

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

ATIVIDADE ANTITUMORAL DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE *Hypsiboas crepitans*
E DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA PELE DOS ANUROS *Hypsiboas crepitans* e
Leptodactylus labyrinthicus

CÉSAR AUGUSTO PRÍAS MÁRQUEZ

2016

CÉSAR AUGUSTO PRÍAS MÁRQUEZ

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE *Hypsiboas crepitans*
E DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA PELE DOS ANUROS *Hypsiboas crepitans* e
*Leptodactylus labyrinthicus***

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
da Universidade de Brasília como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Doutor.**

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

**BRASÍLIA
2016**

Tese de Doutorado

César Augusto Prías Márquez

Título:

“Atividade antitumoral da secreção cutânea de *Hypsiboas crepitans* e de peptídeos derivados da pele dos anuros *Hypsiboas crepitans* e *Leptodactylus labyrinthicus*”

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Mariana de Souza Castro
Presidente/Orientadora
UnB

Dr. Marcelo Porto Bemquerer
Membro Titular
Embrapa-CENARGEN

Profa. Zulmira Guerrero Marques Lacava
Membro Titular
GEM-IB/UnB

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo
Membro Titular
GEM-IB/UnB

Profa. Dra. Laila Salmen Espindola
Membro Titular
FS/UnB

Prof. Dra. Monica Pereira Garcia
Membro Suplente
GEM-IB/UnB

Brasília, 29 de agosto de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Dra. Mariana S. Castro pela orientação e os ensinamentos dados durante esses oito anos e por ter acreditado nas minhas capacidades, mesmo no primeiro contato e sem ter nenhuma referência sobre meu desempenho como pesquisador.

À professora Dra. Graziella A. Joanitti, cuja colaboração neste projeto foi sem dúvida inestimável. Por toda a paciência e empenho em explicar, pelo otimismo e esforço depositados aqui, e pela valiosa amizade criada durante esses anos.

Ao Professor Dr. Ricardo Bentes por ceder o espaço do Laboratório de Nanobiotecnologia da UnB e os materiais necessários para o desenvolvimento desse projeto.

Ao Laboratório de Biologia do Gene da UnB por ceder o espaço para a realização dos testes de citometria de fluxo.

À MSc. Alcía Ombredane pela imensa e oportuna colaboração com os ensaios de citometria.

Ao Nuno Manuel Domingues pela absoluta disposição em todo momento e pela eficaz colaboração, mesmo nos assuntos menos importantes.

À professora Dra. Luciana Nascimento, à Isabela Fernández e ao meu pai Julio César Prías V. pela imensa ajuda com as coletas de animais.

Ao Professor Dr. Osmino Rodrigues Jr. pela colaboração e o auxílio na preparação das coletas e nas etapas de cromatografia.

Ao Dr. Fabiano José Queiroz Costa pela disposição contínua e os valiosos aportes de conhecimento nos testes antimicrobianos. Também por fornecer o material biológico necessário para a realização desses testes.

Ao Dr. Daniel Ardisson e ao MSc. Carlos Santana pela colaboração no planejamento e execução dos testes finais.

Ao Arthur Pontes e ao MSc. Alán Mól pela disposição e colaboração com a quantificação das amostras e com o uso das ferramentas bioinformáticas, respectivamente.

À minha Família: pais, irmãos, tios e primos, que embora distantes estão sempre presentes nos momentos mais e menos importantes e foram apoio fundamental para continuar nesse projeto de vida sem desfalecer.

À minha grande amiga Andréa Carvalho pela ajuda e amizade incondicional durante esses últimos anos e pelo constante apoio, sobretudo em momentos em que desanimei e pensei em desistir deste empreendimento.

Aos grandes amigos que conheci em Brasília: Diego, Harry, Beatriz, Elena, Diana Jimena, Diana, Mafuxinha; e mais recentemente Fabián, Osmel, Daniely, Carolina, Liudy e Fernando. Cada um de vocês fez de cada minuto compartilhado um momento inestimável e inesquecível. Obrigado pela amizade incondicional e por estarem presentes nos momentos bons e ruins.

Aos meus grandes amigos da Colômbia: Mario, Diego Alejandro, Rubens, Jenny, Oneida, Karina, Diana Karina, Adriana, Astrid, Camila, Víctor e Manuel por todo o apoio e a amizade de longos anos, e por estarem sempre atentos a todos os acontecimentos da minha vida, mesmo a distância.

A todos os amigos, colegas e professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, do Laboratório de Toxinologia e do Laboratório de Nanobiotecnologia da UnB pelas dicas e a colaboração constante e pelos momentos de descontração nos dias mais difíceis do trabalho.

À Daniele, antiga secretária do PPG em Biologia Animal pela eficiência e disposição em colaborar sempre, muito além do seu trabalho.

À *Corporación Autónoma Regional del Tolima – CORTOLIMA* (Colômbia), ao extinto *Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – MAVDT* (Colômbia) e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio (Brasil) pela concessão das permissões ambientais necessárias.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pela concessão de apoio financeiro para a realização deste projeto.

À Fundação Universidade de Brasília – UnB e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal por possibilitarem a execução desse projeto.

RESUMO

No presente trabalho foi avaliado pela primeira vez o potencial anticâncer da secreção cutânea do anuro sul-americano *Hypsiboas crepitans* (Wied-Neuwied, 1824). O fracionamento por RP-HPLC de secreções de indivíduos coletados na Colômbia e no Brasil permitiu a caracterização dos perfis cromatográficos das duas populações, obtendo-se registros das massas moleculares monoisotópicas de vários peptídeos presentes nessas secreções. Testes de atividade antimicrobiana realizados com a secreção de indivíduos da Colômbia levaram ao isolamento e à caracterização química e biológica de dois novos peptídeos da família das hilinas. Estes peptídeos, denominados de HCC76 e HCC77 apresentam cadeia polipeptídica curta, são altamente hidrofóbicos, possuem baixa cationicidade e são propensos a formarem estruturas em α -hélice anfipática. Versões sintéticas dos dois peptídeos (HCC76 e HCC77(K)) foram usadas para a determinação das suas concentrações inibitórias mínimas (MICs) em bactérias e fungos e da concentração hemolítica 50 % (HC₅₀) em hemácias humanas. Os peptídeos HCC76, HCC77(K) e dois análogos deste último, denominados HCC77(K)1 e HCC77(K)2, tiveram seus efeitos antiproliferativos avaliados sobre células aderentes de mamíferos. Adicionalmente foram utilizados nesses ensaios dois peptídeos sintéticos da família das ocelatinas (ocelatina-F1 e G16OCP1), isolados previamente de secreções de anuros do gênero *Leptodactylus*. Os resultados mostram que os peptídeos HCC76 e HCC77(K) possuem grandes diferenças quanto à sua atividade biológica em bactérias e células de mamíferos, enquanto os dois análogos do peptídeo HCC77(K) conservaram a atividade em células aderentes de mamífero e tiveram melhora na potência, com relação a este. De forma similar, os peptídeos G16OCP1 e ocelatina-F1 mostraram diferenças quanto à sua atividade em células cancerosas e normais de mamíferos. Ensaio utilizando citometria de fluxo e microscopia de contraste de fase mostram que os peptídeos HCC77(K) e ocelatina-F1 induzem morte celular em uma linhagem de melanoma murino por um processo que envolve apoptose, com evidência de fragmentação de DNA e alteração do potencial de membrana mitocondrial e, no caso do peptídeo HCC77(K), efeitos na membrana plasmática e no ciclo celular.

Palavras-chave: *Hypsiboas crepitans*, *Leptodactylus*, hilinas, ocelatinas, peptídeo anticâncer.

ABSTRACT

The present study assessed, for the first time, the anticancer potential of the skin secretion of the South American anuran *Hypsiboas crepitans* (Wied-Neuwied, 1824). Fractionation of skin secretions of Colombian and Brazilian specimens by RP-HPLC allowed the characterization of chromatographic profiles of those two populations, while obtaining records of the monoisotopic molecular masses of several peptides present in these secretions. Antimicrobial activity assays performed using the secretion obtained from specimens collected in Colombia led to the isolation and chemical and biological characterization two new peptides belonging to hylins family. These peptides, named HCC76 and HCC77, are short-chain, highly hydrophobic, lowly cationic, and exhibit propension to adopt amphipatic α -helix structures. Synthetic forms of these two peptides (HCC76 and HCC77(K)) were used for determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) on bacteria and fungi, and also for determination of hemolytic concentration 50 % (HC₅₀) on human erythrocytes. The peptides HCC76, HCC77(K) and two analogs of the last one, were used in assays assessing their antiproliferative effects on adherent mammalian cells. Additionally, two synthetic peptides (ocellatin-F1 and G16OCP1) belonging to the ocellatin family, previously isolated from the skin secretions of *Leptodactylus spp.* were used in the same tests. The results show that HCC76 and HCC77(K) have great differences regarding their biological activity on bacteria and mammalian cells, while the two HCC77(K)-derived analogs maintained activity on mammalian adherent cells and had a better potency compared to HCC77(K). Similarly, the peptides G16OCP1 and ocellatin-F1 showed differences regarding their biological activity on normal and cancerous mammalian cells. Assays using flow cytometry and phase-contrast microscopy show that the peptides HCC77(K) and ocellatin-F1 lead to cell death on a murine melanoma cell line through a process involving apoptosis, with evidence of DNA fragmentation and disruption of mitochondrial membrane potential; and also, in the case of HCC77(K), effects on the plasma membrane and cell cycle.

Keywords: *Hypsiboas crepitans*, *Leptodactylus*, hylins, ocellatins, anticancer peptide.

RESUMEN

En este trabajo se evaluó por primera vez el potencial antitumoral de la secreción cutánea del anuro suramericano *Hypsiboas crepitans* (Wied-Neuwied, 1824). El fraccionamiento por RP-HPLC de secreciones de individuos colectados en Colombia y Brasil permitió la caracterización de los perfiles cromatográficos de las dos poblaciones, obteniéndose registros de las masas moleculares monoisotópicas de varios péptidos presentes en estas secreciones. Ensayos de actividad antimicrobiana, realizados con la secreción de individuos colombianos, condujeron al aislamiento y a la caracterización química y biológica de dos nuevos péptidos de la familia de las hilinas. Estos péptidos, denominados HCC76 y HCC77, presentan cadena polipeptídica corta, son altamente hidrofóbicos, poseen baja cationicidad y son propensos a formar estructuras en α -hélice anfipática. Versiones sintéticas de los dos péptidos (HCC76 y HCC77(K)) fueron usadas para la determinación de sus concentraciones inhibitorias mínimas (MICs) en bacterias y hongos, así como de sus concentraciones hemolíticas 50 % (HC₅₀) en eritrocitos humanos. Los péptidos HCC76 y HCC77(K), así como dos análogos de este último, denominados HCC77(K)1 y HCC77(K)2, fueron usados para evaluar su efecto antiproliferativo en células adherentes de mamíferos. Adicionalmente fueron utilizados en esos ensayos, dos péptidos sintéticos de la familia de las ocelatinas (ocelatina-F1 y G16OCP1), aislados previamente de secreciones de anuros del género *Leptodactylus*. Los resultados muestran que los péptidos HCC76 y HCC77(K) poseen grandes diferencias con relación a su actividad biológica en bacterias y células de mamífero, mientras los dos análogos del péptido HCC77(K) conservan su actividad en células adherentes de mamífero, mejorando su potencia respecto a este. Ensayos usando citometría de flujo y microscopía de contraste de fase muestran que los péptidos HCC77(K) y ocelatina-F1 inducen muerte celular en un linaje de melanoma murino a través de un proceso que involucra apoptosis, con evidencia de fragmentación de DNA y alteración del potencial de membrana mitocondrial y, en el caso del péptido HCC77(K), efectos sobre la membrana plasmática y el ciclo celular.

Palabras clave: *Hypsiboas crepitans*, *Leptodactylus*, hilinas, ocelatinas, péptido anticáncer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Principais classes de peptídeos antimicrobianos de acordo com a extensão da cadeia polipeptídica e as estruturas primária e secundária apresentadas.....	18
Figura 2 — Principais mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos.....	20
Figura 3 — <i>Hypsiboas crepitans</i> (Wied-Neuwied, 1824).....	28
Figura 4 — Indivíduos do género <i>Leptodactylus</i> , fonte de peptídeos da família das ocelatinas.....	31
Figura 5 — Abordagem metodológica do trabalho.....	35
Figura 6 — Perfil cromatográfico típico obtido após o fracionamento da secreção cutânea bruta de <i>H. crepitans</i> (Colômbia) empregando-se coluna C ₁₈	47
Figura 7 — Purificação dos peptídeos HCC76 e HCC77 por RP HPLC utilizando coluna C ₁₈	50
Figura 8 — Espectros de massas dos peptídeos HCC76 e HCC77 obtidos por MALDI TOF MS após purificação em coluna C ₁₈	51
Figura 9 — Viabilidade de células cancerosas e normais após incubação (24 h) com concentrações seriadas da secreção cutânea bruta de <i>H. crepitans</i> (Brasil).	55
Figura 10 — Viabilidade de células de câncer de mama humano (MCF-7) após incubação (24 h) com concentrações seriadas do peptídeo sintético HCC76.....	56
Figura 11 — Microfotografias de contraste de fase de células cancerosas incubadas (24 h) com o peptídeo sintético HCC76.	57
Figura 12 — Viabilidade de células cancerosas e normais após incubação (24 h) com concentrações seriadas do peptídeo sintético HCC77(K).	58
Figura 13 — Viabilidade de células cancerosas e normais após incubação (24 h) com concentrações seriadas de peptídeos sintéticos desenhados a partir do peptídeo HCC77(K).	58

Figura 14 — Viabilidade de células cancerosas e normais após incubação (24 h) com concentrações seriadas do peptídeo sintético G16OCP1.	59
Figura 15 — Viabilidade de células cancerosas e normais após incubação (24 h) com concentrações seriadas do peptídeo sintético ocelatina-F1.	59
Figura 16 — Microfotografias de contraste de fase de células de melanoma murino (B16-F10) mostrando o efeito do peptídeo sintético HCC77(K) após 24 h de incubação.	61
Figura 17 — Efeito do peptídeo HCC77(K) no tamanho (FSC-H) e na granulosidade (SSC-H) de células B16-F10 após 24 h de incubação com o peptídeo HCC77(K). ...	62
Figura 18 — Contagem pelo método de exclusão do azul de tripano, de células B16-F10 incubadas (24 h) com o peptídeo sintético HCC77(K).	63
Figura 19 — Efeito do peptídeo HCC77(K) na exposição de fosfatidilserina e na permeabilidade da membrana celular.	64
Figura 20 — Efeito do peptídeo HCC77(K) (25,57 μ M) sobre o potencial de membrana mitocondrial de células B16-F10 após 24 h de incubação.	65
Figura 21 — Efeitos no ciclo celular e na fragmentação de DNA de células B16-F10 incubadas com o peptídeo HCC77(K).	66
Figura 22 — Efeito da ocelatina-F1 no tamanho (FSC-H) e na granulosidade (SSC-H) de células B16-F10 após 24 h de incubação.	67
Figura 23 — Contagem pelo método de exclusão do azul de tripano, de células B16-F10 incubadas (24 h) com o peptídeo sintético ocelatina-F1.	68
Figura 24 — Efeito da ocelatina-F1 na exposição de fosfatidilserina e na permeabilidade da membrana celular.	69
Figura 25 — Efeito da ocelatina-F1 após 24 h de incubação sobre o potencial de membrana mitocondrial de células B16-F10.	70
Figura 26 — Efeitos no ciclo celular e na fragmentação de DNA de células B16-F10 incubadas com ocelatina-F1.	71

Figura 27 — Perfil cromatográfico obtido após o fracionamento da secreção cutânea bruta de *H. crepitans* (Brasil) empregando-se coluna C₁₈.72

Figura 28 — Projeções em roda helicoidal e projeções em rede de peptídeos derivados da secreção de *H. crepitans* (Colômbia) e dos dois peptídeos desenhados a partir destes.....79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 — Alinhamento múltiplo do peptídeo HCC76, do segmento 1–17 do peptídeo HCC77 e dos outros peptídeos da família das hilinas.....	52
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — PAMs de anuros presentes na base de dados Uniprot.....	23
Tabela 2 — Comparação dos valores de MIC e HC ₅₀ obtidos para o peptídeo ocelatina-F1 em diferentes estudos.	30
Tabela 3 — Relação das frações cromatográficas da secreção cutânea de <i>H. crepitans</i> (Colômbia) com atividade antimicrobiana e seus principais componentes peptídicos.....	48
Tabela 4 — Concentrações inibitórias mínimas (MICs) para vários microrganismos e concentrações hemolíticas (HC ₅₀) dos peptídeos sintéticos HCC76 e HCC77(K). ...	54
Tabela 5 — Valores de IC ₅₀ determinados experimentalmente para linhagens de células cancerosas e normais tratadas com peptídeos sintéticos derivados da pele de <i>H. crepitans</i> e <i>L. labyrinthicus</i>	60
Tabela 6 — Relação dos peptídeos identificados em frações cromatográficas obtidas da secreção cutânea de <i>H. crepitans</i> (Brasil).....	73
Tabela 7 — Propriedades físico-químicas teóricas de peptídeos derivados da secreção cutânea bruta de <i>H. crepitans</i> (Colômbia).	78
Tabela 8 — Comparação da atividade antiproliferativa da ocelatina-F1 em dois estudos independentes utilizando amostras de peptídeo nativo ou sintético.	83

LISTA DE ABREVIATURAS

α -PAM	Peptídeo antimicrobiano em alfa-hélice
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain-heart infusion broth</i>
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i> (Concentração Inibitória Mínima)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	<i>Frontal scatter</i> (espalhamento frontal)
HC ₅₀	Concentração hemolítica 50
IC ₅₀	Concentração inibitória 50
IC ₇₅	Concentração inibitória 75 MALDI-TOF MS <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MMi	Membrana mitocondrial interna
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MSSA	<i>Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PAC	Peptídeo anticâncer
PAM	Peptídeo antimicrobiano
PBS	Tampão fostato-salina
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
PI	Iodeto de propídeo
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
RP-HPLC	<i>Reversed-phase high-performance liquid chromatography</i>
SSC	<i>Side scatter</i> (espalhamento lateral)
TFA	Ácido trifluoroacético
TFE	2,2,2-Trifluoroetanol
Tris	2-amino-2-hidroxi-metil-propano-1,3-diol
UFCs	Unidades Formadoras de Colônia

VISA

Vancomycin-intermediate-resistant Staphylococcus aureus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.....	17
1.1.1 Classificação dos PAMs.....	18
1.1.2 Mecanismos de ação dos PAMs.....	19
1.1.3 PAMs de anuros.....	23
1.2 CÂNCER.....	24
1.3 PEPTÍDEOS ANTI-CÂNCER.....	25
1.4 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PACs.....	26
1.5 OBJETOS DE ESTUDO.....	27
1.5.1 <i>Hypsiboas crepitans</i>	27
1.5.2 Ocelatina-F1 e G16OCP1.....	29
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 REAGENTES E CÉLULAS.....	35
4.2 COLETA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA SECREÇÃO CUTÂNEA.....	36
4.3 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA SECREÇÃO BRUTA DE <i>H. crepitans</i>	36
4.4 ENSAIO ANTIBACTERIANO PRELIMINAR.....	37
4.5 ENSAIO ANTIFÚNGICO PRELIMINAR.....	38
4.6 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	38
4.7 PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DE INTERESSE.....	39
4.8 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FRAÇÕES DE INTERESSE.....	39
4.8.1 Determinação das estruturas primárias.....	39
4.8.2 Análises computacionais.....	39
4.9 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS.....	40
4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC).....	40
4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA (HC ₅₀).....	41

4.12 AVALIAÇÃO DE EFEITOS NA VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS	42
4.12.1 Manutenção da cultura celular	42
4.12.2 Potencial antiproliferativo da secreção de <i>H. crepitans</i> e de peptídeos sintéticos	42
4.13 AVALIAÇÃO DE EFEITOS CITOTÓXICOS E CITOSTÁTICOS EM CÉLULAS CANCEROSAS	44
4.13.1 Preparo das placas e incubação com amostras.....	44
4.13.2 Integridade da membrana plasmática	45
4.13.3 Potencial de membrana mitocondrial	45
4.13.4 Indução de necrose/apoptose	45
4.13.5 Fragmentação de DNA e ciclo celular	45
4.13.6 Estatística.....	46
5. RESULTADOS	47
5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA SECREÇÃO DE <i>Hypsiboas crepitans</i>	47
5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E HEMOLÍTICA DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS DA SECREÇÃO DE <i>Hypsiboas crepitans</i>	53
5.3 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE <i>Hypsiboas crepitans</i> SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFEROS	54
5.4 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE PEPTÍDEOS DE <i>Hypsiboas crepitans</i> E <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFEROS	55
5.5 EFEITOS CITOTÓXICOS E CITOSTÁTICOS DO PEPTÍDEO HCC77(K) SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO	60
5.6 EFEITOS CITOTÓXICOS E CITOSTÁTICOS DO PEPTÍDEO OCELATINA-F1 SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO	66
5.7 ANÁLISE PEPTIDÔMICA DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE <i>Hypsiboas crepitans</i> COLETADA NO BRASIL.....	71
6. DISCUSSÃO	75
7. CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Uma ampla variedade de organismos produz peptídeos antimicrobianos (PAMs) ou *Host Defense Peptides* como parte do seu mecanismo de defesa de primeira linha (Dennison *et al.*, 2005). Estas moléculas estão presentes em praticamente todos os organismos vivos, desde unicelulares até pluricelulares, passando por bactérias, anuros e mamíferos, incluindo o homem (Wang e Wang, 2004; Zasloff, 2002).

