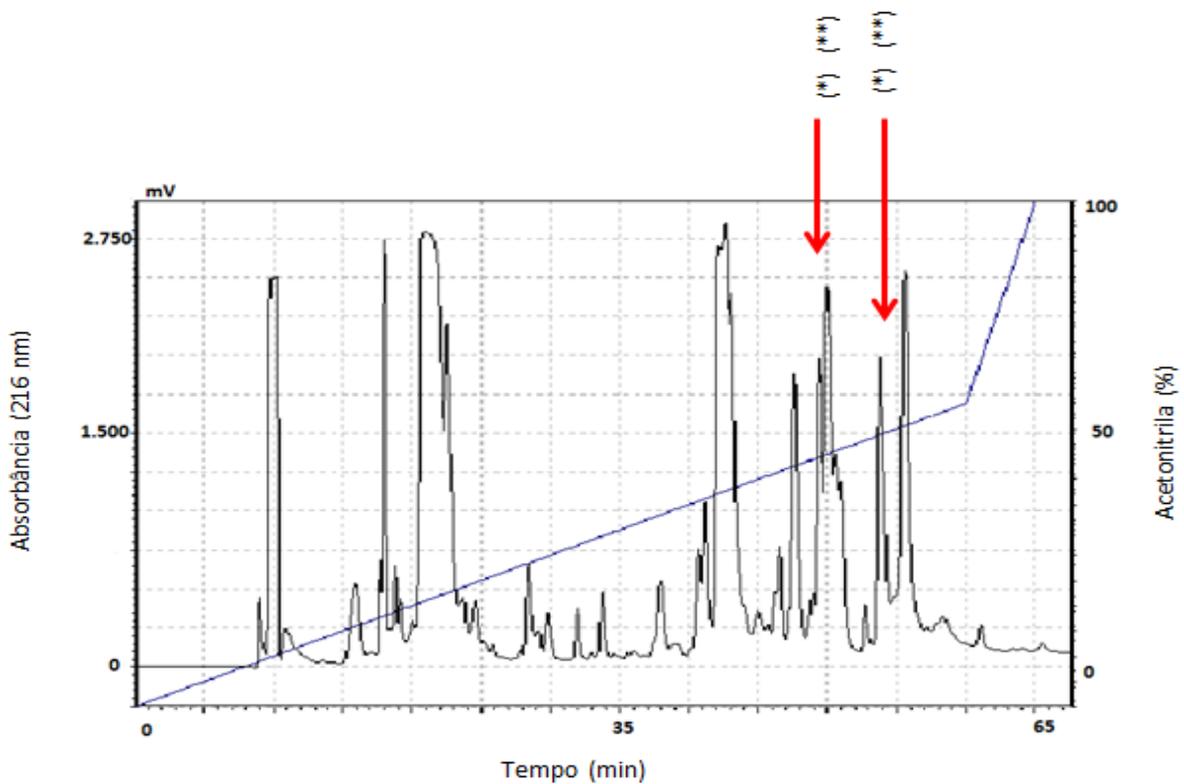


Figura 3: Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *L. labyrinthicus*. As frações indicadas por (*) foram ativas contra *E. coli* e as frações indicadas por (**) foram ativas contra *C. albicans*.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

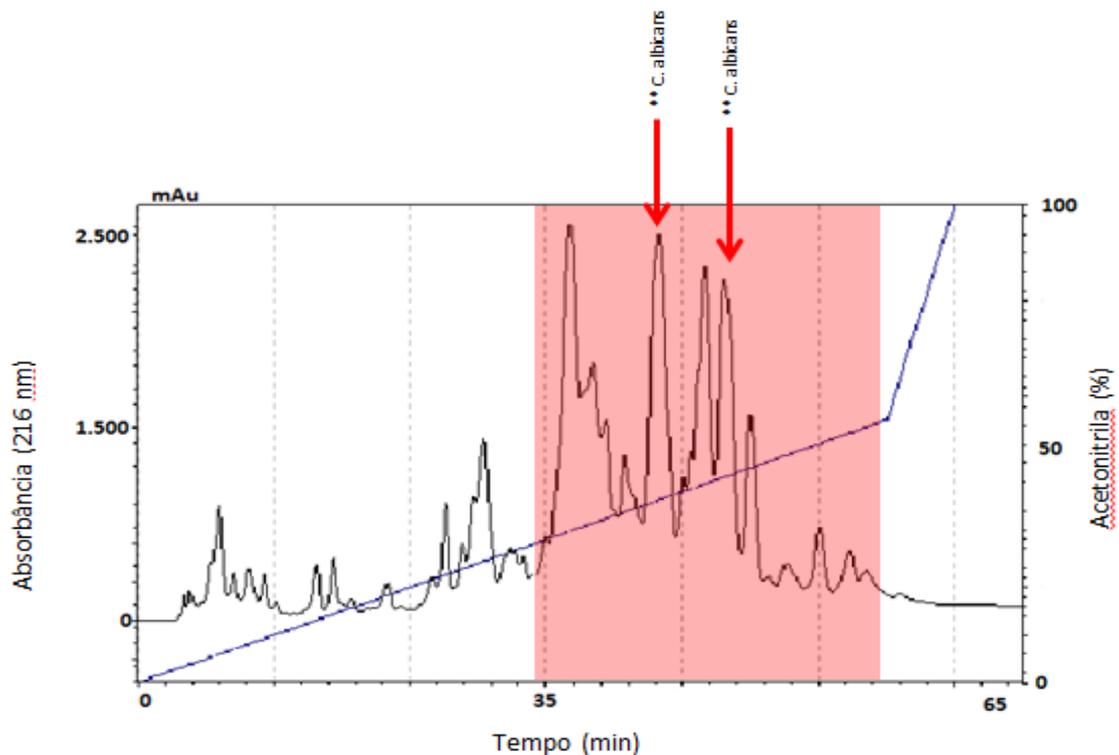


Figura 4: Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *P. azurea*. As frações que se encontram dentro do intervalo destacado em vermelho tiveram atividade contra *S. aureus* e *E. coli*. As frações indicadas pelas setas tiveram também atividade contra *C. albicans* (**).

No caso da secreção cutânea de *L. labyrinthicus*, existem realizadas duas dissertações de mestrado desenvolvidas por alunos vinculados ao nosso grupo, Libério, 2008 e Prías Márquez, 2012, nos quais foram identificados três peptídeos com atividade sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Dois desses peptídeos correspondem aos peptídeos pentadactilina e fallaxina, previamente isolados das espécies *L. pentadactylus* e *L. fallax*, respectivamente (King *et al.*, 2005; Rollins-Smith *et al.*, 2005).

Já para a secreção cutânea de *P. azurea*, podem ser encontrados diversos trabalhos na literatura relatando o isolamento e a caracterização biológica de vários peptídeos, sendo que a grande maioria deles mostrou-se ativa contra bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, e alguns deles também exibiram atividade inibitória contra protozoários (*L. amazonenses*, *L. chagasi*, *P. falciparum* e *T. cruzi*) demonstrando tratar-se de

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

uma secreção rica em componentes bioativos (Brand *et al.*, 2002; Brand *et al.* 2006; Leite *et al.*, 2005; Conceição *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2007; Kückelhaus *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2010). Cabe ressaltar que em apenas dois estudos a atividade antifúngica contra *C. albicans* foi avaliada. Zhang *et al.* (2010) identificaram um peptídeo denominado filosseptina 1 que apresentou MIC igual a 100 μ M. Em um trabalho mais recente, Xi *et al.* (2013) identificaram uma nova classe de peptídeos denominados medusinas, dentre os quais a medusina-PH se mostrou ativa contra *C. albicans* com MIC igual a 128 μ M.

As frações nas quais foi detectada atividade inibitória sobre o crescimento de *C. albicans* foram analisadas quanto ao seu grau de homogeneidade, bem como para a determinação das massas moleculares dos componentes presente em cada fração empregando-se espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Para efeito de identificação, as frações ativas de *L. labyrinthicus* foram denominadas de acordo com a ordem na qual eluíram da coluna de fase reversa, L.lab.F31(RT50) e L.lab.F35 (RT54). Seguindo a mesma lógica, as frações ativas de *P. azurea* foram denominadas *P. azurea* F31 (RT38) e *P. azurea* F36 (RT42). Os espectros de massa obtidos revelaram que todas as frações encontram-se impuras, com a presença de vários componentes, demonstrando ser necessária uma nova etapa cromatográfica de modo a obter os componentes purificados.

Tendo sido verificado pelas análises por espectrometria de massas que as frações ativas não se encontravam puras, tais amostras foram submetidas à recromatografia. Várias corridas cromatográficas envolvendo o fracionamento das secreções brutas de *L. labyrinthicus* e *P. azurea* foram realizadas e as frações correspondentes às frações bioativas foram reunidas antes de serem submetidas à recromatografia, de modo a permitir a obtenção de material em quantidade suficiente para a sua caracterização química e biológica.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

A figura 5 representa o perfil da recromatografia da fração identificada como *L. labyrinthicus* F31 (RT50). Pela análise do perfil cromatográfico obtido pode ser constatado que um menor grau de contaminação dessa amostra com a eluição de uma fração principal após 10 min do início da corrida cromatográfica (Figura 5).

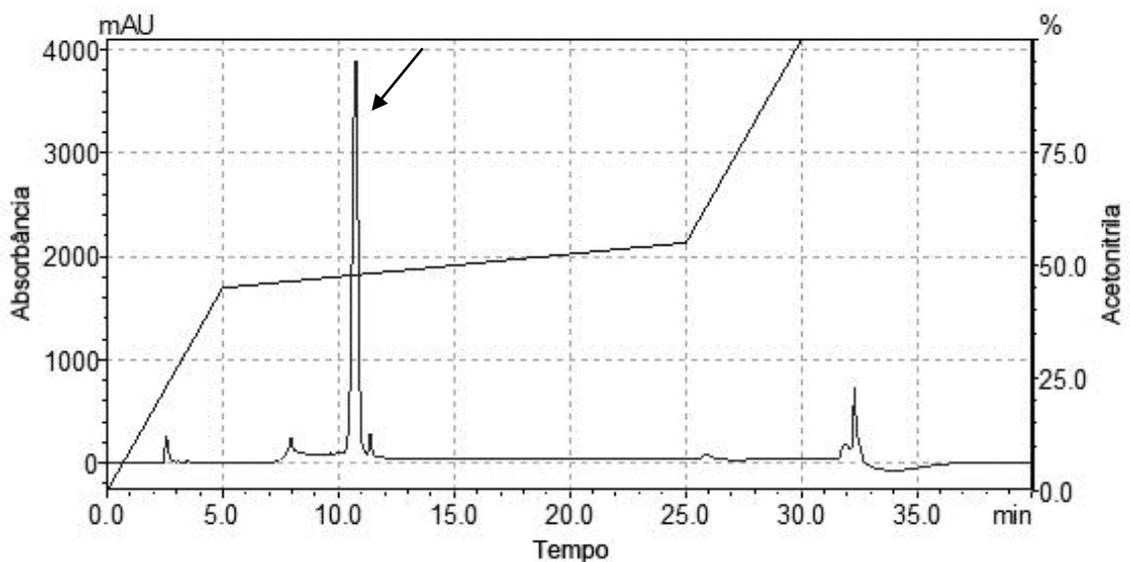


Figura 5: Perfil cromatográfico típico da recromatografia da fração *L. labyrinthicus* F31(RT50,1). A fração indicada pela seta apresentou-se mais homogênea na análise por MALDI MS e foi denominada LIF31-4(F10).

Tal fração, denominada LIF31-4(F10), após análise por MALDI-MS, infelizmente ainda se apresentou inadequada para o avanço da sua caracterização biológica por meio da avaliação dos efeitos inibitórios sobre a proliferação de *C. albicans*, uma vez que foi constatado um alto grau de contaminantes presentes nessa fração.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

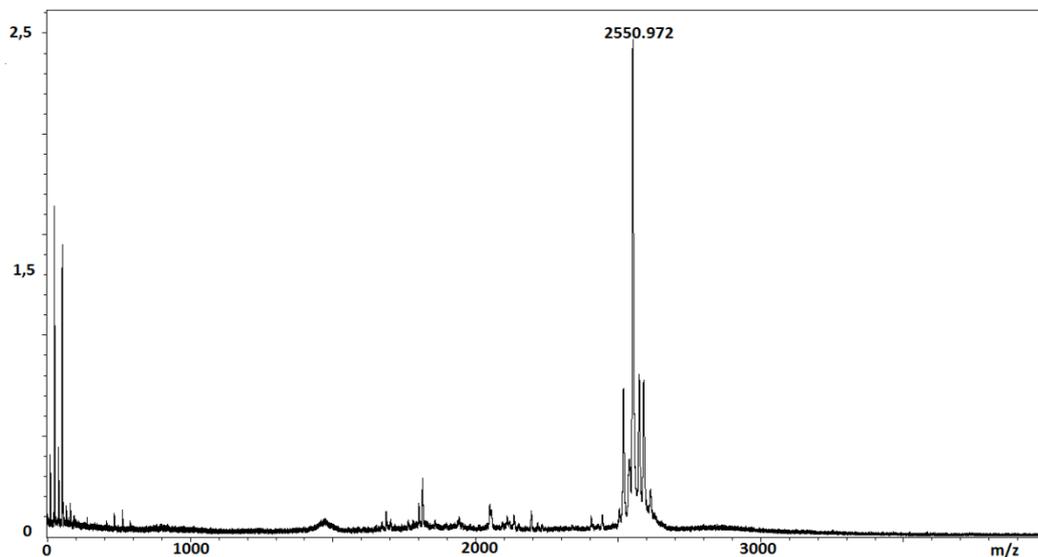


Figura 6: Espectro de massas da fração LIF31-4(F10), podendo ser observado um componente majoritário com massa molecular protonada igual a 2550,97 Da.

A figura 7 exibe o perfil cromatográfico obtido com a recromatografia da fração de *P. azurea* F31(RT38,26). Como pode ser observado, tal amostra encontrava-se bastante contaminada e todas as frações eluídas durante o procedimento de recromatografia foram analisadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF.