Devido a sua relativa importância e aparente implicação nos sistemas de defesa, os PAMs encontram-se abundantemente nos neutrófilos de mamíferos, incluindo o homem, assim como em superfícies mucosas como traqueia e intestino, onde eles podem representar um componente importante dos sistemas de defesa inatos (Devine, 2003).

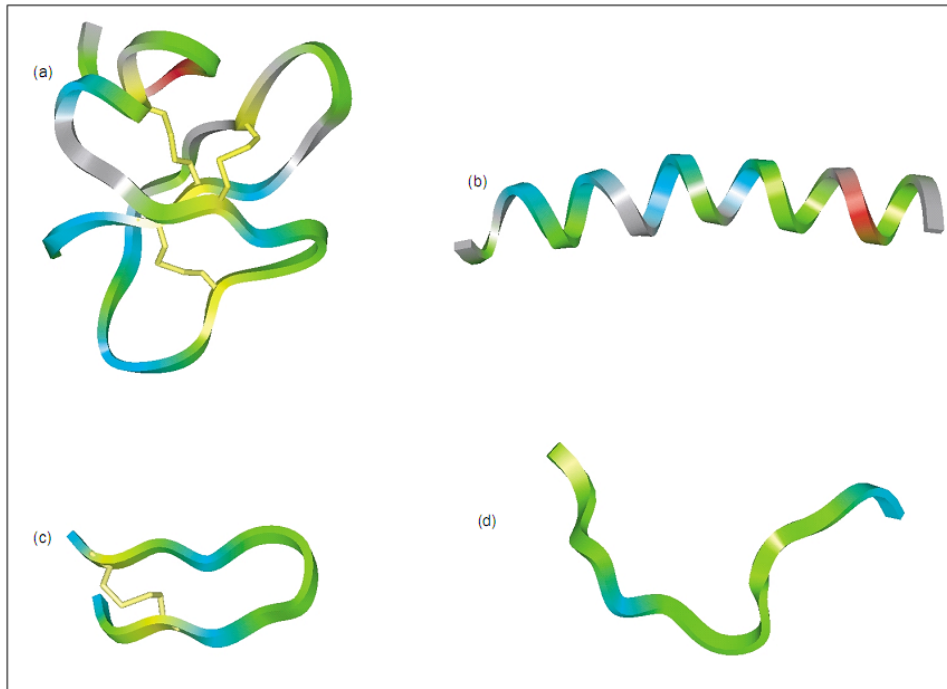
Várias características são compartilhadas pela maioria dos PAMs: são cadeias relativamente curtas, a maioria com 5 a 40 resíduos de aminoácidos; geralmente são catiônicos, apresentando uma carga líquida de +2 a +9 devido à presença de aminoácidos básicos (lisina e arginina); e, além disso, são anfipáticos. Geralmente, os PAMs carecem de estrutura definida em solução; no entanto adquirem configuração tridimensional durante a interação com membranas, apresentando duas regiões bastante distintas: uma hidrofóbica, que inclui as cadeias laterais de aminoácidos apolares (aproximadamente 30 % ou mais dos resíduos presentes na cadeia polipeptídica) e uma hidrofílica com os resíduos polares carregados positivamente (Bond e Khalid, 2010; Hancock, 1997).

PAMs aniônicos, embora menos comuns, também estão presentes em plantas, invertebrados, anfíbios, roedores, ruminantes, e humanos (Harris, Dennison e Phoenix, 2009). Vários destes peptídeos foram isolados de secreções cutâneas ou suas estruturas determinadas a partir de sequências de cDNA de *Xenopus laevis* (Brogden, Ackermann e Huttner, 1997), *Agalychnis annae* e *Agalychnis dacnicolor* (Christian, 1998), *Bombina orientalis* (Miele *et al.*, 1998), *Bombina maxima* (Lai *et al.*, 2002a) e *Rana japonica* (Isaacson *et al.*, 2002).

1.1.1 Classificação dos PAMs

Apesar da sua similaridade, os peptídeos antimicrobianos variam consideravelmente quanto à extensão da cadeia polipeptídica e quanto às estruturas primária e secundária apresentadas. Levando tais características em consideração, Hancock (2001) classificou os PAMs em quatro classes principais: 1) peptídeos que apresentam estruturas em folha β estabilizadas por duas ou três pontes dissulfeto; 2) peptídeos com estrutura em α -hélice anfipática; 3) peptídeos com estrutura estendida e 4) peptídeos com estrutura em alça (*loop*) com a presença de apenas uma ponte dissulfeto (Figura 1). Em concordância com este mesmo critério, Brogden (2005) os agrupou em: 1) peptídeos aniônicos, 2) peptídeos em α -hélices catiônicas lineares, 3) peptídeos catiônicos ricos em aminoácidos específicos, 4) peptídeos aniônicos e catiônicos que contém cisteína e formam pontes dissulfeto e 5) fragmentos de peptídeos aniônicos e catiônicos procedentes de proteínas maiores.

Figura 1 — Principais classes de peptídeos antimicrobianos de acordo com a extensão da cadeia polipeptídica e as estruturas primária e secundária apresentadas.



(a) Peptídeos que apresentam estruturas em folha β estabilizadas por duas ou três pontes dissulfeto; **(b)** peptídeos com estrutura em α -hélice; **(c)** peptídeos com estrutura em alça (*loop*) com a presença de apenas uma ponte dissulfeto e **(d)** peptídeos com estrutura estendida. Retirado de Hancock (2001). As regiões hidrofóbicas estão representadas em verde, enquanto as regiões carregadas, em azul (catiônicas) e vermelho (aniônicas).

1.1.2 Mecanismos de ação dos PAMs

Os mecanismos de ação apresentados pelos PAMs são quase totalmente dependentes de sua interação com a membrana celular das bactérias (Hancock, 2001; Rozek *et al.*, 2000). O acoplamento inicial é produzido pela atração entre o peptídeo e a célula bacteriana, por meio de interações eletrostáticas que podem ocorrer com fosfolipídios (ligando-se preferencialmente aos mais carregados, por exemplo, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e cardiolipina nas membranas bacterianas) (Biggin e Sansom, 1999; Blondelle, Lohner e Aguilar, 1999), lipopolisacarídeos (LPS), presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas; ou grupos carboxila de aminoácidos, ácidos teicóicos e ácidos teicurônicos presentes na camada de peptidoglicano de bactérias Gram-positivas (Jenssen, Hamill e Hancock, 2006; Tossi, Sandri e Giangaspero, 2000). Igualmente os PAMs podem ligar-se a moléculas de ácido siálico na superfície das hemácias (Blondelle, Lohner e Aguilar, 1999).

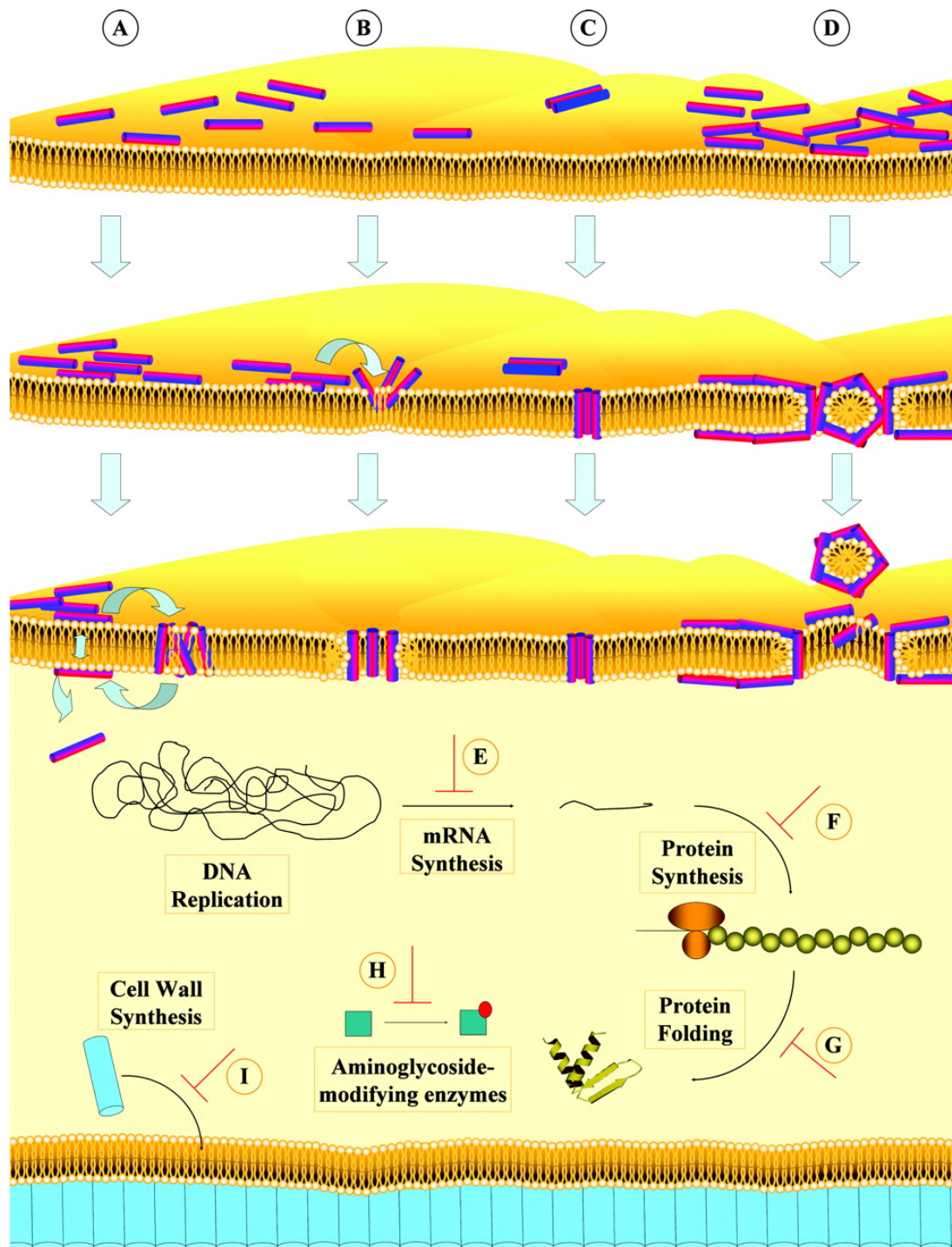
Em qualquer um dos casos, a interação é facilitada por mecanismos que permeabilizam a membrana externa de modo a promover a entrada do peptídeo (autopromoção), podendo ocorrer um dobramento da molécula em estruturas associadas à membrana (Jenssen, Hamill e Hancock, 2006). O mecanismo de autopromoção é mediado pela alta afinidade dos peptídeos catiônicos com LPS, substituindo os cátions nativos Ca^{2+} e Mg^{2+} e interferindo desta forma no funcionamento normal da membrana externa como barreira, que então forma fendas transitórias permitindo assim a passagem de uma grande variedade de moléculas, entre as quais podem estar pequenas proteínas e compostos antimicrobianos, inclusive moléculas do peptídeo antimicrobiano (Hancock, 2001).

Os eventos que ocorrem logo depois na superfície da membrana são objeto de consideráveis debates, sendo que vários modelos procuram explicar a ação dos peptídeos formadores de α -hélice, uma vez que os mecanismos utilizados pelos peptídeos com estruturas em folhas β ainda não foram estudados em profundidade.

Um mecanismo conhecido como modelo do “poro toroidal” (*toroidal pore model*) ou de “buraco de verme” (*wormhole model*) sugere que agregados de peptídeos antimicrobianos se inserem perpendicularmente na membrana para formar um poro, sendo que a membrana curva-se em direção ao centro e forma um buraco com as cabeças dos fosfolipídios apontando nessa direção, enquanto o poro

é delimitado pelas moléculas do peptídeo (Jenssen, Hamill e Hancock, 2006) (Figura 2, B).

Figura 2 — Principais mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos.



(A) Modelo de agregado. **(B)** Modelo do poro toroidal. **(C)** Modelo de ripas de barril. **(D)** Modelo de tapete e posterior efeito detergente. **(E)–(I)** Ação sobre alvos intracelulares. Os peptídeos são mostrados como cilindros com as regiões hidrofílicas em vermelho e as regiões hidrofóbicas em azul. As moléculas de peptidoglicano associadas à parede celular são ilustradas como cilindros de cor turquesa. Retirado de Jenssen, Hamill e Hancock (2006).

Um segundo mecanismo, que envolve também a formação de poros, é conhecido como mecanismo de “ripas de barril” (*barrel-stave model*) e consiste na reorientação dos peptídeos para formar um aglomerado em forma de barril, perpendicular ao plano da membrana. As regiões hidrofóbicas de cada peptídeo associam-se com o núcleo lipídico, enquanto as regiões hidrofílicas apontam para o centro do poro, que aumenta seu diâmetro pelo recrutamento de mais monômeros (Hancock e Chapple, 1999; Jenssen, Hamill e Hancock, 2006) (Figura 2, C).

Em contraste com esses dois mecanismos, o modelo de tapete (*carpet-like model*) (Pouny *et al.*, 1992) propõe que agregados do peptídeo se orientam sobre a membrana plasmática cobrindo sua superfície, organizando-se de forma paralela sobre esta e, em seguida, giram redirecionando os resíduos hidrofóbicos em direção às regiões hidrofóbicas da membrana. Isso causaria a desestabilização da membrana, o que poderia levar à desintegração do empacotamento lipídico (Gazit *et al.*, 1995). A partir de concentrações elevadas, a disposição dos peptídeos poderia mudar, levando a um efeito detergente, com a micelização de porções da membrana e a possível formação de poros (Jenssen, Hamill e Hancock, 2006) (Figura 2, D).

Em um modelo adicional, denominado de “modelo de agregado” (*aggregate model*) (WU *et al.*, 1999), os peptídeos se reorientam para atingir a membrana como um agregado com complexos de peptídeos e lipídios similares a micelas, de modo parecido ao modelo de poro toroidal, mas sem que os peptídeos adotem uma orientação particular (Jenssen, Hamill e Hancock, 2006) (Figura 2, A).

No modelo unificador de Shai-Matsuzaki-Huang, os peptídeos interagem com a superfície da membrana através de interações eletrostáticas, revestindo-a. Em seguida, incorporam-se a ela causando seu estreitamento e produzindo tensão por aumento da superfície. Isto leva à formação de poros transitórios, através dos quais peptídeos e lipídios podem migrar para o interior da célula e atingir alvos intracelulares. Em função das mudanças na estrutura da bicamada, a membrana colapsa em fragmentos, levando à lise (Zaslhoff, 2002).

No mecanismo do tipo detergente proposto por Bechinger e Lohner (2006), os peptídeos revestem a superfície da bicamada lipídica, de modo similar às etapas iniciais do modelo do poro toroidal. Em seguida, a agregação do peptídeo leva a uma concentração local elevada o suficiente, de modo que a natureza anfipática do peptídeo permita-lhe comportar-se como detergente e quebrar a membrana lipídica

em fragmentos pequenos com forma de bicelas ou micelas (Bechinger e Lohner, 2006; Dürr, Sudheendra e Ramamoorthy, 2006).

No modelo da “jangada naufragando” (*sinking raft model*), os PAMs agregam-se lado a lado sobre a membrana, produzindo um desequilíbrio de massas ao longo desta, o que leva a sua curvatura; os peptídeos associados afundam gerando poros transitórios, nos quais os resíduos hidrofóbicos permanecem em contato com as cadeias alifáticas dos lipídios, enquanto as porções hidrofílicas delimitam o poro. Quando a translocação do peptídeo é completada, o equilíbrio de massas se restabelece (Pokorny e Almeida, 2004).

Um modelo interessante e que difere bastante dos já descritos é o modelo de “eletroporação molecular” (Miteva *et al.*, 1999). Segundo esse modelo, os PAMs têm a capacidade de criar uma diferença no potencial elétrico entre as faces da membrana plasmática, causando a formação de poros (Hoskin e Ramamoorthy, 2008). Este processo, que comumente é induzido de forma artificial, é conhecido como eletroporação.

As membranas bacterianas contêm enzimas respiratórias, de modo que o dano causado na membrana poderia levar a alterações na respiração celular, sendo aceitável que a morte não seja causada estritamente pela permeabilização da membrana (Nascimento *et al.*, 2003).

Um grande número de peptídeos transloca-se de um lado ao outro da membrana onde se acumula intracelularmente interferindo com uma grande variedade de processos biológicos podendo mediar a morte celular (Figura 2, E–I). Tais peptídeos podem agir inibindo a síntese de ácidos nucleicos e proteínas, alterando a atividade enzimática, ou interferindo na formação de componentes estruturais, como a parede celular (Brogden, 2005).

A atividade fungicida de muitos peptídeos, isolados majoritariamente de plantas, é também objeto de debates. Os peptídeos antimicóticos variam substancialmente em termos de similaridade estrutural, embora alguns deles tenham tendência a serem ricos em aminoácidos polares e neutros. Sua atividade poderia estar correlacionada com sua habilidade para formar complexos com lipídios (Jenssen, Hamill e Hancock, 2006; López-García *et al.*, 2004). Entre os principais mecanismos propostos encontram-se: a desarmação da estrutura da membrana celular (Jang *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2003; Park, Lee e Hahm, 2004), a danificação da parede celular (Lee *et al.*, 2003), a interação com mitocôndrias (Kavanagh e

Dowd, 2004) e a despolarização do citoesqueleto por despolimerização das fibras de actina (Koo *et al.*, 2004).

Acredita-se que muitos peptídeos antimicrobianos podem atuar por meio de diversos alvos celulares, seja na membrana plasmática ou no meio intracelular. Além disso, a atividade de um mesmo peptídeo com múltiplos organismos distintos poderia ser decorrente de modos de ação distintos (Jenssen, Hamill e Hancock, 2006).

1.1.3 PAMs de anuros

Uma grande quantidade de PAMs pertencentes a diversas famílias já foi isolada a partir de secreções cutâneas de anuros. Esses peptídeos apresentam de 8–46 resíduos de aminoácidos e geralmente adotam estruturas em α -hélice em ambientes similares a membranas biológicas (Conlon *et al.*, 2007).

Uma busca realizada na base de dados Uniprot (The UniProt Consortium, 2015) em 20/08/2016, com as palavras chave: *Antimicrobial* e *Amphibian Defense Peptide*, mostrou um total de 927 peptídeos antimicrobianos isolados da pele de mais de 120 espécies de anuros de 12 famílias (Tabela 1).

Tabela 1 — PAMs de anuros presentes na base de dados Uniprot.

FAMÍLIA	Nº DE ENTRADAS	% DO TOTAL
Ranidae	441	47,57
Bombinatoridae	231	24,92
Phyllomedusidae	106	11,43
Pelodyadidae	75	8,09
Hylidae	15	1,62
Leptodactylidae	15	1,62
Myobatrachidae	13	1,40
Pipidae	11	1,19
Ascaphidae	8	0,86
Dicroglossidae	7	0,76
Hyperoliidae	4	0,43
Rhacophoridae	1	0,11
TOTAL	927	100

Estão apresentadas as contribuições absolutas e relativas por famílias, levando-se em consideração o número de registros (entradas).

A família Ranidae possui o maior número de PAMs reportados, com aproximadamente 48 % das entradas. Nesse táxon já foram descritos mais de 400 peptídeos agrupados em várias famílias bem estabelecidas que incluem: brevininas (Morikawa, Hagiwara e Nakajima, 1992), esculentinas (Simmaco *et al.*, 1993),

ranalexinas (Clark *et al.*, 1994), temporinas (Simmaco *et al.*, 1996), ranatuerinas (Goraya, Knoop e Conlon, 1998), palustrinas (Basir *et al.*, 2000), nigrocinas (Park *et al.*, 2001), japonicinas (Isaacson *et al.*, 2002) e ranaciclinas (Mangoni *et al.*, 2003).

A família Bombinatoridae possui aproximadamente 25 % das entradas, incluindo as bombininas (Csordás e Michl, 1970) e as maximinas (Lai *et al.*, 2002b).

Phyllomedusidae é a terceira família com mais peptídeos reportados (aproximadamente 11 % do total). Nessa família já foram isolados mais de cem peptídeos, incluindo as dermaseptinas (Mor *et al.*, 1991), dermatoxinas (Amiche *et al.*, 2000), filoxinas (Pierre *et al.*, 2000), filoseptinas (Leite *et al.*, 2005), hiposinas (Thompson *et al.*, 2007) e plasticinas (El Amri *et al.*, 2006).

Pelodyadidae é a quarta família com mais peptídeos descritos, incluindo 75 peptídeos pertencentes a diferentes grupos, dentre eles, as aureinas (Rozek *et al.*, 2000), caerinas (Stone *et al.*, 1992) citropinas (Wegener *et al.*, 1999) e maculatinas (Rozek *et al.*, 1998).

Finalmente, as outras oito famílias compreendem 8 % dos peptídeos já identificados, incluindo-se as pseudinas (Olson *et al.*, 2001), hilinas (Castro *et al.*, 2005) e raniseptinas (Magalhães *et al.*, 2008) da família Hylidae; as ocelatinas de Leptodactylidae (Nascimento *et al.*, 2004); as uperinas, riparinas, signiferinas e deserticolinas de Myobatrachidae (Bradford *et al.*, 1996; Jackway *et al.*, 2008); as magaininas e peptídeos XT de Pipidae (Ali *et al.*, 2001; Zasloff, 1987); as ascafinas de Ascaphidae (Conlon *et al.*, 2004); as tigerininas de Dicroglossidae (Sai *et al.*, 2001); os peptídeos kastasina, kasorina-S e senegalina de *Kassina* (Hyperoliidae) (Wang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011) e a proteína histona H2B isolada da pele de *Rhacophorus schlegelii* (Rhacophoridae) (Kawasaki *et al.*, 2003).

É importante ressaltar que, embora seja grande o número de registros encontrados para anuros, uma boa parte dos peptídeos descobertos ainda não foi incluída nos bancos de dados públicos, não estando assim disponível.

1.2 CÂNCER

Câncer é um termo que se refere a mais de cem doenças diferentes que afetam vários tipos distintos de células e tecidos. Todas as formas de câncer são caracterizadas pelo crescimento anormal resultante de um número relativamente pequeno de mutações hereditárias ou induzidas ambientalmente (Hoskin e Ramamoorthy, 2008; Nielsen *et al.*, 2007).

Segundo Hanahan e Weinberg (2000), existem seis características ou propriedades comuns na fisiologia da célula que levam ao desenvolvimento de tumores malignos: 1) autossuficiência, ao gerar seus próprios sinais de crescimento ou responder a sinais de crescimento débeis que usualmente são ignoradas pelas células sadias; 2) insensibilidade aos sinais antiproliferativos; 3) evasão da apoptose; 4) potencial de replicação ilimitado; 5) desenvolvimento permanente de novos vasos sanguíneos (angiogênese) permitindo assim o crescimento do tumor; e 6) capacidade para invadir tecidos e produzir metástases.

O processo de invasão e metástase tem sido esquematizado como uma sequência de etapas discretas conhecidas como *cascata de invasão-metástase*. Essa representação supõe uma sucessão de mudanças na biologia das células, que começa pela invasão do tecido local, seguida de invasão dos vasos linfáticos e sanguíneos próximos, deslocamento das células cancerosas através dos sistemas linfático e circulatório, extravasado de células de câncer no parênquima de tecidos distantes, formação de pequenos nódulos de células cancerosas (conhecidas como micrometástases) e, finalmente, a conversão dessas pequenas lesões em tumores macroscópicos (colonização) (Hanahan e Weinberg, 2011).

1.3 PEPTÍDEOS ANTI-CÂNCER

Muitos PAMs já estão sendo estudados como agentes anticancerígenos, devido ao efeito citolítico que muitos deles causam em bactérias e outros microrganismos. Segundo Papo e Shai (2005), os peptídeos anti-câncer (PACs) possuem características potencialmente desejáveis como novos agentes contra a doença: 1) amplo espectro de atividade, 2) rápida ação, 3) inocuidade às mutações que produzem resistência a quimioterápicos, 4) capacidade de destruir tumores primários ou prevenir sua metástase, 5) baixa toxicidade em órgãos vitais, e 6) efeito sinérgico com os quimioterápicos tradicionais.

Os PACs são praticamente invisíveis ao sistema imune e espera-se que causem efeitos colaterais mínimos ou nulos. Devido ao pequeno tamanho dessas moléculas, eles podem ser vantajosos para a entrega de outros terapêuticos, em virtude da sua efetiva penetração nos tecidos, sua ancoragem específica e sua capacidade de interiorização nas células cancerosas (Shadidi e Sioud, 2003).

Diferenças na membrana plasmática entre células cancerosas e células sadias podem talvez explicar a seletividade de muitos PACs por células malignas.

As células cancerosas tipicamente possuem carga líquida negativa devido à superexpressão de moléculas aniônicas como fosfatidilserina (Dobrzyńska *et al.*, 2005; Utsugi *et al.*, 1991) e mucinas O-glicosiladas (Burdick *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 1996). Acredita-se que as interações eletrostáticas dos PACs catiônicos com tais componentes têm um papel fundamental nessa seletividade, visto que a interação não seria favorecida em células normais, que possuem carga líquida neutra devido à abundância de outros componentes como esfingomiéline, fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina (Zachowski, 1993). Além disso, o potencial de membrana negativo em células malignas parece ser relevante para a atividade de alguns PACs que formam canais iônicos (Cruciani *et al.*, 1991). Células cancerosas também possuem uma maior fluidez de membrana (Sok, Šentjerc e Schara, 1999) e acredita-se que o colesterol tenha um papel importante no aumento desta, o que poderia interferir com a inserção dos peptídeos na membrana (Leuschner e Hansel, 2004). As células malignas também apresentam maior superfície celular devido à presença de microvilosidades, podendo permitir a interação com um número maior de moléculas do PAC (Hoskin e Ramamoorthy, 2008).

Por outra parte, células cancerosas encontram-se sujeitas a um maior estresse oxidativo pela maior produção de radicais superóxido (Hileman *et al.*, 2004), sendo assim mais suscetíveis ao dano por agentes geradores de ROS, como são alguns PAMs e PACs (Cho e Lee, 2011; Hwang *et al.*, 2011; Yoo *et al.*, 1997).

1.4 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PACs

PACs podem agir através de diferentes mecanismos, seja pela morte direta das células cancerosas, pela intervenção em processos enzimáticos e de comunicação celular, ou reativando as funções imunológicas.

Vários peptídeos com atividade necrótica têm atraído a atenção como novos agentes anti-câncer. Embora a sequência destes peptídeos não seja altamente conservada, eles geralmente são curtos, carregados positivamente e capazes de formar estruturas anfipáticas em solventes apolares. Dessa forma podem interagir com a membrana plasmática negativamente carregada e alterá-la por formação de micelas (mecanismo *carpet-like*) ou de poros (mecanismo *barrel-stave*). A consequente perda de homogeneidade por parte da célula resulta na sua morte por necrose (Bhutia e Maiti, 2008; Mader e Hoskin, 2006).

Outro grande número de peptídeos exerce um efeito apoptótico em células de câncer através de mecanismos diversos. Alguns podem perturbar a integridade das membranas mitocondriais causando a liberação de citocromo c, molécula que participa na formação do complexo denominado de apoptosoma, responsável pela ativação de proteínas caspases envolvidas na apoptose (Bhutia e Maiti, 2008; Chen *et al.*, 2001; Bhutia *et al.*, 2008). Assim mesmo, podem interagir com receptores e inibir vias relacionadas com o processo apoptótico (Menon *et al.*, 2007; Mizejewski, Muehlemann e Dauphinee, 2006). Certos peptídeos derivados de proteínas envolvidas na apoptose ou na regulação desta, como a proteína p53, SMAR1 (scaffold/matrix-associated region 1) e p73 são capazes de reativar as vias apoptóticas normais, que se apresentam de forma irregular em muitos tipos de câncer (Wang, Rastinejad e El-Deiry, 2003; Jalota-Badhwar *et al.*, 2007; Bell *et al.*, 2007).

Outros peptídeos atuam bloqueando processos importantes relacionados com o desenvolvimento da doença, podendo competir por sítios ativos de modo que conseguem evitar o crescimento tumoral e a metástase (Stewart *et al.*, 2005; Pasqualini *et al.*, 2000). O bloqueio da progressão também pode acontecer ao afetar interações de moléculas envolvidas na adesão celular (Ruoslahti e Pierschbacher, 1987; Livant *et al.*, 2000) ou através da inibição de enzimas cinases e proteases responsáveis pela metástase (Yasser *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2002). Um bom número de peptídeos exerce atividade antiangiogênica. Este tipo de inibidores pode interferir em várias etapas da formação dos vasos sanguíneos, incluindo: a degradação da membrana basal do endotélio, a proliferação celular no endotélio, e a migração de células (Bhutia e Maiti, 2008; Staton *et al.*, 2004; Hehir *et al.*, 2004; Tjin Tham Sjin *et al.*, 2005).

Finalmente, vários peptídeos demonstraram ter um efeito imunoestimulante, evadindo assim os mecanismos imunossupressores dos tumores. Eles estimulam a ação de macrófagos (Barna *et al.*, 1996; Zhi *et al.*, 2006), linfócitos T (Strelkov *et al.*, 1996) e células *natural killer* (NK) (Chernysh *et al.*, 2002), entre outros.

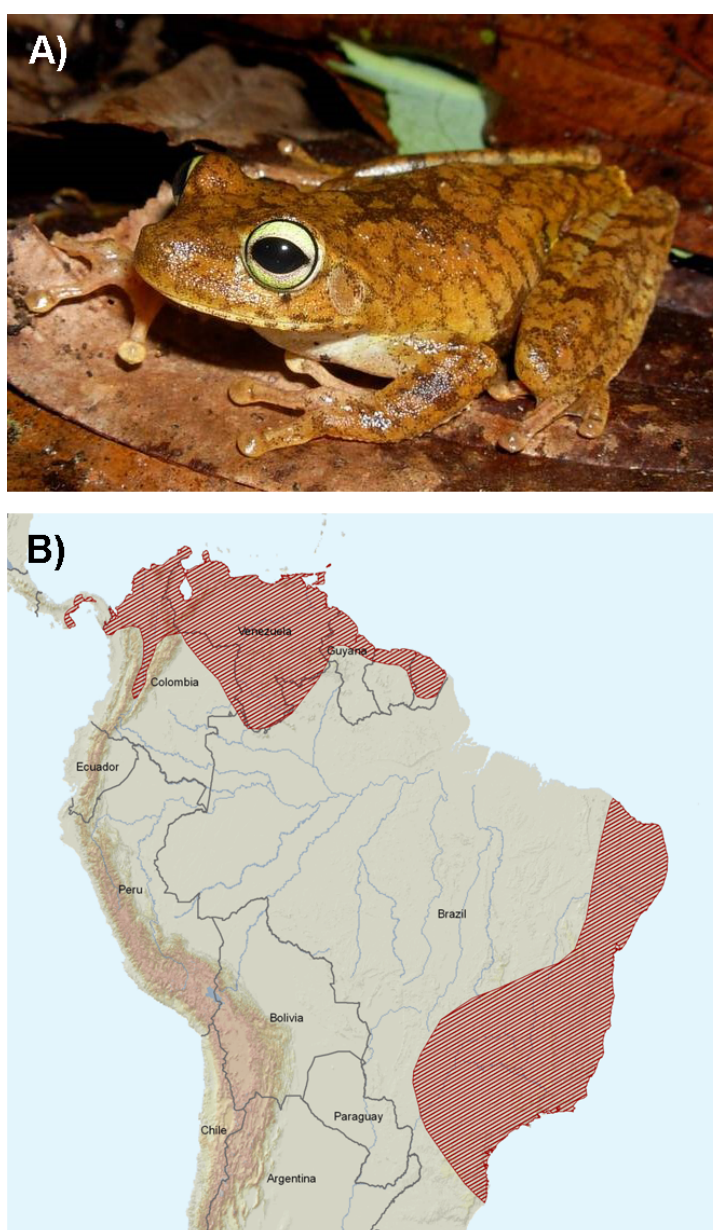
1.5 OBJETOS DE ESTUDO

1.5.1 *Hypsiboas crepitans*

Hypsiboas crepitans (Wied-Neuwied, 1824) é uma espécie de hilídeo (subfamília Cophomantinae) que habita em uma grande variedade de habitats,

incluindo florestas úmidas tropicais, ambientes semi-áridos, pastagens, *llanos*, gramados e florestas montanhosas desde 0 até 2.300 m de altitude (La Marca *et al.*, 2011). Encontra-se desde o Panamá até o sudeste do Brasil, passando pela Colômbia, Venezuela, Trinidad e Tobago, Guiana, Guiana Francesa e Suriname (Figura 3). Sua distribuição inclui duas populações alopátricas, existindo a hipótese de tratar-se de um táxon composto por várias espécies (Kluge, 1979; Martins, Silva e Giaretta, 2009).

Figura 3 — *Hypsiboas crepitans* (Wied-Neuwied, 1824).



A) Fotografia de um indivíduo típico. De: Mauricio Rivera Correa. **B)** Distribuição geográfica, destacando-se em vermelho as áreas onde a espécie existe nativamente. Retirado de La Marca *et al.* (2011).

É uma espécie arbórea e noturna, encontrando-se em arbustos, folhas de árvores e outros tipos de vegetação, perto da borda de correntes de água e, ocasionalmente, no chão. A reprodução ocorre em poças temporárias no início da estação chuvosa. É possível encontrar essa espécie em ambientes severamente degradados, incluindo áreas urbanas e moradias humanas rurais (La Marca *et al.*, 2011).

1.5.2 Ocelatina-F1 e G16OCP1

Ocelatina-F1 e G16OCP1 são peptídeos catiônicos de 25 resíduos, originalmente isolados a partir das secreções cutâneas de *Leptodactylus fallax* Müller, 1926 (Rollins-Smith *et al.*, 2005) e *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824) (Prías-Márquez, 2012), respectivamente (Figura 4). Fazem parte da família das ocelatinas, junto a mais de vinte peptídeos descritos, a maioria dos quais possui atividade antimicrobiana e, em alguns casos, hemolítica ou citotóxica.

A ocelatina-F1 (originalmente descrita como falaxina) tem sido encontrada também em secreções da pele de *L. pentadactylus* e *L. labyrinthicus* (King *et al.*, 2005; Libério, 2008). Possui uma massa molecular média de 2548,1 Da e sequência: ¹**GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL**²⁵-NH₂. Estudos empregando dicroísmo circular sugerem que este peptídeo adota conformação em α -hélice em presença de lipossomos e solventes estabilizadores de estrutura secundária (Nielsen *et al.*, 2007).

A ocelatina-F1 tem se mostrado ativa contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae* em concentrações abaixo dos 100 μ M. Além disso, em um estudo realizado por Libério (2008), a ocelatina-F1 também inibiu o crescimento das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. No entanto, esse peptídeo parece ser inativo sobre leveduras da espécie *Candida albicans* e possui fraca atividade hemolítica, como se mostra na Tabela 2.

Um estudo prévio sugere que a ocelatina-F1 tem efeito citotóxico sobre células de câncer de mama humano e melanoma murino (Prías-Márquez, 2010).

Por outro lado, G16OCP1 é, até o momento, o único peptídeo secretado descrito exclusivamente para *L. labyrinthicus* (Prías-Márquez, 2012). Esse peptídeo possui uma massa molecular média de 2512,1 Da e sequência: ¹**GLLDTLKGAAKNVVGGGLASKVMEKL**²⁵-NH₂, que difere da sua isoforma, o peptídeo ocelatina-P1, por uma única substituição conservativa (Ser¹⁶→Gly). Este

peptídeo já foi objeto de estudos estruturais, onde se observou que adota uma conformação em α -hélice em contato com solventes estabilizadores de estrutura secundária e membranas biológicas miméticas (Prías-Márquez, 2012; Alves, 2012).

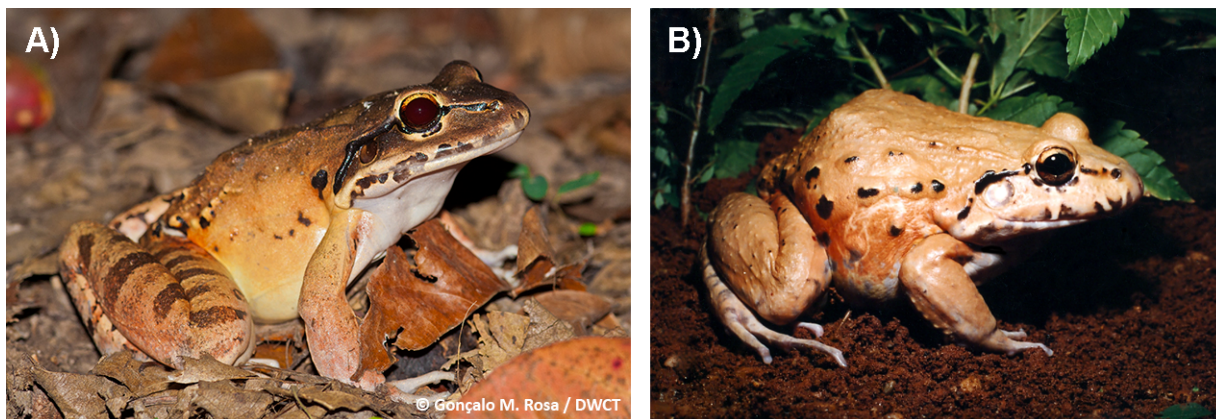
O peptídeo G16OCP1 apresenta atividade moderada contra os bacilos Gram-negativos *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (MIC = 32 μ M). Também possui atividade, ainda que mais fraca, contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (MIC = 128 μ M) e não produz hemólise em eritrócitos humanos em concentrações até 128 μ M (Prías-Márquez, 2012).

Tabela 2 — Comparação dos valores de MIC e HC₅₀ obtidos para o peptídeo ocelatina-F1 em diferentes estudos.

MICROORGANISMO / CÉLULA	MIC (μ M)		
	Peptídeo Nativo		Peptídeo Sintético
	Rollins-Smith <i>et al.</i> (2005)	Libério (2008)	Nielsen <i>et al.</i> (2007)
<i>Escherichia coli</i>	40 ^a	32 ^a	100 ^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80 ^b	64 ^b	S/A ^{b*}
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	80 ^c	N/D	100 ^d
<i>Enterobacter cloacae</i>	20 ^e	N/D	N/D
<i>Proteus mirabilis</i>	>160 ^f	N/D	N/D
<i>Staphylococcus aureus</i>	S/A ^{g#}	32 ^k	S/A ^{h,i,j*}
<i>Bacillus subtilis</i>	N/D	16	N/D
<i>Candida albicans</i>	S/A [#]	N/D	N/D
Eritrócitos Humanos [HC ₅₀]	>200 (8)	>128 (9)	S/A [§]

Cepas bacterianas usadas: ^aATCC 25922, ^bATCC 27853, ^cKK3 9904, ^dATCC 700603, ^eNHTCC 53001, ^fATCC 25933, ^gNCTC 8325, ^hATCC 33591 (MSSA), ⁱATCC 29213 (MRSA), ^jATCC 700699MU50 (VISA), ^kATCC 25923, ^lATCC 19659. N/D: Não determinado. *Até 100 μ M, #Até 160 μ M, §Até 50 μ M. (O valor entre parêntesis indica o percentual de hemólise obtido na máxima concentração testada no ensaio).

Figura 4 — Indivíduos do género *Leptodactylus*, fonte de peptídeos da família das ocelatinas.



A) *Leptodactylus fallax* Müller, 1926. Foto: Gonçalo M. Rosa. **B)** *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824). Foto: Antonio Sebben.

2. JUSTIFICATIVA

Segundo dados da OMS, as doenças infecciosas são a segunda causa de morte no mundo atrás apenas das doenças cardiovasculares, tendo sido responsáveis por aproximadamente 16 % das mortes em 2004 (World Health Organization, 2008). Dentro desse contexto, as infecções respiratórias foram a segunda causa de morte prematura no ano 2012 (World Health Organization, 2014).

Estima-se que, em média, a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos anti-infecciosos leva de 10 a 20 anos (World Health Organization, 2000). Nas últimas décadas, o progresso nessa área tem sido pequeno, sendo que entre 1983 e 2003 surgiram apenas duas classes novas de antibióticos e apenas nove agentes antibacterianos foram aprovados pela FDA (Spellberg *et al.*, 2004). É por isso que a busca por novos medicamentos é uma das ações prioritárias de modo a permitir o controle da resistência a doenças infecciosas.

De outro lado, o câncer é a terceira causa de mortalidade, sendo responsável por aproximadamente 13 % dos óbitos em 2004. Em 2012, houve 14,1 milhões de casos novos e 8,2 milhões de pessoas morreram de câncer nesse mesmo ano (Ferlay *et al.*, 2013).

Embora muitos cânceres localizados possam ser tratados com cirurgia ou radioterapia, a quimioterapia continua sendo o tratamento de escolha para estágios avançados ou metastásicos da doença (Espinosa *et al.*, 2003). No entanto, o uso de quimioterápicos convencionais pode estar associado a efeitos colaterais nocivos causados pelo dano indesejável a células e tecidos saudáveis (Kalyanaraman *et al.*, 2002; Cassidy e Misset, 2002).

Os resultados de diversas pesquisas demonstram que os peptídeos antimicrobianos (PAMs) ou *host defense peptides*, presentes na maioria dos organismos vivos, bem como seus derivados sintéticos, são ativos contra uma grande variedade de microrganismos, sendo efetivos não apenas contra bactérias, mas também contra vírus, como o HIV (Lorin *et al.*, 2005; VanCompernelle *et al.*, 2005) e *herpes simplex* (Albiol Matanic e Castilla, 2004; Belaid *et al.*, 2002); protozoários, como os agentes causadores da malária (Dagan *et al.*, 2002; Efron *et al.*, 2002; Kückelhaus *et al.*, 2009), da leishmaniose (Kückelhaus *et al.*, 2009; McGwire e Kulkarni, 2010), da doença de Chagas (Huang, Chen e Zierdt, 1990; McGwire e Kulkarni, 2010) e da criptosporidíase (Giacometti *et al.*, 2001); e fungos

como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* (Simmaco *et al.*, 1994) e *Batrachochytrium dendrobatidis* (Rollins-Smith e Conlon, 2005; Woodhams *et al.*, 2006a; Woodhams *et al.*, 2006b). Diversas pesquisas mostram também que alguns PAMs são ativos contra uma grande variedade de células cancerosas (Hoskin e Ramamoorthy, 2008).