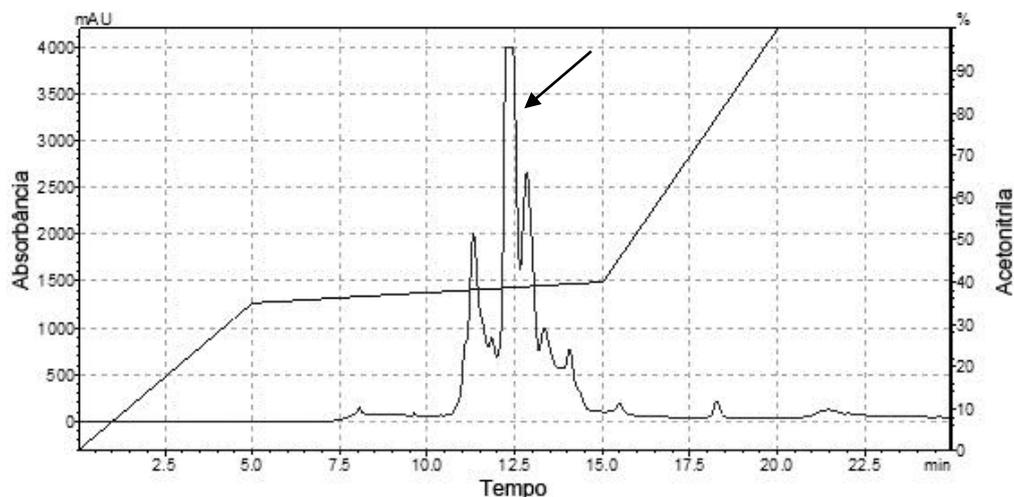


Figura 7: Perfil cromatográfico típico da recromatografia da fração *P. azurea* F31(RT38,26). A fração indicada pela seta apresentou-se mais homogênea na análise por MALDI MS e foi denominada PaF31-7(F12), tendo sido avaliada quanto aos seus efeitos inibitórios sobre a proliferação de *C. albicans*.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

A figura 8 representa o espectro de massa obtido com a análise da fração eluída após 12 min do início da corrida cromatográfica (fração indicada por uma seta na figura 7). Pode-se observar claramente que tal fração, nomeada PaF31-7(RT12), encontra-se bem mais homogênea com a presença predominante de um componente com massa molecular protonada igual a 2960,816 Da.

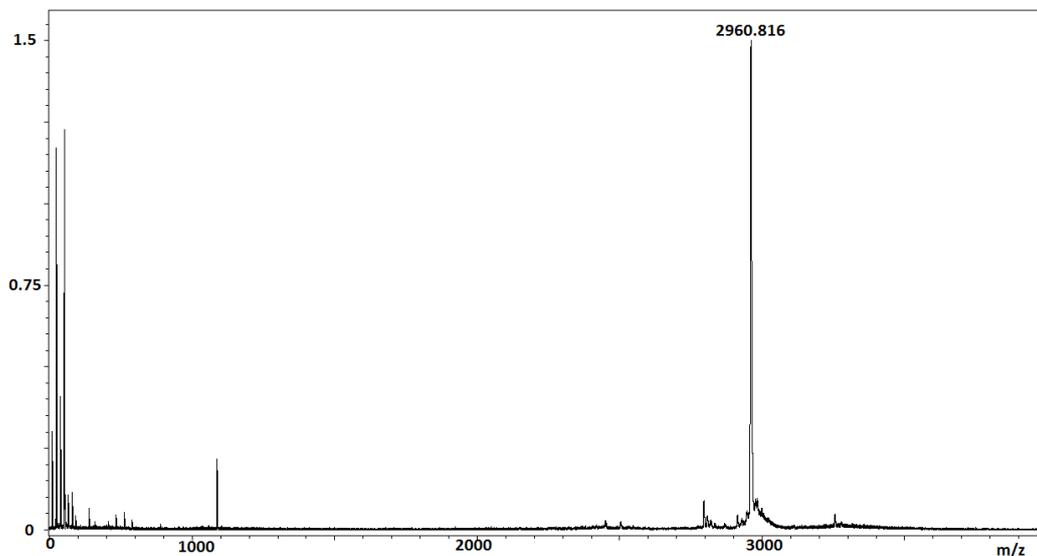


Figura 8: Espectro de massas da fração PaF31-7(F12), podendo ser observado um componente majoritário com massa molecular protonada igual a 2960,81 Da.

O mesmo procedimento foi adotado com a fração de *P. azurea* F36(RT41,67), podendo-se observar também para essa fração a presença de diversos contaminantes no perfil cromatográfico resultante (Figura 9).

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

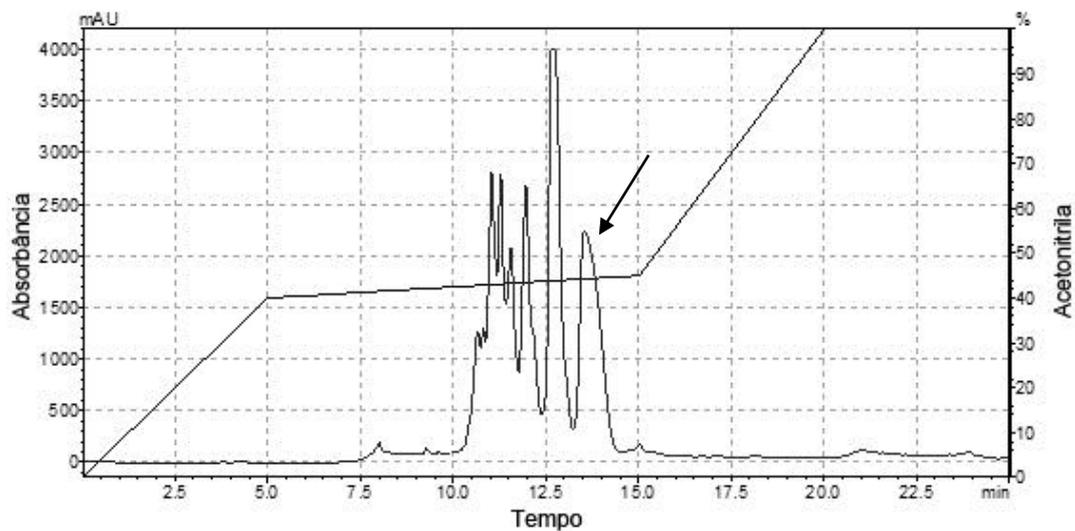


Figura 9: Perfil cromatográfico típico da recromatografia da fração *P. azurea* F36(RT41,67). A fração indicada pela seta apresentou-se mais homogênea na análise por MALDI MS e foi denominada PaF36-10(F13), tendo sido avaliada quanto aos seus efeitos inibitórios sobre a proliferação de *C. albicans*.

A análise por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF permitiu constatar que a fração eluída aos 13,5 min após o início da corrida cromatográfica apresentou-se mais homogênea com um componente principal com massa molecular protonada igual a 2050,82 Da (Figura 10).