Os anuros (sapos, rãs e pererecas) constituem uma fonte riquíssima de PAMs, sendo que já foram reportados até mais de uma centena deles em uma única espécie (Li *et al.*, 2007). Estudos relacionados com o isolamento e a caracterização destas moléculas sugerem a possibilidade de desenvolver drogas sintéticas com propriedades melhoradas, a partir das estruturas originais identificadas em tais animais (Coote *et al.*, 1998; Castro, Cilli e Fontes, 2006; Porat *et al.*, 2006; Shalev *et al.*, 2006).

Os PAMs também têm despertado grande interesse nos últimos anos visando a produção de plantas transgênicas de interesse comercial com resistência melhorada a patógenos (Cardoso *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2010; Coca *et al.*, 2006; Xing *et al.*, 2006; Chakrabarti *et al.*, 2003). A pesquisa com peptídeos extraídos da pele de anuros também tem contribuído com o entendimento de aspectos da fisiologia destes animais (Rouillé *et al.*, 1989), assim como da sua filogenia (Conlon, Kolodziejek e Nowotny, 2004).

Até o momento são poucos os peptídeos bioativos identificados em secreções de anuros dos grupos estudados (gêneros *Hypsiboas* e *Leptodactylus*). No entanto, estudos recentes têm permitido avanços no conhecimento da estrutura e atividade biológica desses peptídeos (Prates *et al.*, 2004; Libério *et al.*, 2011; Alves, 2012).

Ao mesmo tempo, a descoberta e o conhecimento de substâncias de interesse médico e biotecnológico em espécies vulneráveis, como é a grande maioria dos anfíbios, constitui um incentivo em favor da conservação destes animais, assim como dos recursos genéticos dos países neotropicais, considerando-se os benefícios econômicos que podem derivar dessas pesquisas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

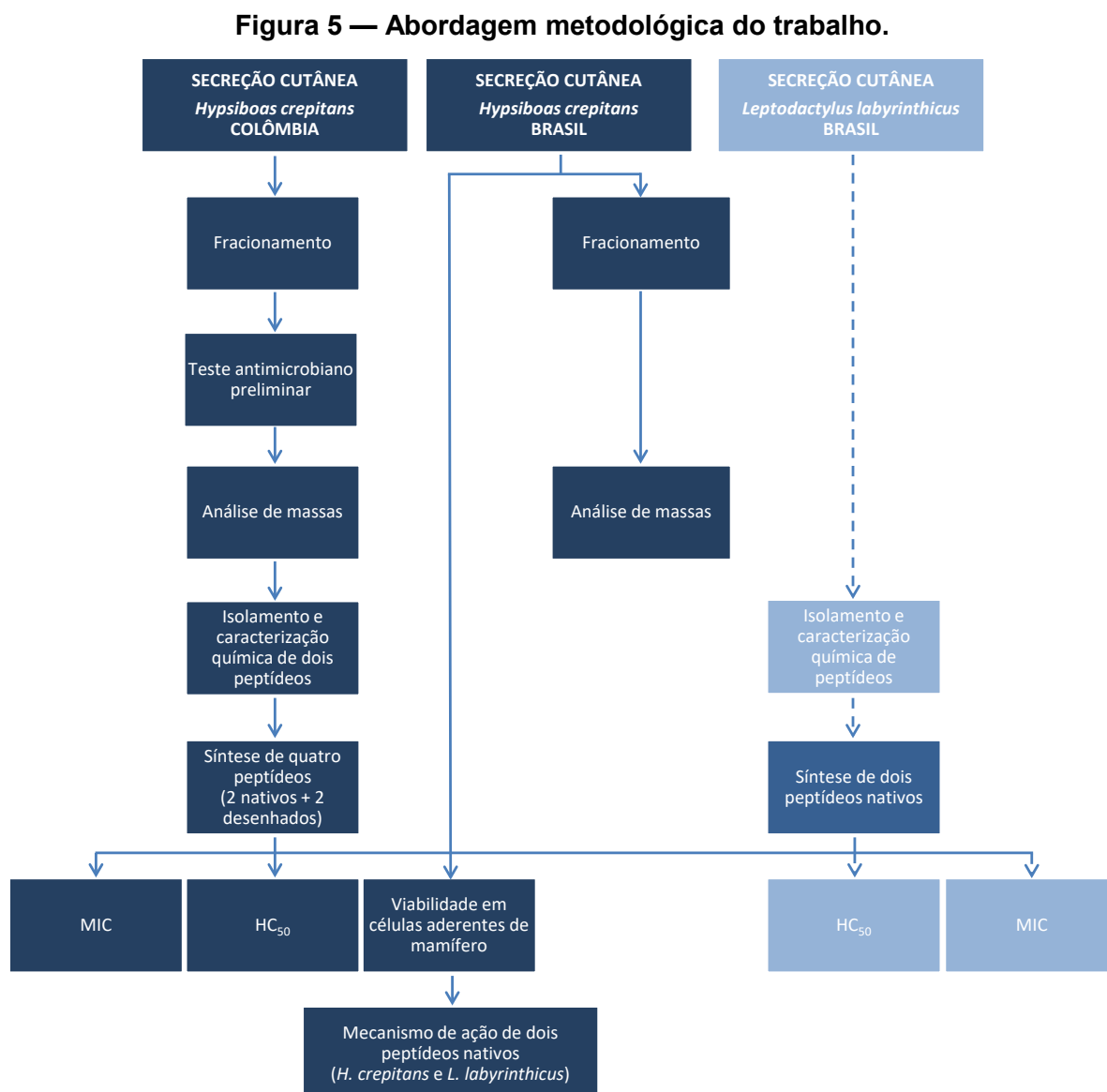
Avaliar a atividade antitumoral da secreção cutânea de *Hypsiboas crepitans*, bem como as atividades antimicrobiana e antitumoral de peptídeos isolados das secreções cutâneas de *Hypsiboas crepitans* e *Leptodactylus labyrinthicus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fracionar a secreção cutânea de *H. crepitans* com o emprego de RP-HPLC e avaliar a atividade antimicrobiana das frações cromatográficas obtidas.
- Isolar e caracterizar quimicamente peptídeos antimicrobianos (PAMs) a partir da secreção cutânea de *H. crepitans*.
- Determinar as concentrações efetivas hemolíticas (HC₅₀) e antimicrobianas (MIC) de PAMs sintéticos da secreção cutânea de *H. crepitans*.
- Avaliar a atividade antiproliferativa da secreção cutânea de *H. crepitans* sobre diferentes linhagens de células cancerosas.
- Avaliar a atividade antiproliferativa de PAMs sintéticos da secreção cutânea de *H. crepitans* e *L. labyrinthicus* sobre linhagens de células cancerosas.
- Estudar o mecanismo de ação antitumoral de PAMs sintéticos das secreções cutâneas de *H. crepitans* e *L. labyrinthicus* através da avaliação de seus efeitos citotóxicos e citostáticos em linhagens de células cancerosas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A abordagem metodológica geral deste trabalho encontra-se ilustrada a seguir (Figura 5).



Em azul escuro estão apresentadas as etapas correspondentes ao presente projeto. Ilustram-se em azul claro as etapas metodológicas provenientes de um trabalho anterior, sendo que foi necessária uma nova etapa de síntese dos peptídeos de *L. labyrinthicus* para execução deste trabalho.

4.1 REAGENTES E CÉLULAS

Todos os experimentos foram realizados com reagentes comerciais de grau analítico, utilizando apenas água ultrapura tipo I (Milli-Q[®], Merck Millipore, EUA) para

o preparo das soluções. Os solventes empregados nas etapas cromatográficas foram todos de grau HPLC, de diversos fornecedores.

As cepas bacterianas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) foram adquiridas no Banco de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas/SP).

Cepas das leveduras *Candida albicans* (ATCC 14053), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do LACEN-DF.

As linhagens celulares NIH-3T3 (fibroblasto murino, ATCC CRL-1658), B16-F10 (melanoma murino, ATCC CRL-6475), MCF-7 (câncer mamário humano, ATCC HTB-22) e HeLa (câncer cervical humano, ATCC CCL 2) foram obtidas no banco de células American Type Culture Collection (ATCC).

4.2 COLETA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA SECREÇÃO CUTÂNEA

Adultos de *Hypsiboas crepitans* de ambos os sexos foram capturados por reconhecimento visual e acústico nos municípios de Ibagué/Tolima, Colômbia¹ e Santana do Riacho/MG, Brasil². A secreção cutânea foi obtida por estimulação elétrica da pele, lavando-se em seguida com água destilada em abundância, como proposto por Tyler, Stone e Bowie (1992). Após a coleta, as amostras foram mantidas congeladas em tubos de polipropileno e posteriormente liofilizadas e armazenadas a -20 °C. Nenhum animal foi sacrificado durante o procedimento, sendo estes liberados no próprio local de coleta após reassumirem seu comportamento habitual.

4.3 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA SECREÇÃO BRUTA DE *H. crepitans*.

Alíquotas de aproximadamente 5,0 mg de secreção bruta de *H. crepitans* coletadas na Colômbia foram dissolvidas em 220 µL de 0,1 % (v/v) TFA/água

¹ Resolución N° 1286 de 22/08/2008, CORTOLIMA, Colômbia; Resolución N° 3533 de 23/12/2009, CORTOLIMA, Colômbia; Resolución No. 0744 de 20/04/2010, MAVDT, Colômbia; Permiso de Exportación N° 02673 de 07/05/2010, MAVDT, Colômbia.

² Autorização N° 17682-1 de 17/03/2011, SISBIO/ICMBio/MMA, Brasil.

(solvente A), centrifugadas por 5 min a 16.100 g e o sobrenadante submetido a RP-HPLC em um cromatógrafo líquido Prominence LC-20AT (Shimadzu Corporation, Japão) utilizando uma coluna C₁₈ (Vydac 218TP54; 4,6 × 250 mm) previamente equilibrada com solvente A. A eluição foi realizada com fluxo de 1,0 mL/min utilizando-se um gradiente linear de 0,1 % (v/v) TFA/acetonitrila (solvente B), como descrito a seguir: 0 % de solvente B por 5 min, 0–55 % de solvente B em 55 min, 55–100 % de solvente B em 5 min, e 5 min com 100 % de solvente B. As frações foram coletadas manualmente, monitorando a absorbância em 216 nm. Tais frações foram secadas a vácuo e armazenadas a -20 °C para análises posteriores.

4.4 ENSAIO ANTIBACTERIANO PRELIMINAR

O ensaio antibacteriano foi baseado no protocolo de Castro *et al.* (2009). Cepas referenciais das bactérias Gram-negativas: *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* e Gram-positivas: *S. aureus* e *S. epidermidis* foram utilizadas em ensaios preliminares, a fim de avaliar a atividade inibitória das diferentes frações cromatográficas eluídas a partir do fracionamento da secreção de *H. crepitans*. As linhagens bacterianas foram descongeladas do estoque e cultivadas sob agitação em meio Mueller-Hinton estéril, a 37 °C por aproximadamente 18 h até a obtenção de culturas com densidade óptica igual a 1,0 em 590 nm. As bactérias em fase logarítmica foram suspensas no mesmo meio de cultura nas proporções de 1:50 para Gram-negativas e 1:100 para Gram-positivas.

As frações secas, resultantes da reunião de uma a três corridas cromatográficas realizadas com a secreção bruta, foram ressuspensas em 200 µL de água Milli-Q. Alíquotas de 50 µL de cada fração foram incubadas em microplacas de fundo plano de 96 poços com 50 µL de suspensão bacteriana (contendo de 2 a 7 × 10⁵ UFCs) durante 20–24 h a 37 °C.

A taxa de inibição da proliferação bacteriana foi determinada pela leitura da densidade óptica a 595 nm empregando-se uma leitora de placas Multiskan[®] FC (Thermo Scientific, EUA). Como controle de crescimento pleno foram utilizados 50 µL de água Milli-Q estéril + 50 µL da suspensão de bactérias. Como controle da ausência de crescimento foram empregados 50 µL de formaldeído (0,4 %, v/v) + 50 µL da suspensão de bactérias. Consideraram-se ativas aquelas frações que reduziram a proliferação bacteriana em pelo menos 25 % com relação ao controle.

4.5 ENSAIO ANTIFÚNGICO PRELIMINAR

Cepas referenciais das leveduras *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* foram cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose durante 24 h a 35 °C. Colônias frescas foram então suspensas em 5 mL de meio líquido BHI fresco e mantidas sob agitação por aproximadamente 18 h até a obtenção de culturas com densidade óptica igual a 1,0 em 590 nm. As leveduras em fase logarítmica foram diluídas no mesmo meio de cultura na proporção 1:100.

Frações cromatográficas secas da secreção cutânea de *H. crepitans*, resultantes da realização de uma única corrida cromatográfica, foram ressuspensas em 150 µL de água Milli-Q. Alíquotas de 50 µL de cada fração foram incubadas a 35 °C em microplacas de fundo chato de 96 poços com 50 µL de suspensão de leveduras (contendo aproximadamente 2×10^3 UFCs).

A taxa de inibição da proliferação celular foi determinada após 24 e 48 h de incubação, pela leitura da densidade óptica em 595 nm, empregando-se uma leitora de placas Multiskan[®] FC (Thermo Scientific, EUA). Como controle de crescimento pleno foram utilizados 50 µL de água Milli-Q estéril + 50 µL da suspensão de leveduras. Como controle da ausência de crescimento foram empregados 50 µL de formaldeído (0,4 %, v/v) + 50 µL da suspensão de leveduras. Consideraram-se ativas aquelas frações que reduziram a proliferação das leveduras em pelo menos 25 % com relação ao controle.

4.6 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As frações cromatográficas capazes de inibir a proliferação de bactérias ou fungos foram analisadas em um espectrômetro de massas Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, EUA). Cada fração cromatográfica foi ressuspensa em 0,1 % (v/v) TFA/água e aplicada na proporção 1:1 em uma placa de aço inoxidável junto com matriz CHCA reconstituída a 20 µg/mL em 50 % de acetonitrila. O equipamento foi previamente calibrado utilizando-se uma mistura de angiotensina II (Mr = 1047,19), angiotensina I (Mr = 1297,49), substância P (Mr = 1348,64), bombesina (Mr = 1620,86) e fragmento 18–39 de hormônio adrenocorticotrópico (Mr = 2466,68). As amostras foram analisadas na faixa de m/z 700–4000 no modo refletor de íons positivos.

Frações cromatográficas obtidas pelo fracionamento da secreção cutânea de *H. crepitans* coletada no Brasil foram também analisadas utilizando-se os mesmos procedimentos.

4.7 PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DE INTERESSE

Duas frações obtidas da secreção cutânea de *H. crepitans* que apresentaram atividade antimicrobiana relevante foram acumuladas a partir de várias corridas cromatográficas. Após secagem em um evaporador rotativo, cada uma das frações foi dissolvida em 0,1 % (v/v) TFA (solvente A), centrifugada por 5 min a 16.100 g e o sobrenadante submetido a uma nova etapa de RP-HPLC em um cromatógrafo líquido Prominence LC-20AT (Shimadzu Corporation, Japão) utilizando uma coluna Vydac 218TP54 (4,6 × 250 mm) com fluxo de 1 mL/min. Para essa nova etapa foram implementados ajustes no gradiente de acetonitrila, de acordo com o tempo de eluição de cada uma das frações da cromatografia semipreparativa.

4.8 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FRAÇÕES DE INTERESSE

4.8.1 Determinação das estruturas primárias

Para determinação das estruturas primárias, os peptídeos purificados foram submetidos à degradação de Edman (Edman, 1950) em um sequenciador automático de proteínas modelo PPSQ-21 (Shimadzu Corporation, Japão), de acordo com as orientações do fabricante. Os PTH-aminoácidos foram identificados utilizando-se uma coluna de fase reversa PTH-C₁₈ acoplada a um equipamento de HPLC modelo LC20 (Shimadzu Corporation, Japão). O sistema cromatográfico foi calibrado com padrões dos PTH-aminoácidos antes de cada análise.

4.8.2 Análises computacionais

A massa monoisotópica teórica foi calculada a partir da sequência com a ferramenta *Compute pI/Mw* (Gasteiger *et al.*, 2005) disponível em http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html.

Foi utilizado o algoritmo PSI-Blast (Altschul *et al.*, 1997) para realizar uma busca usando a base de dados de sequências proteicas não-redundantes do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). O *Clustal Omega* (Sievers *et al.*, 2011) foi empregado para o alinhamento múltiplo de sequências peptídicas (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

A predição de estrutura secundária foi realizada através do servidor web NPS@ (Combet *et al.*, 2000) com o emprego do algoritmo SOPMA: (Geourjon e Deléage, 1995), utilizando os parâmetros padrão *Similarity threshold: 8* e *Window width: 17* (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html). Utilizou-se a ferramenta *NetWheels* (<http://lbqp.unb.br/NetWheels>) para analisar a distribuição e interação de resíduos em α -hélice, de acordo com os métodos de Schiffer e Edmundson (1967) e Dunnill (1968).

Finalmente foi empregado o servidor web HeliQuest (Gautier *et al.*, 2008) disponível em <http://heliquet.ipmc.cnrs.fr> para o cálculo dos parâmetros de Hidrofobicidade Média $\langle H \rangle$ (Fauchère e Pliška, 1983) e Momento Hidrofóbico Médio $\langle \mu H \rangle$ (Eisenberg, Weiss e Terwilliger, 1982).

4.9 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Dois peptídeos, isolados da secreção cutânea de *H. crepitans*, assim como dois análogos projetados a partir da sequência de um deles foram produzidos em sintetizador automático por empresa especializada. Também foram produzidos pela mesma empresa os peptídeos ocelatina-F1 e G16OCP1, respectivamente isolados e descritos em trabalhos prévios a partir das secreções cutâneas de *L. fallax* e *L. Labyrinthicus*. Após a purificação, a identidade dos peptídeos sintéticos foi confirmada por espectrometria de massas seguindo o método descrito na seção 4.6.

4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC)

Cepas das bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*), bem como das leveduras *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* foram descongeladas do estoque e cultivadas sob agitação em meio Mueller-Hinton estéril (bactérias) ou BHI (leveduras) a 37 °C por aproximadamente 18 h, até a obtenção de culturas com densidade óptica igual a 1,0 em 590 nm. As células em fase logarítmica foram diluídas no mesmo meio de cultura nas proporções de 1:50 para as bactérias Gram-negativas e 1:100 para as bactérias Gram-positivas e leveduras.

Foram preparadas diluições seriadas em triplicata dos peptídeos sintéticos HCC76, HCC77(K), HCC77(K)1 e HCC77(K)2 a partir de uma solução estoque de 256 μ M esterilizada por filtração em filtros de PVDF de 0,22 μ m (Millex-GV 13 mm,

Merck Millipore, EUA). Os peptídeos HCC77(K), HCC77(K)1 e HCC77(K)2 foram diluídos em água, enquanto HCC76 foi diluído em 1,6 % (v/v) DMSO.

Alíquotas de 50 µL de cada diluição foram incubadas em microplacas de fundo chato de 96 poços com 50 µL de suspensão de células (contendo de 2 a 7×10^5 UFCs para bactérias e 2×10^3 UFCs para leveduras) durante 20–24 h a 37 °C. Após esse período, as placas foram analisadas a 595 nm em uma leitora de placas Multiskan[®] FC (Thermo Scientific, EUA). Como controle de crescimento pleno foram utilizados 50 µL de água Milli Q estéril + 50 µL da suspensão de células. Como controle da ausência de crescimento foram empregados 50 µL de água Milli Q estéril + 50 µL de meio Mueller Hinton (bactérias) ou BHI (leveduras) estéril. Também foram empregados cloranfenicol e vancomicina para comparação dos efeitos antibacterianos dos peptídeos.

Em todos os casos, a Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi definida como a menor concentração do peptídeo na qual não foi observada proliferação celular detectável pela leitura espectrofotométrica.

4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA (HC₅₀)

Hemácias humanas, provenientes de sangue tipo O⁺ de doador saudável, foram separadas do plasma por sedimentação e lavadas três vezes com tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M (tampão-salino). Esse mesmo tampão foi empregado para preparar uma suspensão 1 % (v/v) de hemácias, e na solubilização e diluição do peptídeo HCC77(K). O peptídeo HCC76 foi dissolvido em uma solução de 1,6 % DMSO/tampão-salino, e a mesma solução foi usada para sua diluição.

Diluições seriadas dos dois peptídeos (100 µL) foram incubadas em triplicata com 100 µL da suspensão de hemácias durante 1 h a temperatura ambiente. A faixa de concentração empregada variou de 128–0,06 µM para as duas moléculas.

Como referência para 100 % de hemólise foram empregados 100 µL da suspensão de hemácias incubados com 100 µL de 1 % (v/v) Triton X-100/tampão-salino. Como referência para 0 % de hemólise foram utilizados 100 µL da suspensão de hemácias incubados com 100 µL de tampão-salino.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 1.441 g por 2 min. Alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes foram transferidas para microplacas de 96 poços e analisadas quantificando a absorbância em 405 nm com o uso de uma

leitora Multiskan® FC (Thermo Scientific, EUA). A quantidade de hemólise foi avaliada baseando-se na fórmula usada por Oguiura *et al.* (2011):

$$\frac{A_{405 \text{ peptídeo}} - A_{405 \text{ tampão}}}{A_{405 \text{ Triton}} - A_{405 \text{ tampão}}} \times 100$$

Com os dados obtidos foi elaborada uma curva hemólise vs concentração. A concentração hemolítica 50 (HC₅₀), definida como aquela capaz de produzir hemólise em quantidade equivalente a 50 % da resposta hemolítica máxima, foi calculada através de regressões não lineares, utilizando-se o software Prism v5.03 (Graphpad Software, EUA).