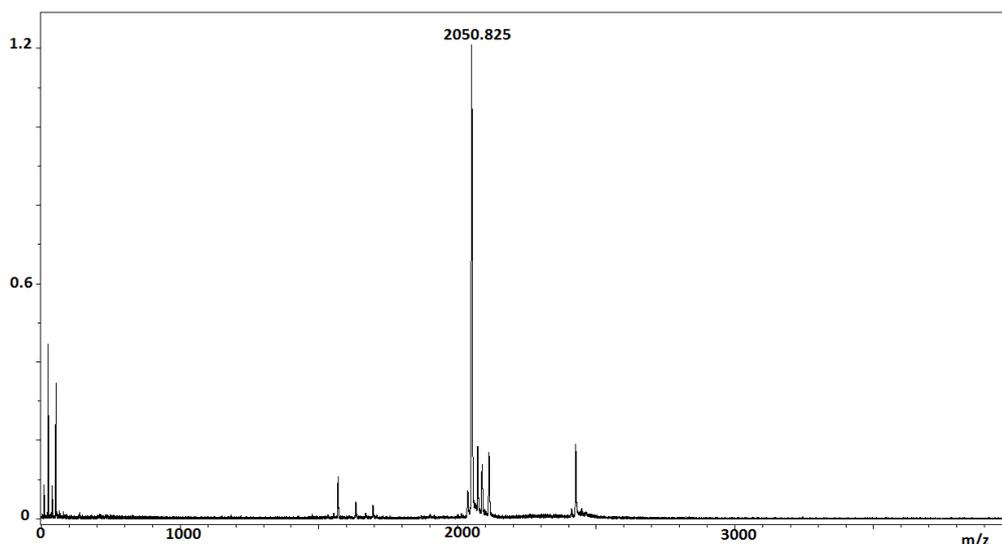


Figura 10: Espectro de massas da fração PaF36-10(F13), podendo ser observado um componente majoritário com massa molecular protonada igual a 2050,82 Da.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

As frações denominadas PaF31-7(F12) e PaF36-10(F13), por apresentarem mais homogêneas nas análises por MALDI-MS foram selecionadas e acumuladas em quantidade suficiente para a determinação dos seus efeitos sobre a proliferação celular do fungo patogênico *C. albicans*.

Após incubação de diferentes concentrações frações denominadas PaF31-7(F12) (Figura 11) e PaF36-10(F13) (Figura 12) com uma suspensão de *C. albicans* não foi possível a determinação dos seus MICs frente a esse patógeno, uma vez que foi observada apenas inibição parcial (de 47 e 51%, respectivamente) na concentração mais alta empregada (128 μ M), evidenciando a susceptibilidade de *C. albicans* frente a essas frações. No entanto, tais efeitos podem ser considerados fracos, uma vez que existem vários PAMs isolados das secreções cutâneas de anuros com atividade anti-*Candida* com MICs entre 4-12 μ M (Li *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2013).

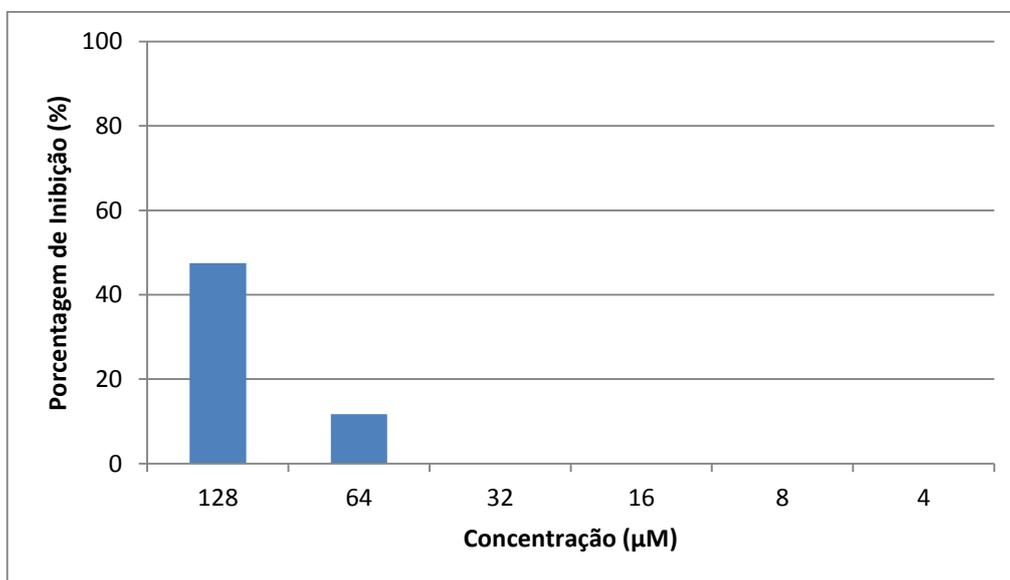


Figura 11: Efeito da incubação de doses crescentes da fração PaF31-7(F12) sobre a proliferação do fungo patogênico *Candida albicans*.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

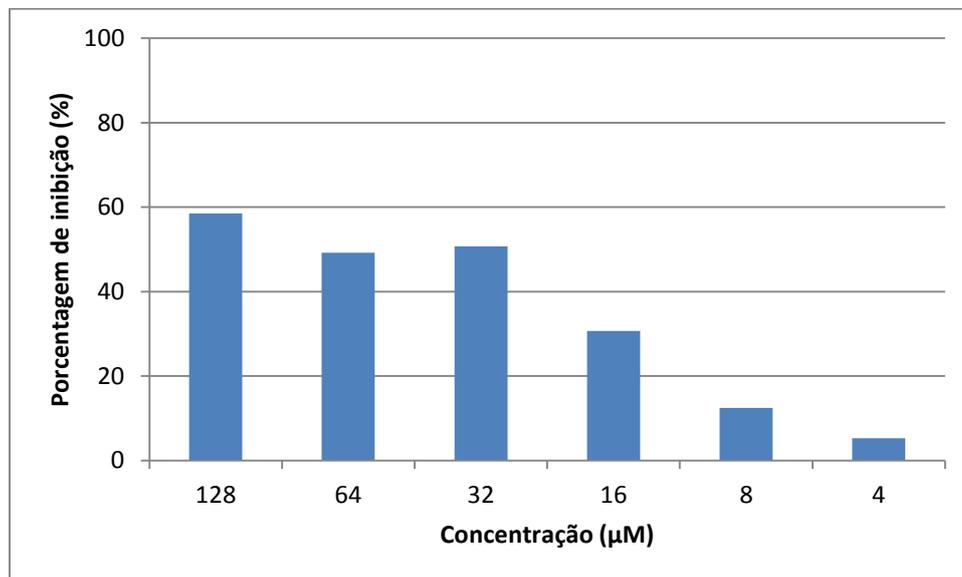


Figura 12: Efeito da incubação de doses crescentes da fração PaF36-10(F13) sobre a proliferação do fungo patogênico *Candida albicans*.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

Uma segunda abordagem empregada no presente estudo envolveu a avaliação dos efeitos citotóxicos e antiproliferativos das secreções cutâneas de *L. labyrinthicus* e *P. azurea* sobre células tumorais das linhagens HeLa e B16F10, bem como sobre células saudáveis, fibroblastos murinos da linhagem NIH3T3.

Em um primeiro momento, foram realizados ensaios de viabilidade celular empregando-se as linhagens tumorais HeLa e B16F10, bem como uma linhagem de fibroblastos normais murinos (NIH3T3), a fim de se determinar o grau de susceptibilidade dessas células frente as secreções de interesse. Foi feito um ensaio inicial com intervalos mais amplos de concentrações da secreção bruta testada e um segundo ensaio com concentrações mais próximas ao IC₅₀ calculado inicialmente a fim de se obter um valor mais exato.

Observou-se que a secreção bruta de *P. azurea* apresentou efeitos citotóxicos contra células HeLa com um IC₅₀ de 70,06 µg/mL e contra células B16F10 com um IC₅₀ de 51,76 µg/mL. No entanto apresentou também citotoxicidade sobre células normais com IC₅₀ de 45,09 µg/mL, valor relativamente próximo aos obtidos para as células tumorais (Figuras 13 e 15) .

A secreção bruta de *L. labyrinthicus* teve efeitos citotóxicos bem mais pronunciados sobre as células tumorais com IC₅₀ de 31,05 µg/mL para células B16F10 com um IC₅₀ de 4,216 µg/mL para células HeLa. Não foi possível determinar um IC₅₀ para as células NIH3T3, pois no primeiro ensaio verificou-se citotoxicidade pronunciada, no entanto, no segundo ensaio, tal secreção não apresentou efeitos citotóxicos contra células NIH3T3 nas concentrações testadas (Figuras 14 e 15).

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

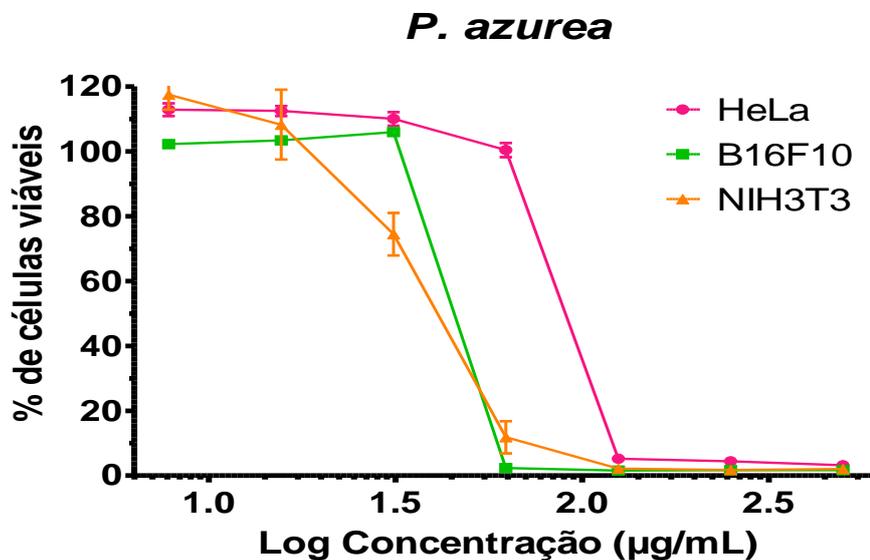


Figura 13: Avaliação da viabilidade celular após incubação com a secreção bruta de *P. azurea* nas concentrações de 500 a 3,9 µg/mL.

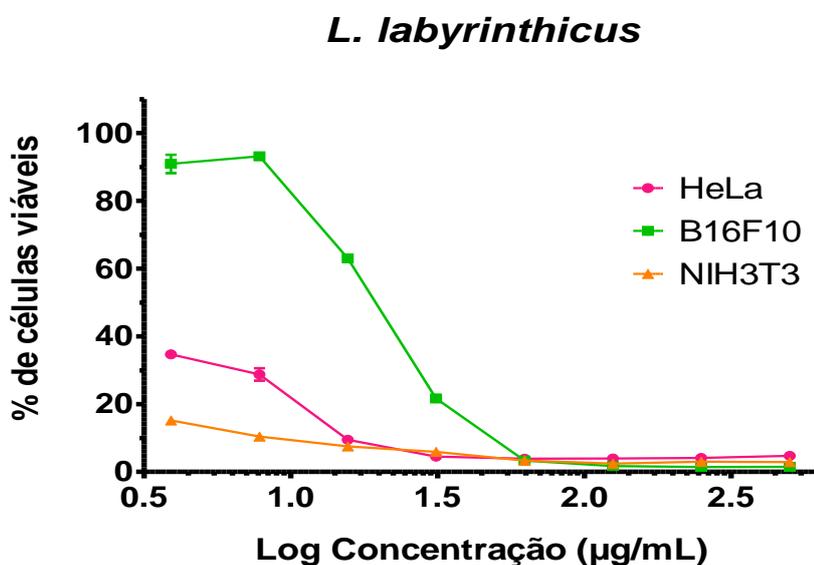


Figura 14: Avaliação da viabilidade celular após incubação com a secreção bruta de *L. labyrinthicus* nas concentrações de 500 a 3,9 µg/mL.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

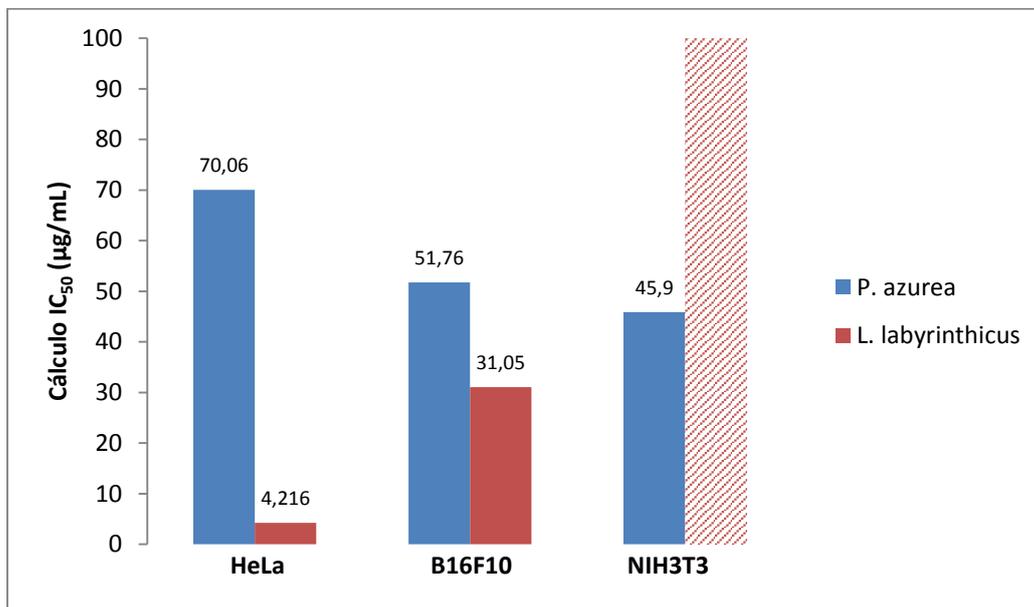


Figura 15: Comparação dos IC_{50} obtidos após incubação das diferentes linhagens celulares com as secreções cutâneas de *P. azurea* e *L. labyrinthicus*. Não foi observada toxicidade sobre a linhagem NIH3T3 nas doses testadas nesse ensaio.

Após a realização dos ensaios de viabilidade celular, foram realizados os testes de citometria de fluxo a fim de se avaliar os efeitos citotóxicos da secreção bruta de *L. labyrinthicus* sobre as linhagens celulares de interesse. Optou-se por avançar a investigação dos efeitos citotóxicos promovidos pela incubação da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* sobre células HeLa, uma vez que foi observada uma alta susceptibilidade dessa linhagem à essa secreção (IC_{50} , 4,216 µg/mL). Além disso, essa secreção, diferentemente da secreção *P. azurea*, não se mostrou tóxica para NIH3T3 no ensaio confirmatório.

Nessa etapa foram avaliados os efeitos da incubação de células HeLa com a secreção cutânea de *L. labyrinthicus* sobre a fragmentação de DNA e sobre o ciclo celular.

Pode-se observar que a incubação das células tumorais com a secreção cutânea de *L. labyrinthicus* promoveu 56,2% de fragmentação do DNA, ao passo que no grupo controle, o qual não foi tratado com a secreção de *L. labyrinthicus*, observou-se apenas 4,1% de fragmentação (Figura 16) .