4.12 AVALIAÇÃO DE EFEITOS NA VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

4.12.1 Manutenção da cultura celular

Células da linhagem de células normais NIH-3T3 e de células de câncer B16-F10, e MCF-7 foram descongeladas do nitrogênio líquido e incubadas em estufa a 37 °C com 5 % CO₂, em garrafas de cultura contendo meio comercial DMEM (Invitrogen, EUA) suplementado com soro fetal bovino 10 % e antibiótico penicilina/estreptomicina 1 % (DMEM completo). Após 24 h o meio de cultura foi trocado por meio fresco e as células foram mantidas nas mesmas condições até atingir um 85–100 % de confluência.

4.12.2 Potencial antiproliferativo da secreção de *H. crepitans* e de peptídeos sintéticos

Células das diferentes linhagens normais e cancerosas foram cultivadas até atingir 85–100 % de confluência. As células foram soltas da garrafa de cultura incubando com tripsina (3–5 min, 37 °C) detendo em seguida a reação por adição de DMEM completo. Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada por 2 min a 1.341 g e o precipitado reconstituído em DMEM completo. O número de células viáveis foi determinado pelo método de exclusão do azul de tripano, utilizando-se uma câmera de Neubauer. Alíquotas de 200 µL/poço da suspensão de células foram colocadas em microplacas de fundo chato de 96 poços. Utilizaram-se 7 × 10³ células/poço para a linhagem B16-F10 e 8 × 10³ células/poço para as outras linhagens celulares. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5 % CO₂ por 20–24 h.

Para avaliação de efeitos sobre a viabilidade celular, a secreção cutânea de indivíduos de *H. crepitans* coletados no Brasil, assim como diferentes peptídeos sintéticos derivados da secreção de *H. crepitans* (HCC76, HCC77(K), HCC77(K)1 e HCC77(K)2) e *L. labyrinthicus* (ocelatina-F1 e G16OCP1) foram aliquotados por pesagem direta em balança analítica (peso seco), dissolvidos em DMEM completo e filtrados em filtros de PVDF de 0,22 μm (Millex-GV 13 mm, Merck Millipore, EUA) imediatamente antes da sua utilização. O mesmo procedimento foi realizado com o peptídeo sintético HCC76, porém, utilizando-se 0,8 % (v/v) DMSO/DMEM completo para a solubilização da amostra. Em seguida foram realizadas diluições seriadas utilizando-se o mesmo veículo empregado para solubilizar cada amostra; para os ensaios realizados com a secreção bruta, as diluições foram de 500 até 3,91 $\mu\text{g/mL}$; para os ensaios com peptídeos sintéticos foram preparadas diluições a partir de 256 μM .

Após a incubação, o meio de cultura foi retirado com uma micropipeta, sendo imediatamente substituído com triplicatas (200 μL) de cada uma das diluições de secreção bruta ou peptídeo. Como controle de proliferação plena, o meio de três poços foi substituído por 200 μL de DMEM completo fresco ou 0,8 % (v/v) DMSO/DMEM para o peptídeo HCC76. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5 % CO_2 .

Após 24 h de incubação, o meio de todos os poços foi retirado e substituído com 150 μL de meio DMEM completo contendo 10 % de MTT 5 mg/mL. A placa foi incubada protegida da luz durante 3 h. Após este tempo, o meio foi retirado e substituído com 100–200 μL de DMSO de modo a permitir a solubilização dos cristais de formazan produzidos pela redução do MTT em células viáveis.

As placas foram lidas rapidamente em uma leitora Multiskan[®] FC (Thermo Scientific, EUA) a 595 nm para quantificar o formazan. A partir dos dados obtidos foram elaboradas curvas de inibição e calculados os valores de IC_{50} e IC_{75} (concentrações capazes de reduzir a absorbância em quantidade equivalente a 50 e 75 % da resposta máxima, respectivamente) através de regressões não lineares com emprego do *software* Prism v5.03 (Graphpad Software, EUA).

4.13 AVALIAÇÃO DE EFEITOS CITOTÓXICOS E CITOSTÁTICOS EM CÉLULAS CANCEROSAS

Os peptídeos sintéticos ocelatina-F1 e HCC77(K) foram escolhidos para avaliar de forma mais específica os efeitos citotóxicos e citostáticos sobre a linhagem tumoral B16-F10, que apresentara a maior susceptibilidade nos ensaios de viabilidade celular. Para os ensaios de citometria de fluxo foi utilizado um equipamento BD FACSVerser™ (EUA).

4.13.1 Preparo das placas e incubação com amostras

Células da linhagem B16-F10 foram cultivadas até atingir 85–100 % de confluência. Em seguida foram retiradas da garrafa e contadas as células viáveis conforme descrito na seção 4.12.2. Foi colocado 1 mL/poço da suspensão de células em placas de fundo chato de 12 poços, em quantidade de 7×10^4 células/poço, e incubadas em estufa a 37 °C e 5 % CO₂ por 20–24 h.

As concentrações de peptídeo a serem utilizadas nesse ensaio foram determinadas a partir da observação morfológica das células tratadas nos ensaios de viabilidade celular. As alíquotas foram preparadas a partir da pesagem dos peptídeos secos.

Após a incubação, o meio de cultura foi retirado dos poços e substituído com triplicatas (1 mL) dos peptídeos ocelatina-F1 ou HCC77(K) previamente filtrados, dissolvidos em DMEM completo e diluídos nas concentrações finais do teste (equivalentes à IC₅₀ para a ocelatina-F1; IC₅₀ e IC₇₅ para HCC77(K)). Como controle de proliferação plena, o meio de três poços foi substituído com 1 mL de DMEM completo fresco. Outros três poços foram também substituídos com meio de cultura contendo H₂O₂ 1 mM e utilizados como controles positivos nos ensaios a seguir. As placas foram novamente incubadas a 37 °C e 5 % CO₂ durante 24 h.

Após a incubação com as amostras, o meio de cada poço foi retirado e transferido para um microtubo de 2 mL. As células foram soltas do fundo da placa aplicando 500 µL de tripsina/poço e incubando por 3–5 min a 37 °C. Em seguida utilizou-se o meio previamente transferido aos microtubos, para interromper o efeito da tripsina. A suspensão de células tratadas foi logo levada de volta para os respectivo microtubos e centrifugada por 5 min a 3.083 g. Nos casos em que foi necessária a lavagem das células, esta etapa foi seguida por um ciclo de centrifugação, realizado nas mesmas condições descritas.

4.13.2 Integridade da membrana plasmática

O precipitado das células tratadas foi ressuspenso em 100 µL de DMEM completo. Uma alíquota de 10 µL foi retirada de cada tubo e diluída com 50–150 µL de azul de tripano. Um volume de 10 µL dessa diluição foi depositado na câmara de Neubauer e levado ao microscópio invertido para contagem diferencial das células inviáveis (coradas) e viáveis (sem corar).

4.13.3 Potencial de membrana mitocondrial

O precipitado das células tratadas foi lavado duas vezes com tampão PBS gelado e após descartar o sobrenadante foram adicionados 500 µL de solução de Rodamina 123/etanol (5 mg/mL). Após a incubação de 15 min a temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS gelado e ressuspendidas em 200 µL de PBS. Em seguida, as células foram analisadas no citômetro de fluxo, através do canal FL1-H.

4.13.4 Indução de necrose/apoptose

O precipitado das células foi lavado duas vezes com tampão PBS gelado. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 100 µL de tampão de ligação (0,1 M HEPES pH 7,4; 1,4 M NaCl e 25 mM CaCl₂) e em seguida foram adicionados 5 µL de Anexina-V FITC e 10 µL de solução de PI/PBS (50 µg/mL). Os controles de marcação/calibração foram preparados a partir das células incubadas com H₂O₂, adicionando 5 µL de Anexina-V FITC em um tubo, 10 µL de solução de PI/PBS (50 µg/mL) em outro, e 5 µL de Anexina-V FITC + 10 µL de solução de PI/PBS (50 µg/mL) no terceiro.

Os tubos foram incubados por 15 min a temperatura ambiente, protegidos da luz. Após esse período, foram adicionados 400 µL de tampão de ligação e imediatamente, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo, através dos canais FL1-H e FL3-H.

4.13.5 Fragmentação de DNA e ciclo celular

O precipitado das células tratadas foi lavado duas vezes com tampão PBS gelado e armazenado a -20 °C em 1 mL de etanol absoluto. No dia da análise, as células foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas a 3.083 g por 5 min. O etanol foi retirado e as células lavadas com 500 µL de PBS gelado. O PBS foi retirado e em seguida foram adicionados 200 µL de RNase/PBS (50 µg/mL) por tubo, incubando logo a 37 °C por 30 min. Finalmente adicionaram-se a cada tubo 100 µL de uma solução de PI/PBS (60 µg/mL). Os tubos foram incubados protegidos

da luz por 10 min e analisados no citômetro de fluxo, nos canais FL2-H (fragmentação de DNA) e FL2-A (ciclo celular).

4.13.6 Estatística

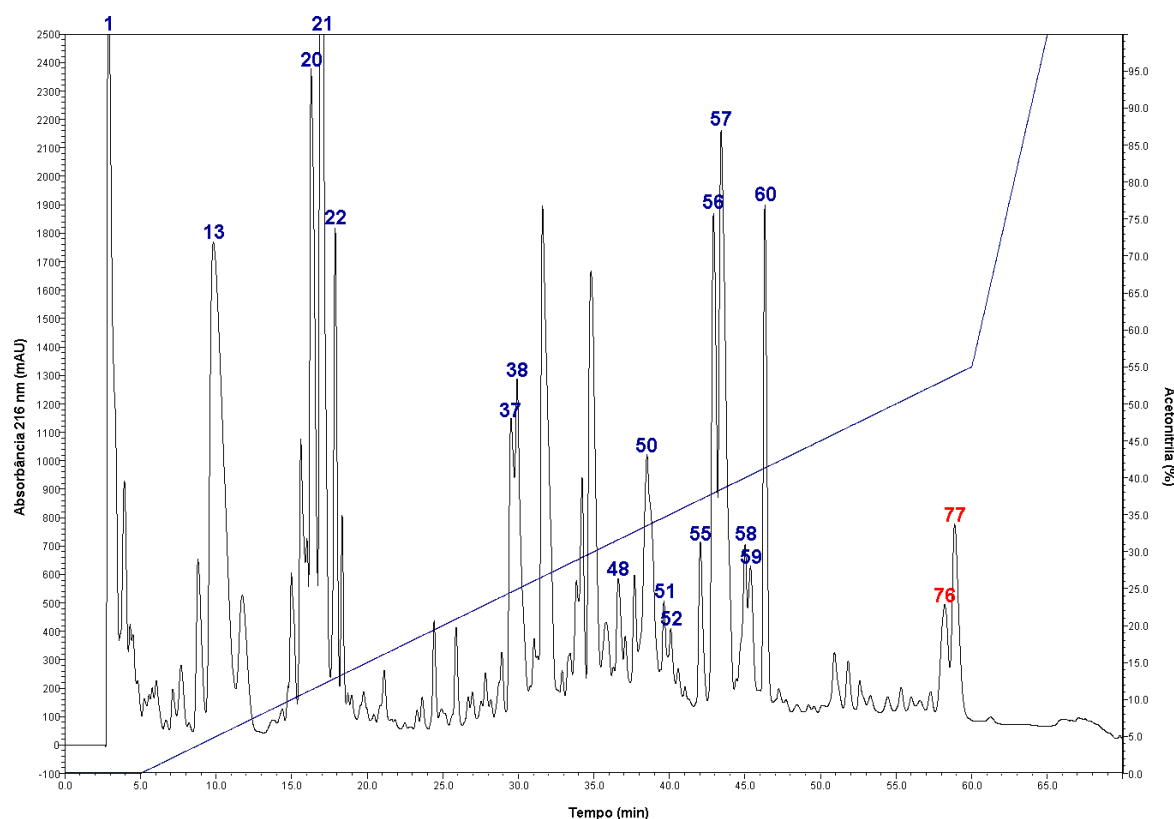
As análises estatísticas foram realizadas no programa Prism v5,03 (Graphpad Software, EUA) utilizando testes *t* para amostras independentes e ANOVA de uma e duas vias. Para todos os ensaios foi considerado um nível de significância de 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA SECREÇÃO DE *Hypsiboas crepitans*

A secreção cutânea bruta obtida de indivíduos de *Hypsiboas crepitans* coletados na Colômbia foi fracionada por RP-HPLC em uma coluna C₁₈. Essa secreção mostrou-se, em geral, bastante diversificada, resultando na eluição de aproximadamente 77 frações, obtidas pelo monitoramento da absorvância em 216 nm (Figura 6).

Figura 6 — Perfil cromatográfico típico obtido após o fracionamento da secreção cutânea bruta de *H. crepitans* (Colômbia) empregando-se coluna C₁₈.



Indicam-se com o respectivo número as frações que mostraram atividade no teste antimicrobiano preliminar; em vermelho: frações utilizadas para o isolamento de peptídeos.

As frações cromatográficas obtidas foram coletadas e avaliadas quanto à sua capacidade de inibir a proliferação das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa*; e das bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*. Aquelas que produziram um grau de inibição de pelo menos

25 % com relação ao controle (em qualquer dos microrganismos avaliados) foram analisadas por espectrometria de massas (MALDI-TOF), determinando-se, quando possível, as massas monoisotópicas dos principais componentes peptídicos presentes nelas (Tabela 3). Essa análise permitiu a identificação das massas de 27 peptídeos numa janela entre 700 e 4.000 Da, presentes em 19 frações de cromatografia. Como observação geral, encontrou-se que 2/3 dos peptídeos estavam na faixa de 1.000–1.300 Da.

Tabela 3 — Relação das frações cromatográficas da secreção cutânea de *H. crepitans* (Colômbia) com atividade antimicrobiana e seus principais componentes peptídicos.

Fração	RT (min)	Massa Monoisotópica (Da)	Inibição (%)
1	2,9	N/D	Ec 85 Kp 97 Sa 69 Se 97
13	9,8	N/D	Ec 30 Kp 30 Sa 37 Se 55 Ca 100
20	16,3	1.049,5 1.126,0 1.110,0 1.034,8	Ec 31 Kp 56 Se 55
21	17,0	887,4 944,9 1.698,2	Ec 33 Kp 43 Se 51
22	17,9	1.017,2	Ec 39 Kp 42 Se 46
37	29,5	N/D	Kp 47 Se 48
38	29,9	1.149,4	Ec 31 Kp 45 Se 45 Ca 85
48	36,6	1.197,4 2.058,8 1.216,4	Ec 82 Kp 41 Se 46
50	38,5	1.378,3	Kp 40 Se 56 Ca 94

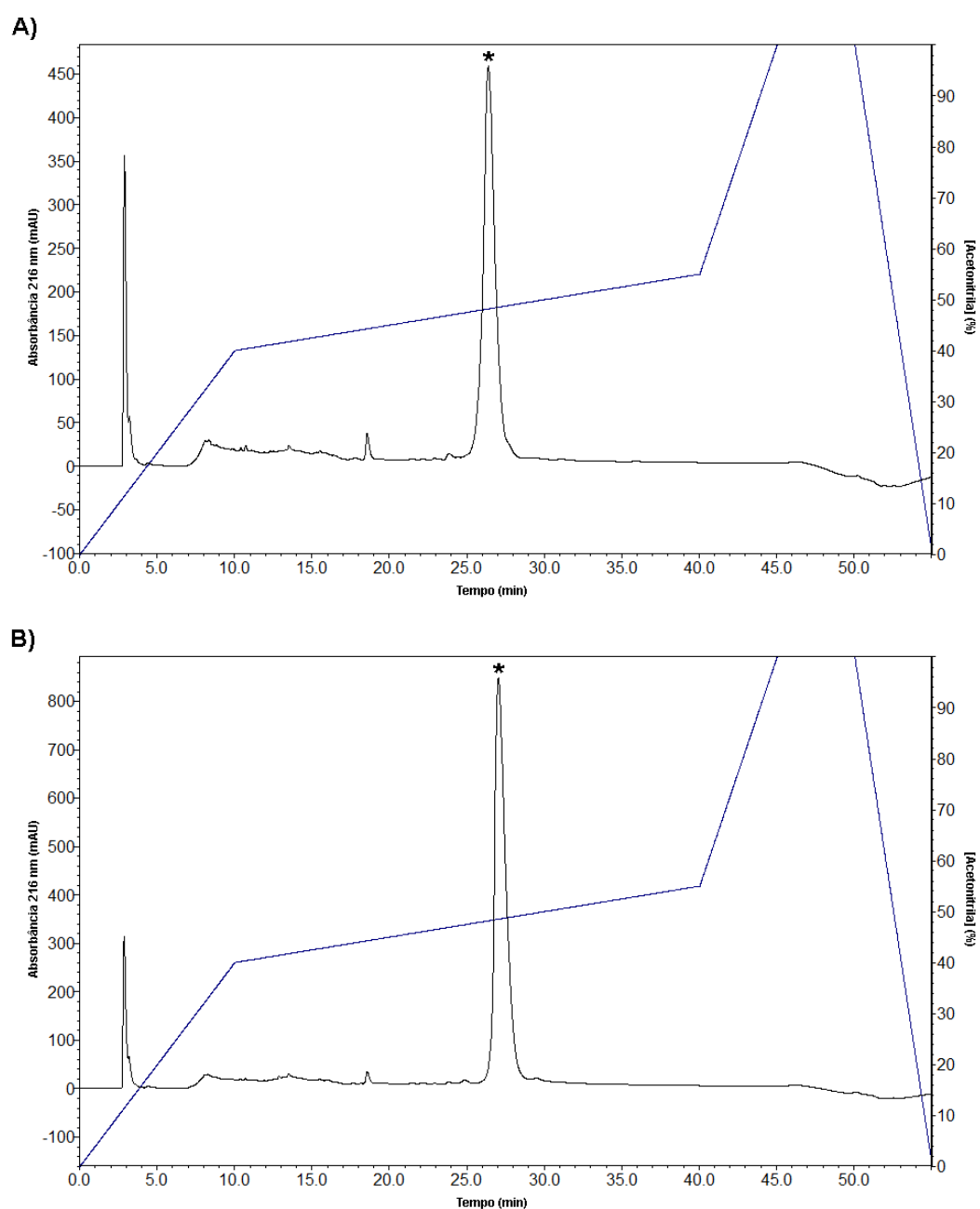
Fração	RT (min)	Massa Monoisotópica (Da)	Inibição (%)
51	39,4	N/D	Kp 52 Se 98 Ca 45 Cn 49
52	40,1	1.248,8	Ec 25 Kp 52 Se 98
55	42,0	N/D	Kp 46 Se 62
56	42,9	1.072,0	Sa 31 Se 47
57	43,4	1.041,5	Sa 29 Se 47
58	44,4	1.014,8 1.321,5	Sa 47 Se 35 Cn 38
59	45,4	1.014,3 1.125,1 1.141,2	Sa 76
60	45,9	1.102,2 1.088,3	Kp 29 Pa 41 Sa 85 Se 100 Ca 30
76	58,2	1.754,0 1.781,0	Ec 98 Kp 98 Sa 96 Se 95 Cn 99
77	58,9	1.724,5 1.203,0	Ec 99 Kp 96 Pa 33 Sa 95 Se 95 Ca 57

Estão apresentados apenas os microrganismos cuja inibição foi igual ou superior a 25 %. A atividade antifúngica é destacada em negrito. *Ec* = *Escherichia coli*, *Kp* = *Klebsiella pneumoniae*, *Pa* = *Pseudomonas aeruginosa*, *Sa* = *Staphylococcus aureus*, *Se* = *Staphylococcus epidermidis*, *Ca* = *Candida albicans*, *Cn* = *Cryptococcus neoformans*. N/D = Massa não determinada.

Como pode se apreciar na Tabela 3, as frações 76 e 77 mostraram uma atividade inibitória superior às demais, apresentando um amplo espectro de ação que inclui bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e leveduras. Tais frações foram acumuladas a partir de várias cromatografias semi-preparativas e

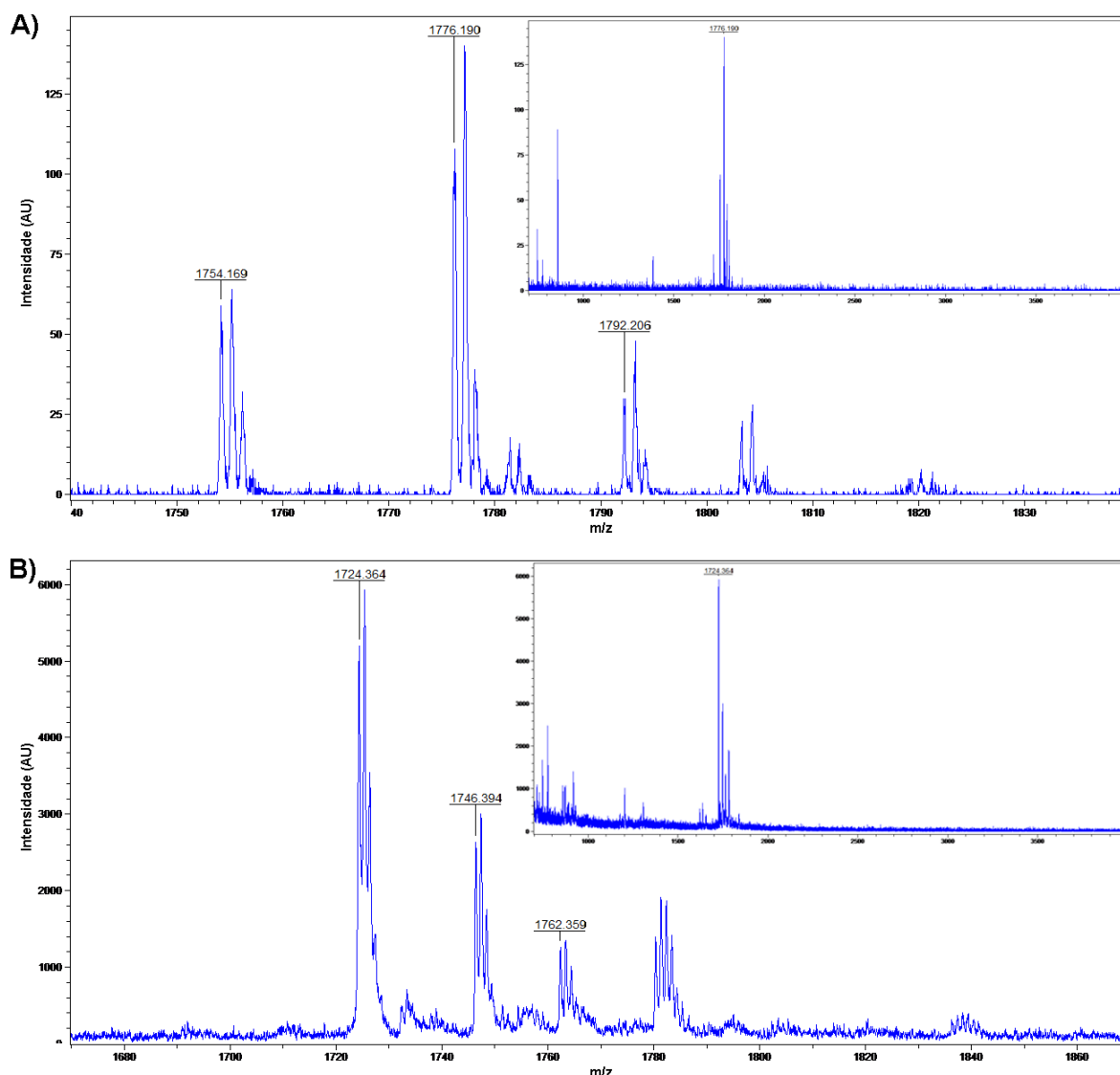
submetidas a uma segunda etapa de RP-HPLC em coluna C₁₈. Esse processo permitiu a obtenção dos peptídeos principais dessas duas frações em homogeneidade satisfatória para o sequenciamento químico (Figura 7). Como foi verificado pela análise por espectrometria de massas, esses peptídeos possuem massas moleculares monoisotópicas de 1.753,2 e 1.723,4 Da (Figura 8) e foram denominadas para este trabalho como **HCC76** e **HCC77**, respectivamente.

Figura 7 — Purificação dos peptídeos HCC76 e HCC77 por RP HPLC utilizando coluna C₁₈.



A) HCC76. B) HCC77. Os picos marcados com (*) correspondem aos respectivos peptídeos purificados.

Figura 8 — Espectros de massas dos peptídeos HCC76 e HCC77 obtidos por MALDI TOF MS após purificação em coluna C₁₈.



A) HCC76 (1754,2 Da; [M+H⁺]) com seus respectivos adutos formados com os íons sódio (1776,2 Da; [M+H⁺]) e potássio (1792,2 Da; [M+H⁺]). **B)** HCC77 (1724,4 Da; [M+H⁺]) com seus respectivos adutos formados com os íons sódio (1746,4 Da; [M+H⁺]) e potássio (1762,4 Da; [M+H⁺]). Os insertos nas figuras mostram a faixa de 700–4000 m/z.

Os peptídeos HCC76 e HCC77 foram submetidos a sequenciamento químico por degradação de Edman. Apesar disso, os resultados do sequenciamento não permitiram obter a identidade do último resíduo, fazendo necessária sua determinação com base nos cálculos das massas monoisotópicas teóricas e experimentais.

Assim, através dos cálculos foi possível determinar sem ambiguidade a estrutura linear do peptídeo HCC76: ¹FLGTLIPALAGAIGNLIT¹⁸. No entanto, o peptídeo HCC77 apresentou maior dificuldade, devido à similaridade nas massas

monoisotópicas dos resíduos lisina (146,11 Da) e glutamina (146,07 Da) que poderiam, de acordo com os cálculos, completar a sequência. Diante dessa situação, esse peptídeo teve a sequência determinada entre os resíduos 1–17, mas não foi possível afirmar a identidade do último resíduo: ¹FLGAILPALAGAIGSLIX¹⁸, onde **X** = **K** ou **Q**.

Também como resultado dos cálculos, e baseado na frequência dessa modificação pós-traducional em PAMs de anfíbios, foi sugerida a presença de uma amidação no C-terminal dos dois peptídeos (foi observada uma diferença de –1 Da entre as massas monoisotópicas experimentais e as calculadas pelas sequências). Devido à ausência de resíduos ácidos nas duas estruturas, considerou-se que tal diferença derivasse da amidação do C-terminal da cadeia polipeptídica.

Quadro 1 — Alinhamento múltiplo do peptídeo HCC76, do segmento 1–17 do peptídeo HCC77 e dos outros peptídeos da família das hilinas.

A)		10	
HCC76	FLGTLIPALAGAIGNLIT		18
HCC77 (1–17)	FLGAILPALAGAIGSLI-		17
	: : :** . **		
B)		10	
Hyllin-a1	IFGAILPLALGALKNLIK-		18
Hyllin-b1	FIGAILPAIAGLVHGLINR		19
Hyllin-b2	FIGAILPAIAGLVGGLINR		19
HCC76	FLGTLIPALAGAIGNLIT-		18
HCC77 (1–17)	FLGAILPALAGAIGSLI--		17
	::*:::* * : **		

A) Diferenças entre as sequências de HCC76 e HCC77(1–17). **B)** Alinhamento de HCC76 e HCC77(1–17) com as outras hilinas descritas na literatura. As cores nos resíduos indicam propriedades físico-químicas: **x** = resíduos pequenos apolares (exceto Gly); **x** = Gly, His e resíduos polares sem carga; **x** = resíduos básicos (exceto His). (*) = Identities; (:) = Substituições conservativas; (.) = Substituições semi-conservativas.

Os peptídeos HCC76 e HCC77 foram submetidos a buscas por similaridades usando o algoritmo BLAST, encontrando-se grande similaridade com peptídeos da família das hilinas presentes em outras espécies do gênero *Hypsiboas* e que foram previamente descritos por nosso grupo (Castro *et al.*, 2005). O Quadro 1 mostra o alinhamento em Clustal Omega do peptídeo HCC76 e da porção sem ambiguidade (1–17) do peptídeo HCC77, assim como o alinhamento dessas duas sequências junto às hilinas já descritas na literatura. As sequências dos dois peptídeos isolados

apresentam grande similaridade, observando-se entre eles treze resíduos idênticos, três substituições conservativas e uma substituição semi-conservativa. No alinhamento juntamente as outras hiliinas é possível observar cinco resíduos idênticos distribuídos ao longo dos dois extremos da cadeia e seis substituições conservativas.

5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E HEMOLÍTICA DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS DA SECREÇÃO DE *Hypsiboas crepitans*

Experimentos de atividade biológica foram realizados posteriormente com a versão sintética do peptídeo HCC76. Apesar de não ter sido possível o sequenciamento total do peptídeo HCC77, a versão sintética deste contendo Lys como resíduo terminal (doravante denominada HCC77(K)) foi sintetizada e utilizada na determinação da MIC e da HC₅₀, assim como nos ensaios posteriores utilizando células de mamífero. Embora não se tenha certeza sobre a identidade desse resíduo, sabe-se que a Lys é um dos resíduos mais frequentes entre os PAMs de anfíbios, de acordo com estatísticas de Wang, Li e Wang (2009) e, no caso particular das hiliinas, pode-se constatar a presença de resíduos básicos na porção C-terminal (Quadro 1).

Os peptídeos sintéticos HCC76 e HCC77(K) foram utilizados para a determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (MICs) em bactérias e leveduras e das Concentrações Hemolíticas 50 (HC₅₀) em hemácias humanas. Os ensaios mostraram que a atividade antimicrobiana do peptídeo HCC76 é bastante fraca, impedindo a precisa determinação das MICs, uma vez que as concentrações testadas não provocaram a total inibição da proliferação em nenhum dos microrganismos utilizados; no entanto, foi possível observar um leve efeito inibitório a partir de 128 µM (Tabela 4). Por sua vez, o peptídeo HCC77(K) mostrou-se ativo apenas contra bactérias Gram-positivas, mostrando valores de MIC em 32 µM (*S. aureus*, *E. faecalis*) e sugerindo valores de MIC para *S. epidermidis* acima de 128 µM. Verificou-se também uma fraca atividade contra as cepas das leveduras *C. albicans* e *C. parapsilosis*, sugerindo também valores de acima de 128 µM.

Por outra parte, os testes realizados com os peptídeos sintéticos HCC76 e HCC77(K) utilizando hemácias humanas, evidenciaram uma moderada atividade hemolítica neste último (HC₅₀ = 79,4 µM). Em contraste, o peptídeo HCC76 não

mostrou nenhum efeito hemolítico, inclusive na máxima concentração utilizada no ensaio (128 μ M).

Tabela 4 — Concentrações inibitórias mínimas (MICs) para vários microrganismos e concentrações hemolíticas (HC₅₀) dos peptídeos sintéticos HCC76 e HCC77(K).

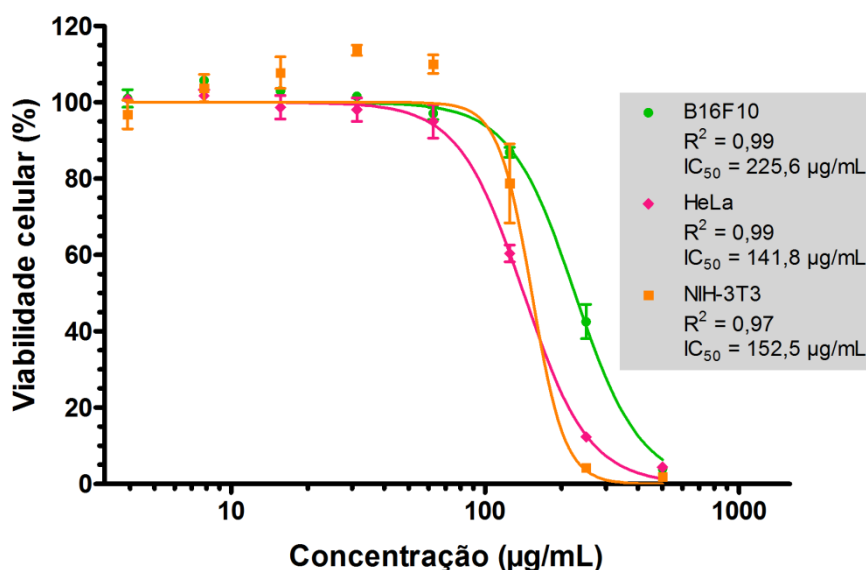
BACTÉRIA	MIC (μ M)	
	HCC76	HCC77(K)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	S/A	S/A
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC-13883	>128	S/A
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC-25923	>128	32
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC-12228	S/A	>128
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC-29212	S/A	32
<i>Candida albicans</i> ATCC-14053	S/A	>128
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	>128	>128
Eritrócitos humanos [HC ₅₀]	S/A (0)	79,4

O número entre parênteses indica a atividade hemolítica obtida na máxima concentração testada (128 μ M). S/A = sem atividade na máxima concentração testada (128 μ M).

5.3 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE *Hypsiboas crepitans* SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

A secreção bruta obtida da pele de indivíduos de *Hypsiboas crepitans* coletados no Brasil foi utilizada na realização de testes de viabilidade celular (MTT), com o fim de avaliar seu potencial inibitório em linhagens celulares de câncer, bem como em células normais. Em termos gerais, a secreção mostrou uma atividade moderada, sendo que os valores de IC₅₀ para todas as linhagens estiveram acima de 150 μ g/mL. Conseqüentemente, a inibição no crescimento apenas foi evidente a partir de 31,25 μ g/mL para a linhagem de câncer cervical humano (HeLa) e a partir de 62,5 μ g/mL para as outras linhagens celulares (Figura 9). A linhagem mais suscetível ao tratamento com a secreção foi HeLa (IC₅₀ = 141,80 μ g/mL); porém o efeito foi muito similar ao observado em fibroblastos murinos (NIH-3T3, IC₅₀ = 152,50 μ g/mL). A linhagem de melanoma murino (B16-F10) foi a que mostrou menor suscetibilidade (IC₅₀ = 225,60 μ g/mL) ao tratamento com a secreção bruta.

Figura 9 — Viabilidade de células cancerosas e normais após incubação (24 h) com concentrações seriadas da secreção cutânea bruta de *H. crepitans* (Brasil).



B16-F10: melanoma murino, HeLa: câncer cervical humano, NIH-3T3: fibroblasto murino.

5.4 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE PEPTÍDEOS DE *Hypsiboas crepitans* E *Leptodactylus labyrinthicus* SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Versões sintéticas dos dois peptídeos antimicrobianos descritos na secreção cutânea de *H. crepitans* da Colômbia (HCC76 e HCC77(K)) foram também utilizados na realização de testes de viabilidade celular (MTT) sobre linhagens de células aderentes de mamíferos. Adicionalmente foram avaliados dois peptídeos sintéticos desenhados a partir da sequência do peptídeo HCC77(K) e denominados de HCC77(K)1 (¹FLSKILSALAGAIGSLIK¹⁸-NH₂) e HCC77(K)2 (¹FKKILGALLGLISLIK¹⁸-NH₂).

As modificações adotadas para a projeção destes dois peptídeos levaram em conta vários aspectos, dentre eles, a formação de α-hélice. O desenho do análogo HCC77(K)1 foi realizado visando também um leve aumento na cationicidade e em suas características anfífilas, de modo a favorecer sua interação com as membranas eletronegativas dos microrganismos alvos. Para isso, foram realizadas substituições em três posições do análogo proposto, em comparação com o PAM selvagem HCC77(K). As substituições efetuadas foram ³G→³S; ⁴A→⁴K e ⁷P→⁷S. No caso do segundo análogo, HCC77(K)2, foram realizadas substituições em sete posições, com relação ao PAM selvagem

HCC77(K), visando garantir, além da formação da α -hélice, um aumento substancial na cationicidade do peptídeo e no caráter hidrofóbico da região apolar. As substituições realizadas foram $^2\text{L} \rightarrow ^2\text{K}$; $^3\text{G} \rightarrow ^3\text{K}$; $^4\text{A} \rightarrow ^4\text{K}$; $^7\text{P} \rightarrow ^7\text{G}$; $^{10}\text{A} \rightarrow ^{10}\text{L}$; $^{12}\text{A} \rightarrow ^{12}\text{L}$ e $^{14}\text{G} \rightarrow ^{14}\text{S}$.

Através dos ensaios verificou-se que o peptídeo HCC76 possui um efeito fraco sobre células de câncer de mama humano (MCF-7, $\text{IC}_{50} = 145,10 \mu\text{M}$), sendo que não foi possível observar a inibição total do crescimento, inclusive na máxima concentração avaliada ($256 \mu\text{M}$), onde houve apenas 47 % de inibição (Figura 10). Nessa concentração tampouco foi possível observar alterações na morfologia das células (Figura 11, A e B). Igualmente foi avaliado o efeito deste peptídeo em células de melanoma murino (B16-F10), sendo que nessa linhagem não foi evidenciada nenhuma atividade inibitória pelo teste do MTT nem pela análise da morfologia celular (Figura 11, C e D).

Figura 10 — Viabilidade de células de câncer de mama humano (MCF-7) após incubação (24 h) com concentrações seriadas do peptídeo sintético HCC76.

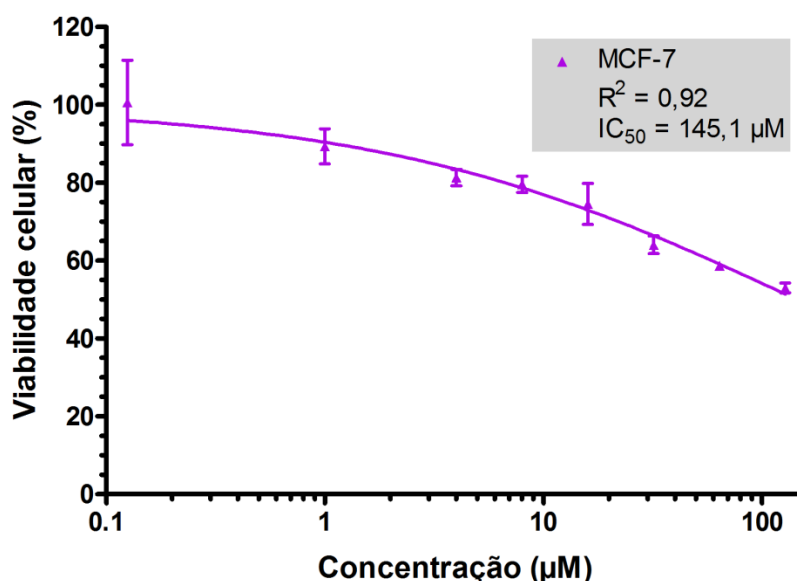
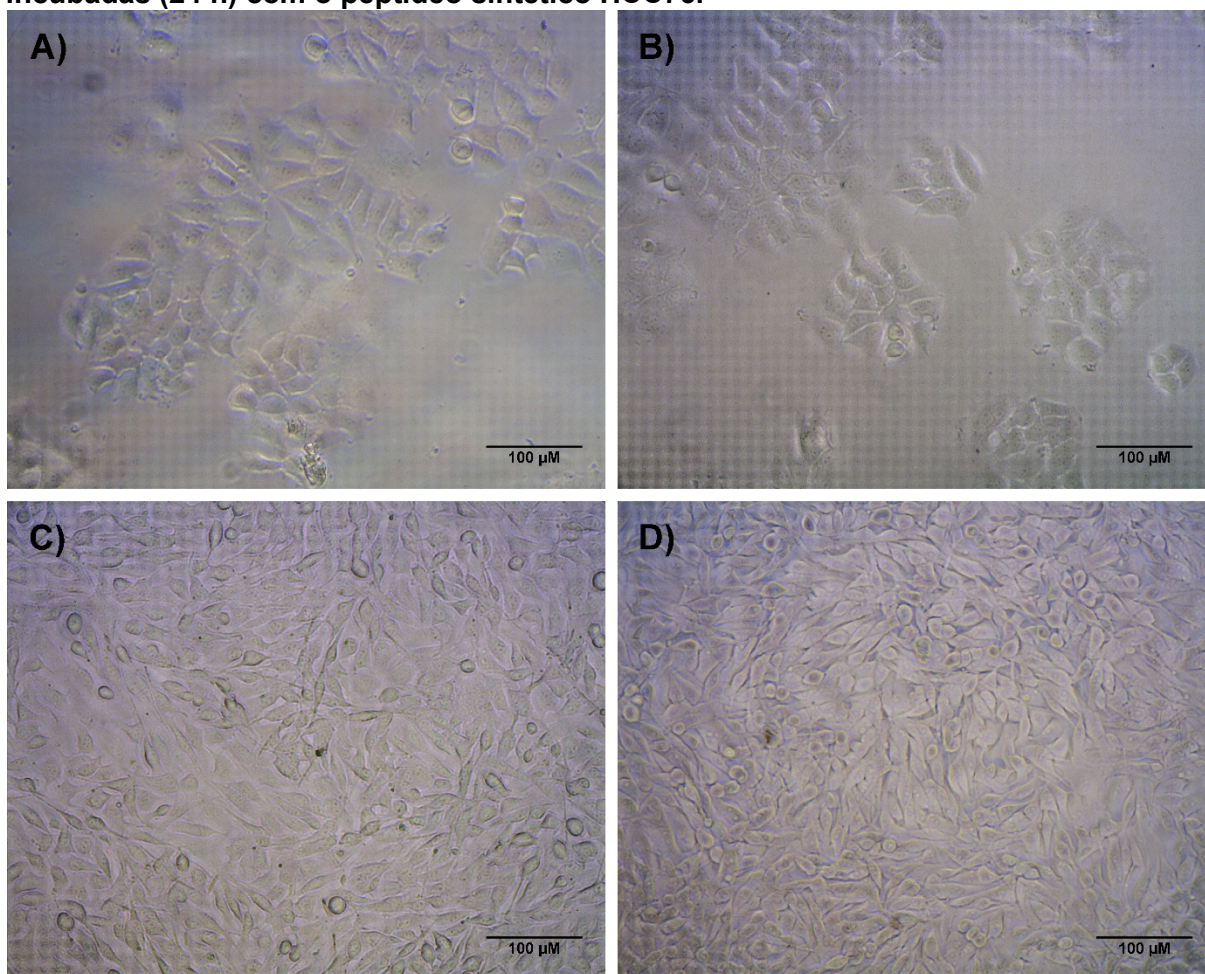


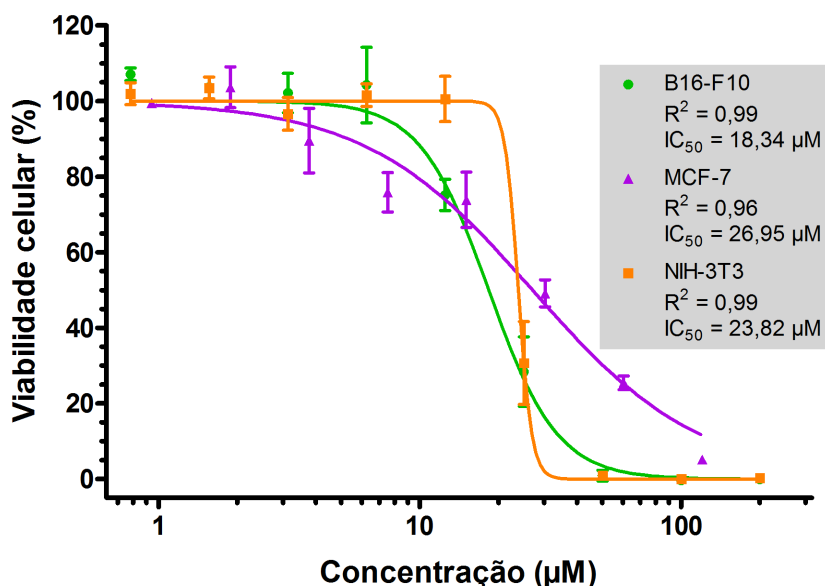
Figura 11 — Microfotografias de contraste de fase de células cancerosas incubadas (24 h) com o peptídeo sintético HCC76.