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

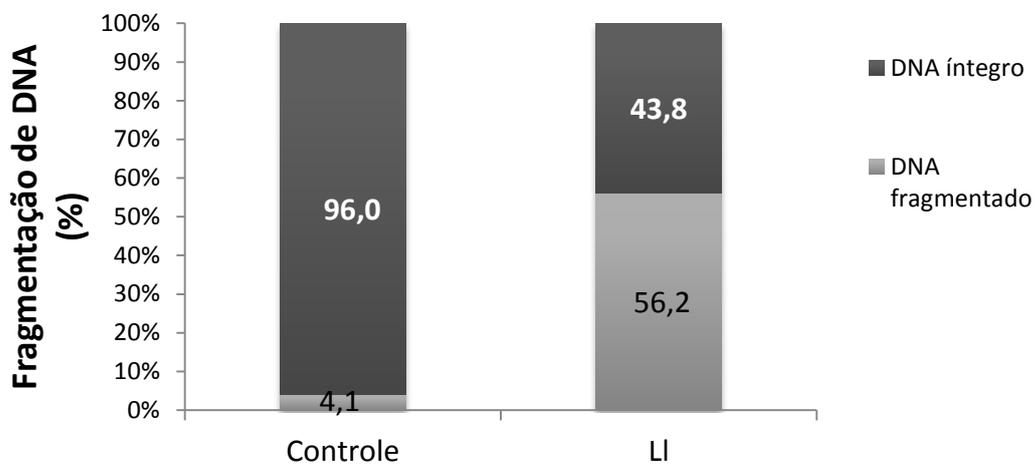


Figura 16: Efeito da incubação da secreção bruta de *L. labyrinthicus* sobre a fragmentação de DNA de células HeLa.

A análise dos efeitos sobre o ciclo celular não evidenciaram diferenças entre o grupo controle e o grupo incubado com a secreção cutânea de *L. labyrinthicus* (Figura 17).

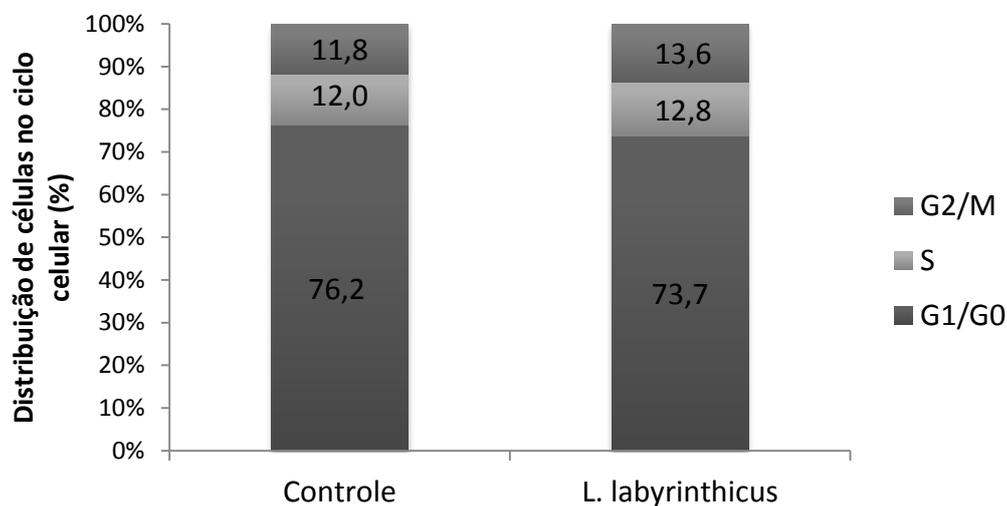


Figura 17: Efeito da incubação da secreção bruta de *L. labyrinthicus* sobre a distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular.

Tais ensaios biológicos tiveram como objetivo avaliar se a secreção bruta de *L. labyrinthicus* induz efeitos relacionados ao bloqueio da proliferação

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

e do ciclo celular. Tal avaliação é importante, considerando que a proliferação celular descontrolada é uma das principais características do câncer.

Muitos dos medicamentos antitumorais que temos hoje à disposição têm seu mecanismo de ação relacionado a uma determinada etapa do ciclo celular. Os peptídeos antitumorais presentes em secreção cutânea de anuros costumam ter um modo de ação muito similar ao modo de ação antimicrobiano, atuando seletivamente em células tumorais por ruptura da membrana plasmática levando à morte celular por lise ou passando por ela e interagindo com membranas negativamente carregadas das mitocôndrias, desestabilizando-as e causando a liberação de citocromo c, o que iniciaria uma cadeia de sinalização que culminaria em apoptose (Bhutia & Maiti, 2008). O fato de não terem sido observadas diferenças no ciclo celular e de haver uma diferença significativa no nível de fragmentação do DNA é um indicativo de que os componentes presentes na secreção de *L. labyrinthicus* não estariam atuando no arresto do ciclo celular e sim por um mecanismo que leva à apoptose celular ou necrose tendo um efeito citolítico ao invés de citostático.

Estudos relacionados com a avaliação dos efeitos da secreção bruta de anuros não são tão usuais, normalmente o caminho tem sido a purificação de um peptídeo ativo e sua caracterização biológica. No entanto, ao serem analisados como são realizados os estudos de bioprospecção com plantas, observa-se que a estratégia mais comumente empregada envolve avaliar-se inicialmente as propriedades biológicas de um extrato bruto e, verificadas as propriedades de interesse, busca-se isolar a molécula responsável pelo efeito, o que nem sempre é possível, visto que em diversos casos uma molécula isolada não possui a mesma atividade do extrato, onde há muitas vezes um sinergismo de ação entre várias substâncias ali presentes. Conhecer o perfil de atividade de uma secreção bruta é um dado importante para compararmos com o perfil de atividade de um peptídeo isolado, por exemplo, e pode nos dar pistas sobre a possibilidade de termos mais substâncias atuando conjuntamente com o peptídeo de interesse. Ferreira *et al.* (2013) utilizaram essa estratégia ao estudar as propriedades antitumorais dos extratos brutos da

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

pele de dois anfíbios das espécies *Rhinella marina* e *Rhaebo guattatus*, fazendo posteriormente a purificação e identificando bufadienolídeos como os responsáveis pelo efeito antitumoral.

Na medicina tradicional chinesa, secreção bruta de anuros vem sendo utilizada há séculos com finalidades terapêuticas, como o exemplo do Huachansu, que é um preparado feito a partir de pele sapo, que exibe atividade farmacológica sobre alguns tipos de câncer, tais como hepatoma, câncer gástrico, linfadenoma e carcinoma esofágico. Na Índia, foi revelado que o extrato da pele de *Bufo melanostictus* possui propriedades imunomodulatórias e antineoplásicas, assim como efeitos citotóxicos, antiproliferativos e apoptóticos sobre células tumorais (Lu *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2011). Estudos com a secreção bruta de *P. hypochondrialis*, grupo monofilético no qual *P. azurea* até há pouco tempo era classificada, foram feitos, a exemplo do trabalho de Sciani *et al.* (2012) no qual se constatou os seus efeitos citotóxicos, sendo capaz de inibir a proliferação celular de células MCF-7 e MDA-MB-231, causando alterações morfológicas em ambas as linhagens, incluindo formação de corpos apoptóticos e morte celular, além de ter também um efeito citostático, promovendo arresto de ciclo celular na fase G2/M.

Fica evidente que as secreções cutâneas são uma rica fonte de compostos com atividades terapêuticas e que mais estudos devem ser realizados a fim de se avaliar o real potencial desses compostos na produção de novos medicamentos.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

CONCLUSÃO

No presente estudo foi comprovada a presença de peptídeos com atividade inibitória sobre o crescimento do fungo patogênico *Candida albicans* nas secreções cutâneas dos anuros *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*. De acordo com a estratégia experimental empregada foi possível a obtenção de duas frações homogêneas a partir da secreção de *P. azurea*, denominadas PaF31-7(F12) e PaF36-10(F13). Tais frações mostraram-se capazes de inibir parcialmente o crescimento da levedura *C. albicans* na maior concentração empregada (128 μ M). Os peptídeos predominantes nessas duas frações serão obtidos em alto grau de pureza de modo a se avançar na sua caracterização estrutural e biológica.

Também foram avaliados os efeitos citotóxicos e antiproliferativos das secreções brutas de *P. azurea* e *L. labyrinthicus* sobre as linhagens celulares HeLa, B16F10 e NIH3T3. Observou-se que a secreção bruta de *L. labyrinthicus* apresenta atividade antiproliferativa acentuada sobre células tumorais empregadas, especialmente células HeLa, com um IC₅₀ de 4,216 μ g/mL sem apresentar citotoxicidade relevante contra células normais da linhagem NIH3T3. Ensaio adicional de citometria de fluxo revelaram que a secreção bruta de *L. labyrinthicus* não interfere de forma significativa nas etapas do ciclo celular, no entanto, observa-se um aumento importante na fragmentação do DNA de células HeLa quando expostas à secreção, sugerindo que a morte celular ocorra por meio de apoptose. Mais estudos precisam ser realizados a fim de se determinar o mecanismo pelo qual a secreção bruta de *L. labyrinthicus* promove a morte das células tumorais.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

PERSPECTIVAS

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

- ✓ Purificação dos peptídeos com atividade anti-*Candida* isolados a partir da secreção cutânea de *P. azurea*;
- ✓ Determinação das estruturas primárias dos peptídeos antifúngicos isolados;
- ✓ Produção, por síntese química, dos peptídeos com atividade anti-*Candida* empregando-se química Fmoc;
- ✓ Tendo disponibilidade de material, proceder à determinação das atividades inibitórias dos peptídeos bioativos isolados sobre a proliferação de diferentes organismos patogênicos como leveduras (*Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*), bactérias (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. faecalis*) e protozoários (*T. cruzi*, *L. brasiliensis*, *P. falciparum*);
- ✓ Avaliação dos efeitos citotóxicos dos peptídeos bioativos isolados sobre células tumorais;
- ✓ Avaliação dos efeitos citolíticos dos peptídeos bioativos isolados sobre células sanguíneas humanas.
- ✓ Determinação do mecanismo de morte celular pelo qual a secreção cutânea de *L. labyrinthicus* promove sobre células HeLa.

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anchiêta Jr. J.J.R. (2012). **Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de rãs : citotoxicidade in vitro em células tumorais humanas e genotoxicidade em *Allium cepa* e linfócitos sanguíneos humanos.** Disponível em: [http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppgcf/arquivos/files/DISSERTACAO_Jose_Jauro\(1\).pdf](http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppgcf/arquivos/files/DISSERTACAO_Jose_Jauro(1).pdf). Acessado em 15/01/2014.
- Barbedo, L. S. (2010). **Candidíase.** *J bras Doenças Sex Transm* 2010; 22(1): 22-38 - ISSN: 0103-4065 - ISSN on-line: 2177-8264
- Bechinger, B., Lohner, K. (2006). **Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides.** *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1758:1529–1539.
- Berman, J. (2012). ***Candida albicans*.** *Current Biology: CB*, 22(16), R620–2. doi:10.1016/j.cub.2012.05.043
- Brand, G. D., Leite, J. R. S. a, de Sá Mandel, S. M., Mesquita, D. a, Silva, L. P., Prates, M. V, Bloch, C. (2006). **Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia).** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(3), 739–46. doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.168
- Brand, G. D., Leite, J. R. S. a, Silva, L. P., Albuquerque, S., Prates, M. V, Azevedo, R. B., Bloch, C. (2002). **Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells.** *The Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49332–40. doi:10.1074/jbc.M209289200
- Bhutia, S. K., & Maiti, T. K. (2008). **Targeting tumors with peptides from natural sources.** *Trends in Biotechnology*, 26(4), 210–7. doi:10.1016/j.tibtech.2008.01.002
- Caramaschi U. (2006). **Redefinição do grupo de *Phyllomedusa hypochondrialis*, com redescrção de p. *Megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926), revalidação de *P. Azurea Cope, 1862* e descrição de uma nova espécie (amphibia, anura, hylidae).** *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, v.64, n.2, p.159-179, abr./jun.2006 ISSN 0365-4508
- Chen, T., Zhou, M., Gagliardo, R., Walker, B., & Shaw, C. (2006). **Elements of the granular gland peptidome and transcriptome persist in air-dried skin of the South American orange-legged leaf frog, *Phyllomedusa hypocondrialis*.** *Peptides*, 27(9), 2129–36. doi:10.1016/j.peptides.2006.04.006
- Conceição, K., Konno, K., Richardson, M., Antoniazzi, M. M., Jared, C., Daffre, S., Pimenta, D. C. (2006). **Isolation and biochemical characterization of peptides**

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

presenting antimicrobial activity from the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides*, 27(12), 3092–9. doi:10.1016/j.peptides.2006.08.005

Conlon, J. M. (2008). **A proposed nomenclature for antimicrobial peptides from frogs of the genus *Leptodactylus*.** *Peptides*, 29(9), 1631–2. doi:10.1016/j.peptides.2008.04.016

Dourado, F. S., Leite, J. R. S. a, Silva, L. P., Melo, J. a T., Bloch, C., & Schwartz, E. F. (2007). **Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus siphax*.** *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 50(4), 572–80. doi:10.1016/j.toxicon.2007.04.027

Ferreira, P. M. P., Lima, D. J. B., Debiasi, B. W., Soares, B. M., Machado, K. D. C., Noronha, J. D. C., Vieira, G. M. (2013). **Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon.** *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 72, 43–51. doi:10.1016/j.toxicon.2013.06.009

Frost, D. R. (2014). **Amphibian Species of the World: an Online Reference.** Acessível em: [http:// research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php](http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php). *American Museum of Natural History*, New York, USA. Acessado em 03/03/2014.

Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). **Cancer drug resistance: an evolving paradigm.** *Nature Reviews. Cancer*, 13(10), 714–26. doi:10.1038/nrc3599

Hoskin, D. W., & Ramamoorthy, A. (2008). **Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(2), 357–75. doi:10.1016/j.bbamem.2007.11.008

Instituto Nacional do Câncer (2014). **Informações sobre o câncer.** Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>. Acessado em 15/01/2014.