A) MCF-7 (controle); **B)** MCF-7 (HCC76 256 μM). **C)** B16-F10 (controle); **D)** B16-F10 (HCC76 256 μM). Aumento: 10x

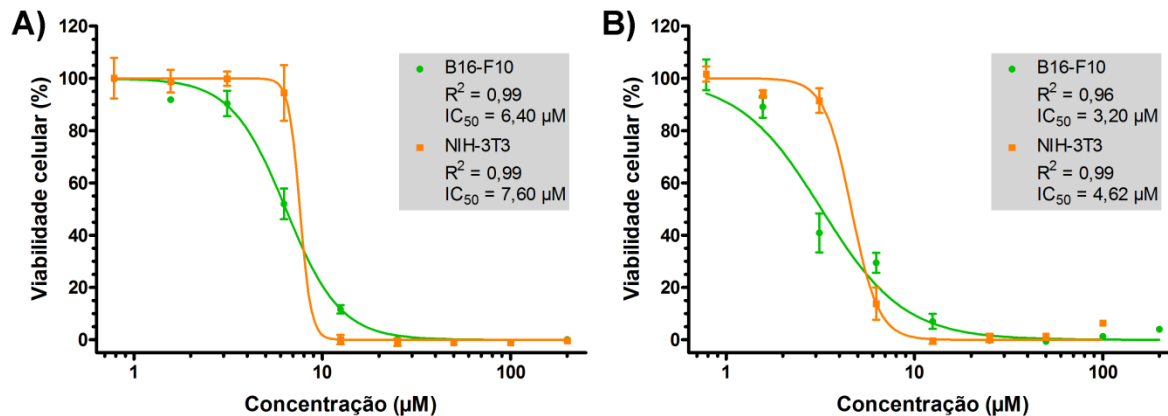
Por outra parte, os testes realizados com o peptídeo HCC77(K) mostraram resultados bastante diferentes. Este peptídeo mostrou-se ativo em linhagens de células cancerosas B16-F10 ($\text{IC}_{50} = 18,34 \mu\text{M}$) e MCF-7 ($\text{IC}_{50} = 26,95 \mu\text{M}$). Entretanto ele também foi tóxico em células normais da linhagem NIH-3T3, em concentrações igualmente próximas ($\text{IC}_{50} = 23,82 \mu\text{M}$), evidenciando sua baixa seletividade (Figura 12). Testes de viabilidade realizados com os peptídeos desenhados HCC77(K)1 e HCC77(K)2 em células B16-F10 e NIH-3T3 mostraram diminuições relevantes nos valores de IC_{50} . Contudo, a seletividade desses dois peptídeos continuou sendo baixa (Figura 13 e Tabela 5).

Figura 12 — Viabilidade de células cancerosas e normais após incubação (24 h) com concentrações seriadas do peptídeo sintético HCC77(K).



B16-F10: melanoma murino, MCF-7: câncer de mama humano, NIH-3T3: fibroblasto murino.

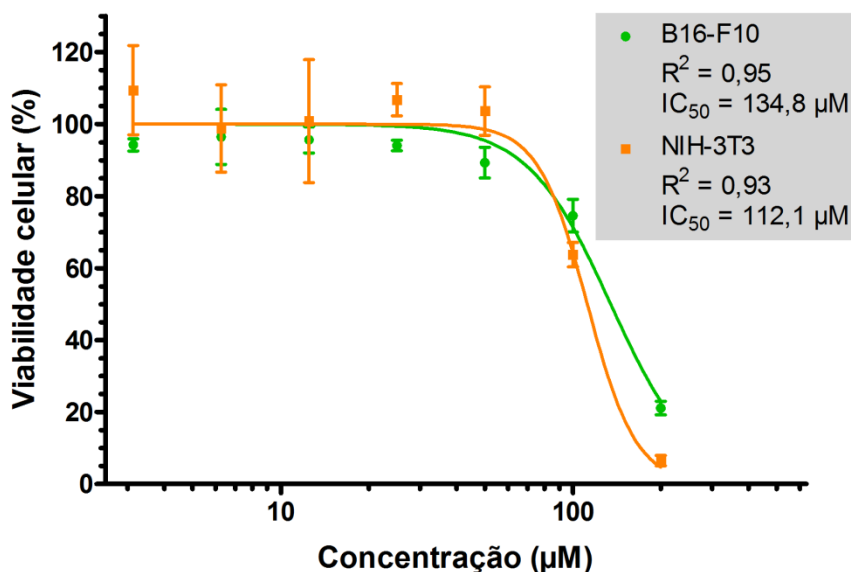
Figura 13 — Viabilidade de células cancerosas e normais após incubação (24 h) com concentrações seriadas de peptídeos sintéticos desenhados a partir do peptídeo HCC77(K).



A) HCC77(K)1. B) HCC77(K)2. B16-F10: melanoma murino, NIH-3T3: fibroblasto murino.

Peptídeos sintéticos derivados da secreção cutânea de *Leptodactylus labyrinthicus* foram também utilizados em ensaios para a avaliação da sua atividade antiproliferativa. O peptídeo antimicrobiano G16OCP1 apresentou uma atividade muito fraca quando testado em células B16-F10 ($IC_{50} = 134,80 \mu M$). Similarmente, a atividade foi fraca em células NIH-3T3, em concentrações ainda um pouco menores ($IC_{50} = 112,10 \mu M$, Figura 14).

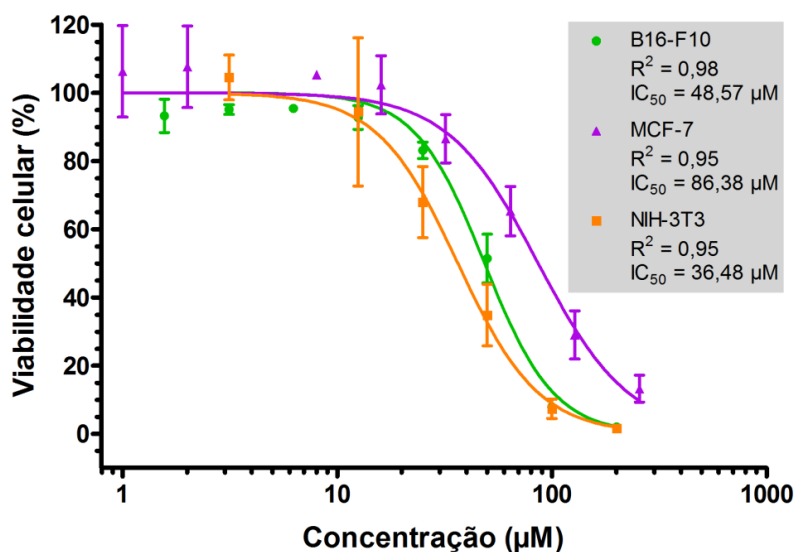
Figura 14 — Viabilidade de células cancerosas e normais após incubação (24 h) com concentrações seriadas do peptídeo sintético G16OCP1.



B16-F10: melanoma murino, NIH-3T3: fibroblasto murino.

Em contraste, o peptídeo antimicrobiano ocelatina-F1, também presente em secreções de *L. labyrinthicus* e de outros leptodactilídeos mostrou-se ativo contra as três linhagens celulares avaliadas. A ocelatina-F1 foi capaz de inviabilizar células cancerígenas B16-F10 ($IC_{50} = 48,57 \mu M$) e MCF-7 ($IC_{50} = 86,38 \mu M$). Contudo, ele também inviabilizou células normais NIH-3T3 ($IC_{50} = 36,48 \mu M$) em concentrações ainda menores (Figura 15).

Figura 15 — Viabilidade de células cancerosas e normais após incubação (24 h) com concentrações seriadas do peptídeo sintético ocelatina-F1.



B16-F10: melanoma murino, MCF-7: câncer de mama humano, NIH-3T3: fibroblasto murino.

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular (MTT) realizados com peptídeos sintéticos derivados das secreções de *H. crepitans* e *L. labyrinthicus* encontram-se sumarizados na Tabela 5, a seguir:

Tabela 5 — Valores de IC₅₀ determinados experimentalmente para linhagens de células cancerosas e normais tratadas com peptídeos sintéticos derivados da pele de *H. crepitans* e *L. labyrinthicus*.

PEPTÍDEO	IC ₅₀ (µM)		
	B16-F10 (ATCC CRL-6475)	MCF-7 (ATCC HTB-22)	NIH-3T3 (ATCC CRL-1658)
HCC76	S/A	145,10	N/D
HCC77(K)	18,34	26,95	23,82
HCC77(K)1	6,40	N/D	7,60
HCC77(K)2	3,20	N/D	4,62
G16OCP1	134,80	N/D	112,10
Ocelatina-F1	48,57	86,38	36,48

B16-F10: melanoma murino, MCF-7: câncer de mama humano, NIH-3T3: fibroblasto murino. S/A = sem atividade na máxima concentração testada (256 µM), N/D = Não determinado.

5.5 EFEITOS CITOTÓXICOS E CITOSTÁTICOS DO PEPTÍDEO HCC77(K) SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO

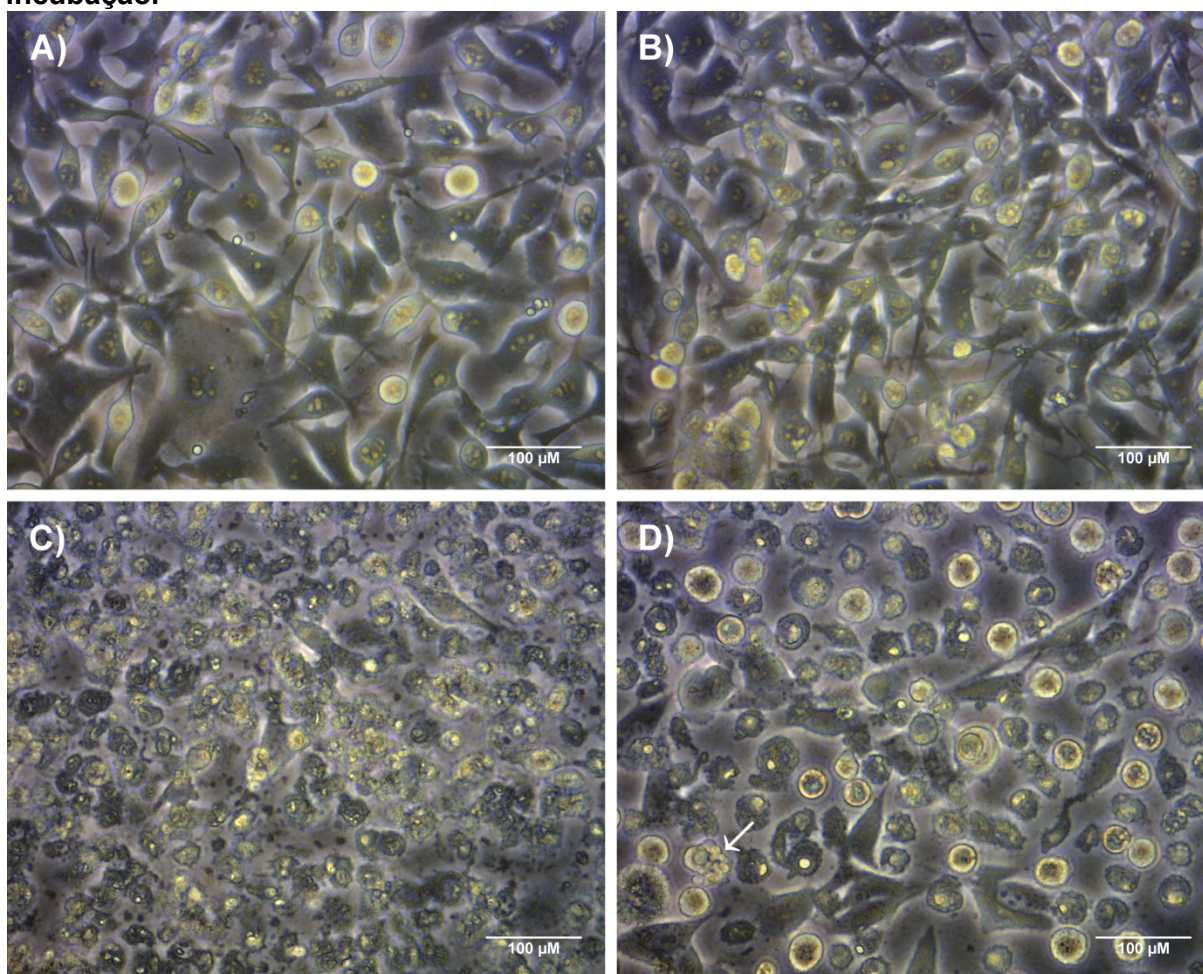
O peptídeo HCC77(K) isolado nesse trabalho a partir da secreção cutânea de *Hypsiboas crepitans* foi objeto de estudos posteriores empregando-se microscopia de contraste de fase e citometria de fluxo, com o propósito de se determinar o mecanismo de ação desta molécula sobre células de câncer. Escolheu-se a linhagem B16-F10 por ser a que apresentou maior suscetibilidade nos testes de viabilidade celular. Para estes ensaios a concentração de peptídeo utilizado foi fixada inicialmente em 18,34 µM (valor da IC₅₀ determinado pelo método do MTT) e posteriormente em 25,57 µM (valor da IC₇₅) com o intuito de observar alterações mais evidentes.

As observações realizadas ao microscópio mostraram alterações sutis nas células incubadas com o peptídeo HCC77(K) em 18,34 µM. Em termos gerais, essas células apresentavam morfologia normal (similar à do controle) e aparentemente uma maior presença de células arredondadas. Todavia, a incubação com o peptídeo na concentração de 25,57 µM colocou em evidência severas alterações na morfologia celular, provocando o desprendimento das células da placa, com a consequente perda do aspecto característico observado no controle. Em geral, a

grande maioria das células ficou mais arredondada e em suspensão. Notou-se também um encolhimento das células acompanhado por um aparente incremento na rugosidade da membrana. Essas características foram similares às apreciadas em células incubadas com peróxido de hidrogênio; no entanto, nessas últimas foi possível observar claramente a formação de vesículas na superfície da membrana celular (Figura 16).

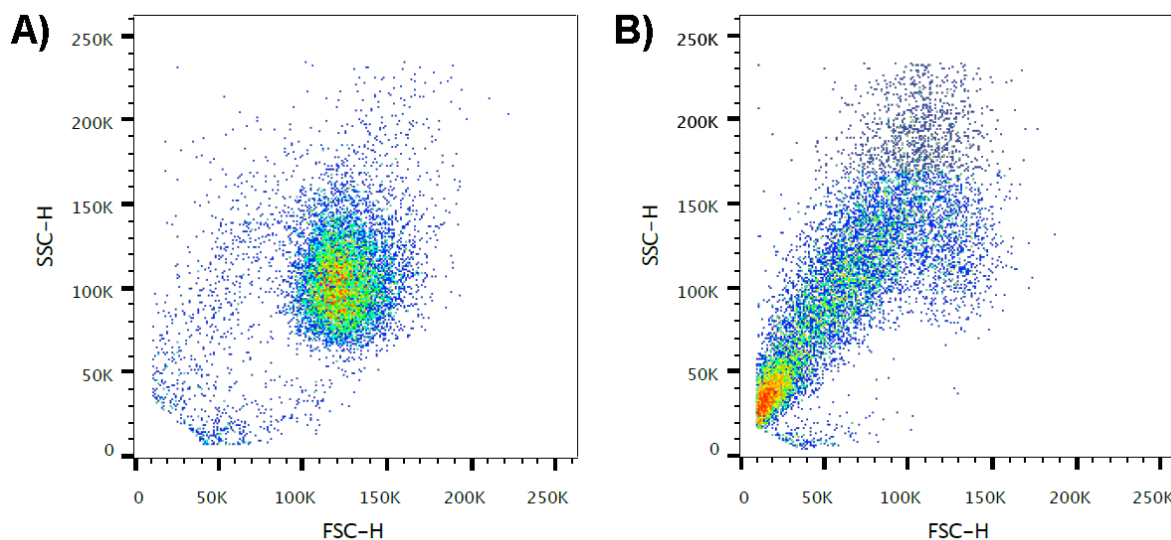
Adicionalmente, os dados coletados pelo citômetro de fluxo revelaram uma notória alteração no tamanho e na granulosidade das células tratadas com o peptídeo HCC77(K) na concentração de 25,57 μM . Como pode ser observado na Figura 17, ocorreu um aumento drástico na população de células com sinal baixo em FSC-H e SSC-H indicando a presença de células mortas após o tratamento.

Figura 16 — Microfotografias de contraste de fase de células de melanoma murino (B16-F10) mostrando o efeito do peptídeo sintético HCC77(K) após 24 h de incubação.



A) Controle (H_2O). **B)** HCC77(K) 18,34 μM . **C)** HCC77(K) 25,57 μM . **D)** H_2O_2 1 mM. A presença de células com formação de vesículas na superfície é indicada com uma seta. Aumento: 20x.

Figura 17 — Efeito do peptídeo HCC77(K) no tamanho (FSC-H) e na granulosidade (SSC-H) de células B16-F10 após 24 h de incubação com o peptídeo HCC77(K).



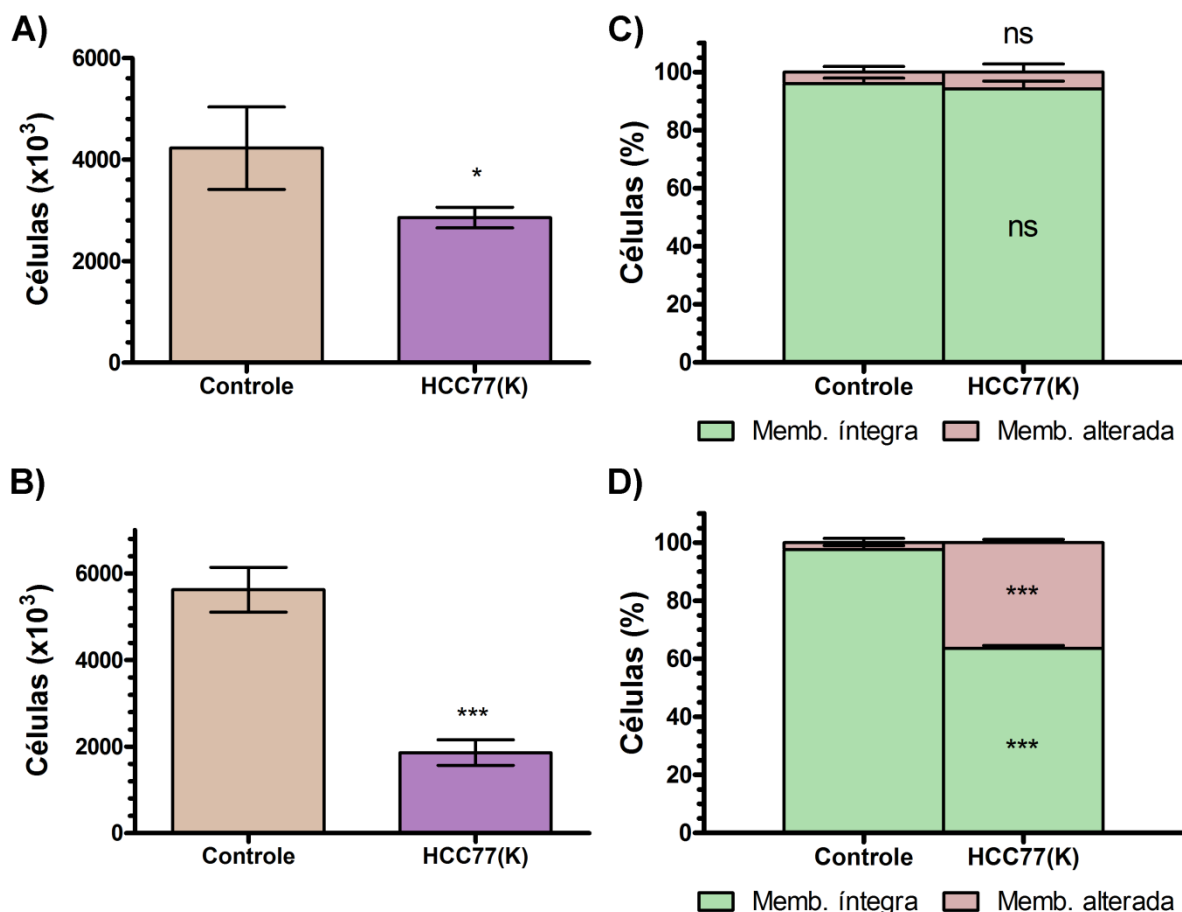
A) Controle. B) HCC77(K) 25,57 µM.