King, J. D., Leprince, J., Vaudry, H., Coquet, L., Jouenne, T., & Conlon, J. M. (2008). **Purification and characterization of antimicrobial peptides from the Caribbean frog, *Leptodactylus validus* (Anura: Leptodactylidae).** *Peptides*, 29(8), 1287–92. doi:10.1016/j.peptides.2008.04.005

Kückelhaus, S. a S., Leite, J. R. S. a, Muniz-Junqueira, M. I., Sampaio, R. N., Bloch, C., & Tosta, C. E. (2009). **Antiplasmodial and antileishmanial activities of phylloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa azurea* (Amphibia).** *Experimental Parasitology*, 123(1), 11–6. doi:10.1016/j.exppara.2009.05.002

Leite, J. M. A., Silva, L. P., Silva-Leite, R. R., Ferrari, A. S., Noronha, S. E., Silva, H. R., Leite, J. R. D. S. D. A. (2010). ***Leptodactylus ocellatus* (Amphibia): mechanism of defense in the skin and molecular phylogenetic relationships.** *Journal of*

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology, 313(1), 1–8.
doi:10.1002/jez.551

Leite, J. R. S. a, Silva, L. P., Rodrigues, M. I. S., Prates, M. V, Brand, G. D., Lacava, B. M., Bloch, C. (2005). **Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti- protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus.** *Peptides*, 26(4), 565–73.
doi:10.1016/j.peptides.2004.11.002

Liu, S., Hou, Y., Chen, X., Gao, Y., Li, H., & Sun, S. (2014). **Combination of fluconazole with non-antifungal agents: A promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery.** *International Journal of Antimicrobial Agents*.
doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.12.009

Libério, M. S., Joanitti, G. a, Azevedo, R. B., Cilli, E. M., Zanotta, L. C., Nascimento, A. C., Castro, M. S. (2011). **Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells.** *Amino Acids*, 40(1), 51–9. doi:10.1007/s00726-009-0384-y

Lu, C. X., Nan, K. J., & Lei, Y. (2008). **Agents from amphibians with anticancer properties.** *Anti-Cancer Drugs*, 19(10), 931–9. doi:10.1097/CAD.0b013e3283139100

Lucca, A. J. De, & Walsh, T. J. (1999). **Antifungal Peptides : Novel Therapeutic Compounds against Emerging Pathogens.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43(1):1.

Mangoni, M. L., & Shai, Y. (2009). **Temporins and their synergism against Gram-negative bacteria and in lipopolysaccharide detoxification.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(8), 1610–9. doi:10.1016/j.bbamem.2009.04.021

Marr, A.K.; Gooderham, W.J.; Hancock, R.E.W. (2006). **Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook.** [Current Opinion in Pharmacology, Volume 6, Issue 5](#), Pages 468–472

Márquez, C.A.P. (2012). **Purificação e caracterização de um análogo da Ocellatina P-1 isolado da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*.** Tese de mestrado disponível em:
http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/11027/1/2012_CesarAugustoPriasMarquez.pdf. Acesso em 07/08/2012.

Masui, K., Gini, B., Wykosky, J., Zanca, C., Mischel, P. S., Furnari, F. B., & Cavenee, W. K. (2013). **A tale of two approaches: complementary mechanisms of cytotoxic and targeted therapy resistance may inform next-generation cancer treatments.** *Carcinogenesis*, 34(4), 725–38. doi:10.1093/carcin/bgt086

Matzuzaki, K. (1999). **Why and how are peptide lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1462 1 10

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

Morton, C. O., Dos Santos, S. C., & Coote, P. (2007). **An amphibian-derived, cationic, alpha-helical antimicrobial peptide kills yeast by caspase-independent but AIF-dependent programmed cell death.** *Molecular Microbiology*, 65(2), 494–507. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05801.x

Mosmann, T. (1983). **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>

Nascimento, A. C. C., Zanotta, L. C., Kyaw, C. M., Schwartz, E. N. F., Schwartz, C. a, Sebben, A., Castro, M. S. (2004). **Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae).** *The Protein Journal*, 23(8), 501–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15648972>

Nascimento, A., Chapeaurouge, A., Perales, J., Sebben, A., Sousa, M. V, Fontes, W., & Castro, M. S. (2007). **Purification, characterization and homology analysis of ocellatin 4, a cytolytic peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus ocellatus*.** *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 50(8), 1095–104. doi:10.1016/j.toxicon.2007.07.014

Prates, M. V. (1999). **Peptídeos antimicrobianos.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio17/17_pa.pdf. Acessado em 23/09/2013.

Qi, F., Li, A., Inagaki, Y., Kokudo, N., Tamura, S., Nakata, M., & Tang, W. (2011). **Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans* Cantor.** *International Immunopharmacology*, 11(3), 342–9. doi:10.1016/j.intimp.2010.12.007

Ramamoorthy A. Beyond NMR. (2009). **Spectra of antimicrobial peptides: dynamical images at atomic resolution and functional insights.** *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 35, 201–207. doi: 10.1016/j.ssnmr.2009.03.003

Reddy, K.V.R., Yedery, R.D.; Aranha, C.(2004) **Antimicrobial peptides: premises and promises.** *Int J Antimicrob Agents* 24: 536–547.

Riedl, S., Zweytick, D., & Lohner, K. (2011). **Membrane-active host defense peptides--challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs.** *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(8), 766–81. doi:10.1016/j.chemphyslip.2011.09.004

Rodrigues, E. G., Dobroff, A. S., Taborda, C. P., & Travassos, L. R. (2009). **Antifungal and antitumor models of bioactive protective peptides.** *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 81(3), 503–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19722020>

Rollins-Smith, L. a, King, J. D., Nielsen, P. F., Sonnevend, A., & Conlon, J. M. (2005). **An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog**

Purificação e avaliação da atividade anti-*Candida* de peptídeos isolados da secreção cutânea das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea*

***Leptodactylus fallax* (Anura:Leptodactylidae).** *Regulatory Peptides*, 124(1-3), 173–8. doi:10.1016/j.regpep.2004.07.013

Ronald Heyer, Abraham Mijares, Diego Baldo (2004). ***Leptodactylus labyrinthicus***. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 03 March 2014.

(Sciani et al., 2013) Sciani, J. M., de-Sá-Júnior, P. L., Ferreira, A. K., Pereira, A., Antoniazzi, M. M., Jared, C., & Pimenta, D. C. (2013). **Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells.** *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3(1), 10–18. doi:10.1016/j.bionut.2012.11.001

Thompson, A. H., Bjourson, A. J., Orr, D. F., Shaw, C., & McClean, S. (2007). **A combined mass spectrometric and cDNA sequencing approach to the isolation and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretions of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*.** *Peptides*, 28(7), 1331–43. doi:10.1016/j.peptides.2007.05.001

Thompson, A. H., Bjourson, A. J., Orr, D. F., Shaw, C., McClean, S., & May, R. (2007). **Amphibian Skin Secretomics : Application of Parallel Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry and Peptide Precursor cDNA Cloning to Rapidly Characterize the Skin Secretory Peptidome of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*: Discovery of a Novel Peptide.** *Journal of Proteome Research* 2007, 6, 3604 - 3613

Xi, X., Li, R., Jiang, Y., Lin, Y., Wu, Y., Zhou, M., Shaw, C. (2013). **Medusins: a new class of antimicrobial peptides from the skin secretions of phyllomedusine frogs.** *Biochimie*, 95(6), 1288–96. doi:10.1016/j.biochi.2013.02.005

World Health Organization (2012). **10 datos sobre la Resistencia a los Antimicrobianos.** Disponível em http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/es/. Acessado em 21/01/2014.

Zampa, M. F., Araújo, I. M. S., Costa, V., Nery Costa, C. H., Santos, J. R., Zucolotto, V., Leite, J. R. S. a. (2009). **Leishmanicidal activity and immobilization of dermaseptin 01 antimicrobial peptides in ultrathin films for nanomedicine applications.** *Nanomedicine. Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 5(3), 352–8. doi:10.1016/j.nano.2008.11.001