Por outra parte, as contagens realizadas no microscópio pelo método de exclusão do azul de tripano mostraram uma diminuição significativa no número de células observadas após o tratamento com HCC77(K) em 18,34 µM e 25,57 µM. (Figura 18, A e B). Em 25,57 µM ainda foi possível apreciar um incremento considerável no número de células marcadas pelo corante, confirmando a ocorrência de alterações na membrana celular que não foram observadas em 18,34 µM (Figura 18, C e D)

Experimentos realizados por citometria de fluxo utilizando marcação simultânea com Anexina-FITC e PI revelaram a presença de células em diferentes condições após o tratamento com HCC77(K), permitindo diferenciar as populações de acordo com o estado da membrana celular (marcação com PI) e a exposição de fosfatidilserina na superfície externa desta (marcação com Anexina V-FITC). Foi observado um aumento significativo no número de células duplamente marcadas (A+/PI+), bem como no número de células com marcação positiva unicamente para Anexina (A+/PI-). Como mostra a Figura 19, após o tratamento, a maioria das células encontrava-se duplamente marcada (~52 %) ou marcada unicamente com Anexina (~34 %). Conseqüentemente, essas diferenças vieram acompanhadas por uma drástica redução no número de células não marcadas (duplamente negativas, A-/PI-, redução de ~91 % para ~11 %), o que somado às observações anteriores,

apontam um aumento dos processos apoptóticos e necróticos, como consequência do tratamento com HCC77(K).

Figura 18 — Contagem pelo método de exclusão do azul de tripano, de células B16-F10 incubadas (24 h) com o peptídeo sintético HCC77(K).

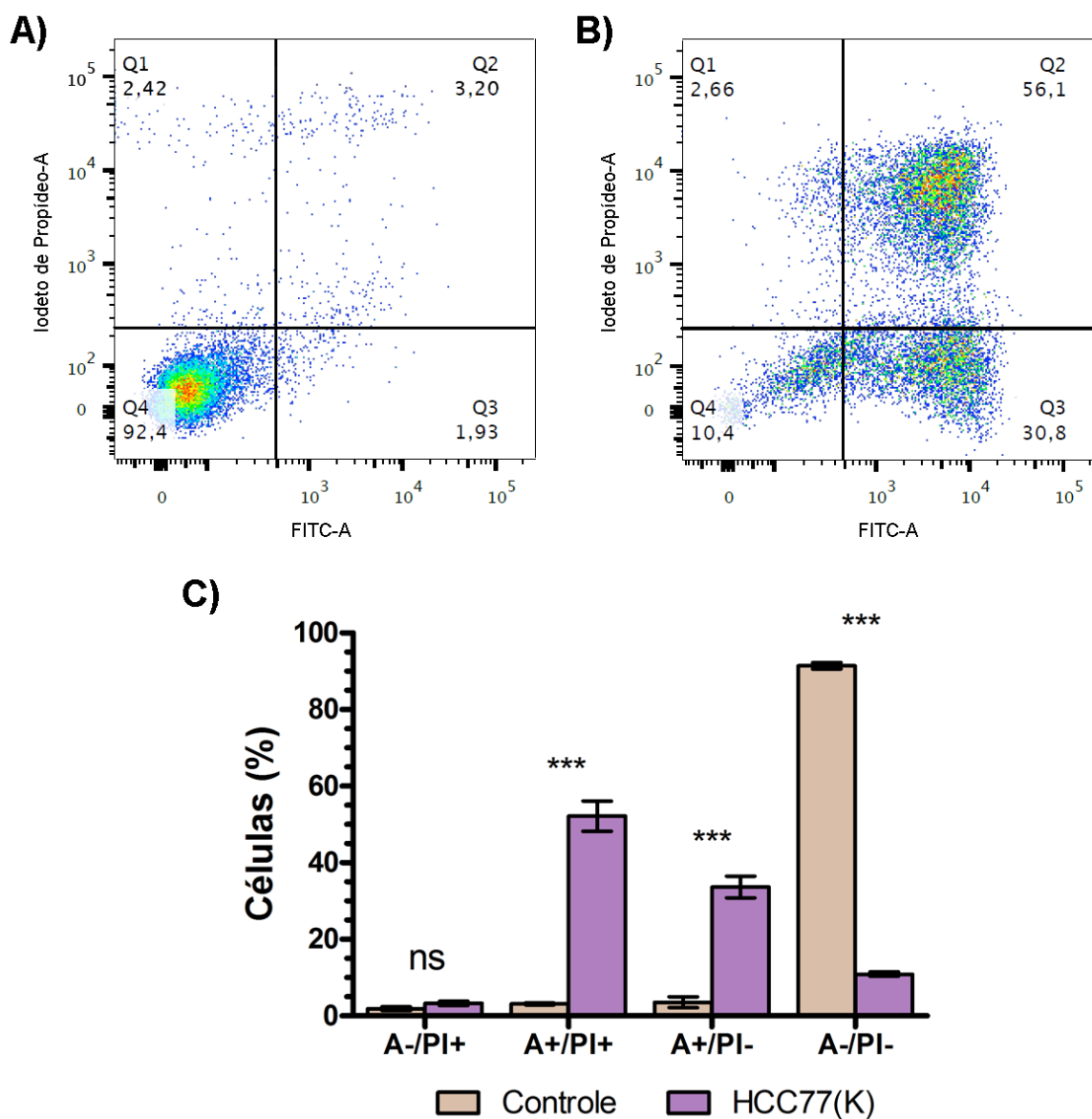


Contagem de células totais (viáveis e não viáveis) após incubação com HCC77(K) 18,34 μM (A) e 25,57 μM (B). Percentual de células com a membrana plasmática íntegra (viáveis) e alterada (não viáveis) após incubação com HCC77(K) 18,34 μM (C) e 25,57 μM (D). Com relação ao controle: ns: diferença não significativa ($p > 0,05$); *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$.

A rodamina 123 foi utilizada também em ensaios de citometria de fluxo com o fim de observar alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), indicadas pela despolarização ou hiperpolarização desta. De acordo com os resultados, o peptídeo HCC77(K) foi capaz de induzir a despolarização da membrana mitocondrial de forma discreta, mas bastante significativa. Como pode ser notado na Figura 20, C, boa parte das células tratadas com o peptídeo (aumento de ~13 %, $p < 0,01$) teve um deslocamento na sua distribuição para regiões de menor polarização. Ainda que esse deslocamento não mostrasse significância estatística (Figura 20, B), foi clara a presença de duas populações de células (MMi normal e MMi despolarizada), como

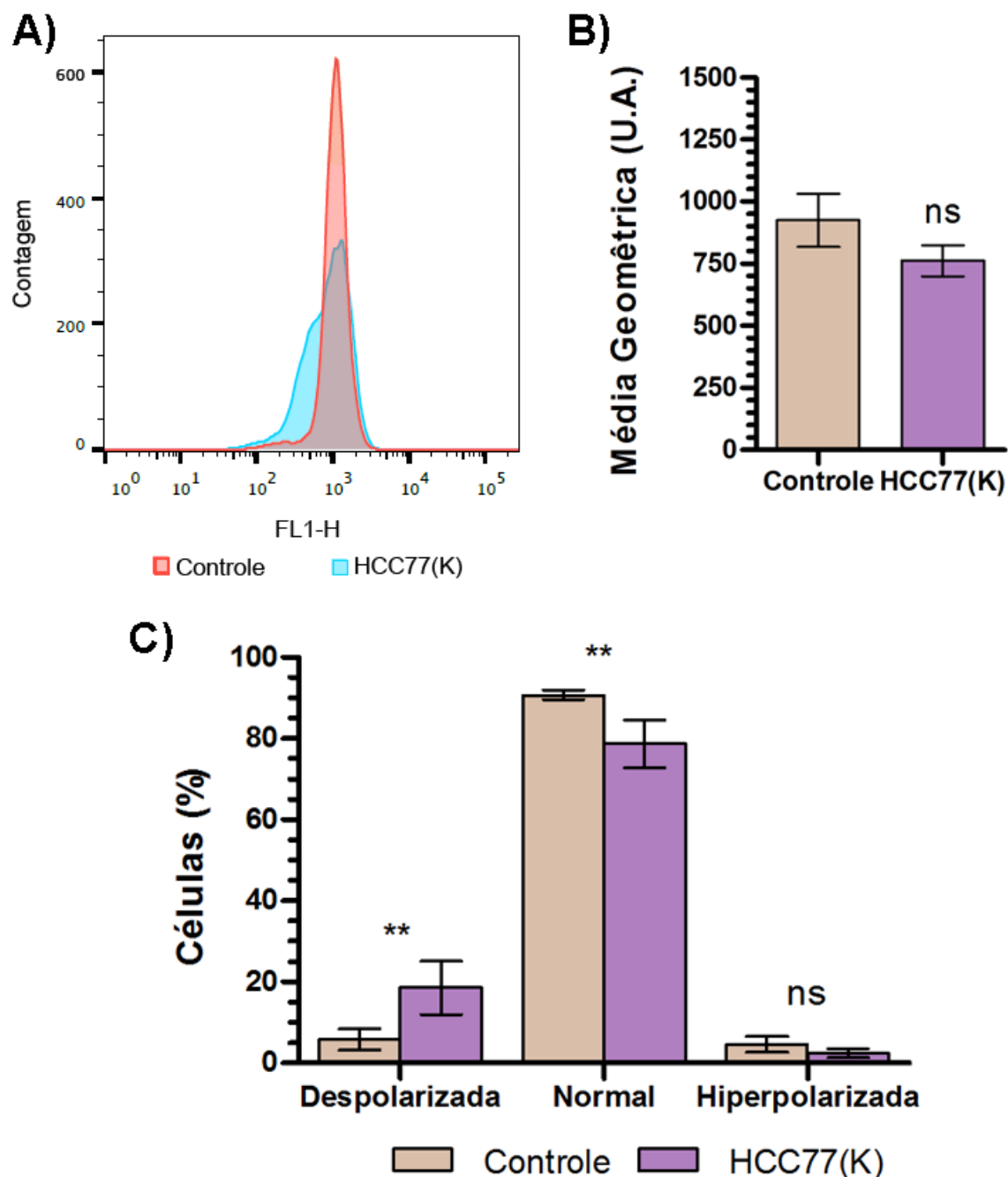
pode ser evidenciado na Figura 20, A e C. A despolarização da MMi tem sido considerada um passo chave no início das vias apoptóticas (Cao *et al.*, 2007).

Figura 19 — Efeito do peptídeo HCC77(K) na exposição de fosfatidilserina e na permeabilidade da membrana celular.



Gráficos bidimensionais mostrando diferenças na marcação de células incubadas simultaneamente com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo após o tratamento com água (A) e com HCC77(K) 25,57 μ M (B). C) Comparação da proporção de células em cada quadrante. Com relação ao controle: ns: diferença não significativa ($p > 0,05$); ***: $p < 0,001$.

Figura 20 — Efeito do peptídeo HCC77(K) (25,57 μ M) sobre o potencial de membrana mitocondrial de células B16-F10 após 24 h de incubação.

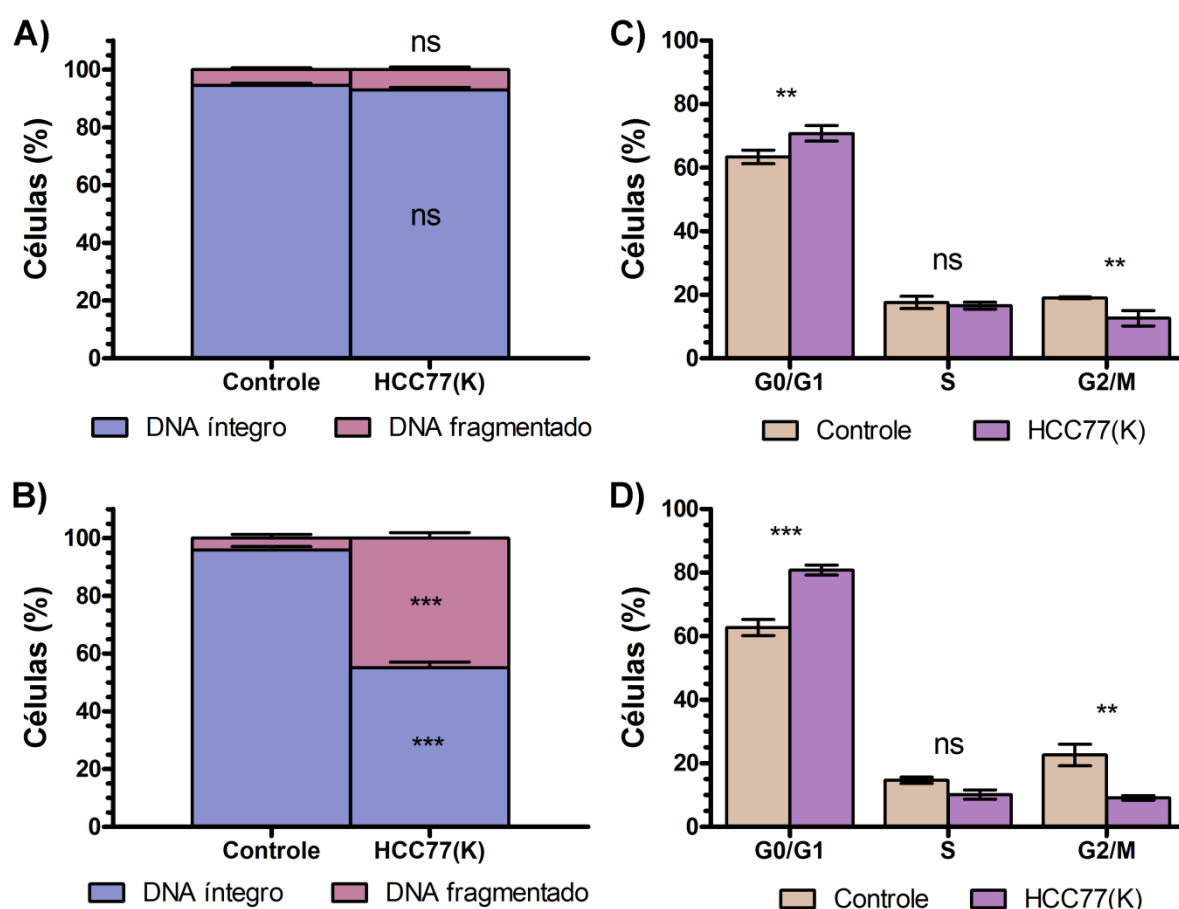


A) Histograma de frequências absolutas de células marcadas com Rodamina123. **B)** Média geométrica da fluorescência em FL1-H (Rodamina 123). **C)** Proporção de células distribuídas em três intervalos de fluorescência da Rodamina 123 indicando o grau de polarização da membrana mitocondrial. Com relação ao controle: ns: diferença não significativa ($p > 0,05$); **: $p < 0,01$.

A marcação com iodeto de propídeo de células tratadas e posteriormente fixadas com etanol permitiu a análise de mudanças nas diferentes etapas do ciclo celular (Figura 21), mostrando que o tratamento com o HCC77(K) na concentração

de 18,34 μM ocasionou um aumento significativo de células na fase G_0/G_1 , de forma paralela à diminuição de células na fase G_2/M , enquanto que a fase S permaneceu inalterada (Figura 21, C). Os mesmos efeitos foram observados em células incubadas com HCC77(K) 25,57 μM , onde aconteceram com maior intensidade (Figura 21, D). Nessa concentração ainda foi possível verificar um aumento de ~41 % na proporção de DNA fragmentado, efeito que não foi observado na concentração de 18,34 μM (Figura 21, A e B).

Figura 21 — Efeitos no ciclo celular e na fragmentação de DNA de células B16-F10 incubadas com o peptídeo HCC77(K).



Integridade do DNA após incubação com HCC77(K) 18,34 μM (A) e 25,57 μM (B). Efeitos sobre a proporção de células nas diferentes fases do ciclo celular após incubação com HCC77(K) 18,34 μM (C) e 25,57 μM (D). Com relação ao controle: ns: diferença não significativa ($p > 0,05$); **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

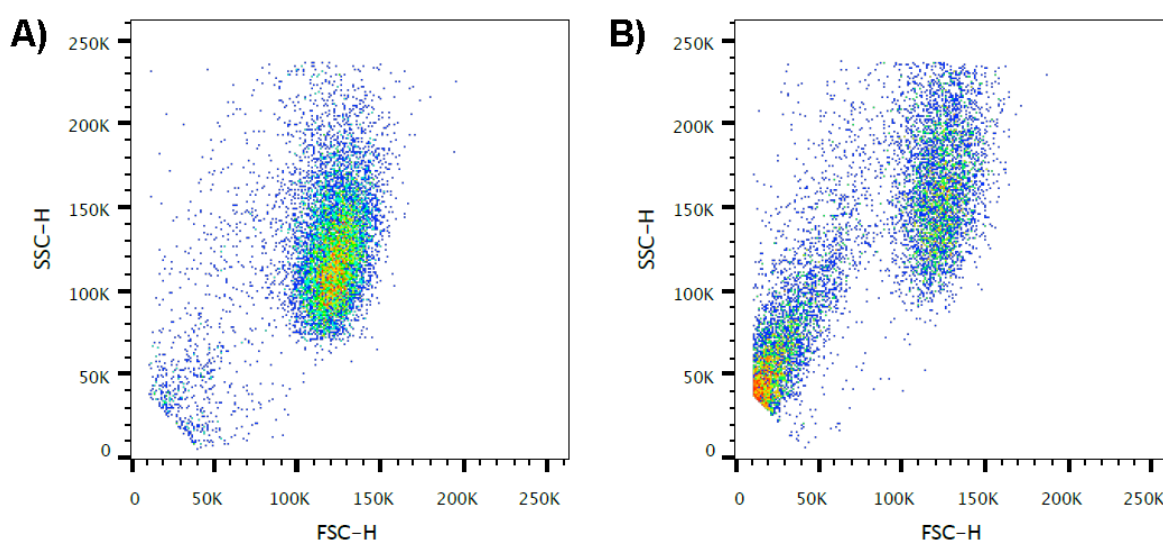
5.6 EFEITOS CITOTÓXICOS E CITOSTÁTICOS DO PEPTÍDEO OCELATINA-F1 SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO

De forma similar ao adotado para HCC77(K), amostras sintéticas do peptídeo ocelatina-F1 (encontrado em secreções de leptodactídeos) foram empregadas na

realização de experimentos utilizando-se citometria de fluxo e microscopia, a fim de verificar seus efeitos em células de câncer. Para estes ensaios foi utilizada novamente a linhagem B16-F10, que apresentou a maior suscetibilidade dentre as duas linhagens de câncer testadas. Para esta etapa, todos os ensaios foram realizados com o peptídeo na concentração de 48,57 μM , equivalente ao valor obtido pelo cálculo da IC_{50} através do método do MTT.

Dados coletados empregando-se citômetro de fluxo nos canais FSC-H e SSC-H revelaram mudanças importantes no tamanho e na granulosidade de células tratadas com ocelatina-F1. Como foi observado para o peptídeo HCC77(K), amostras incubadas com ocelatina-F1 também tiveram um aumento na frequência de células pequenas e de baixa granulosidade (Figura 22).

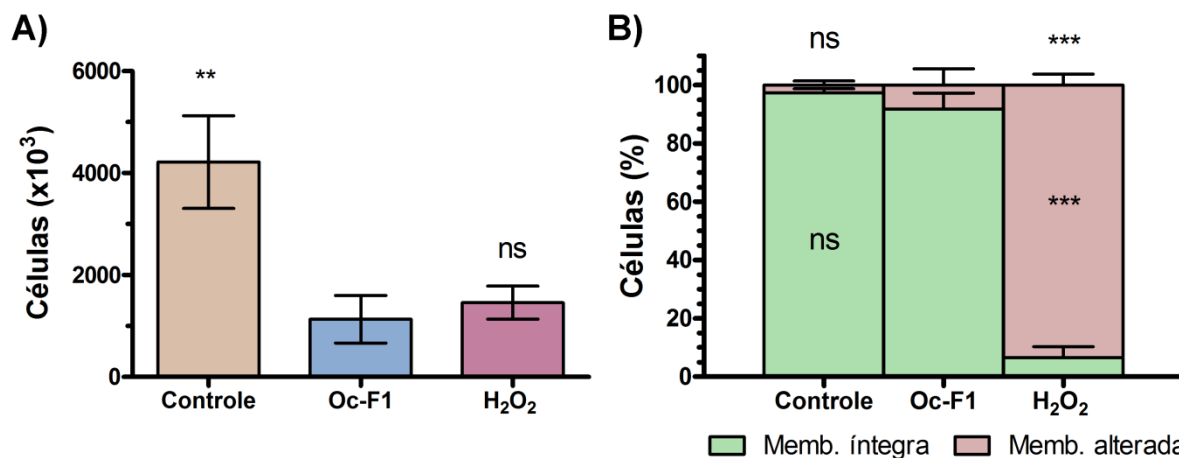
Figura 22 — Efeito da ocelatina-F1 no tamanho (FSC-H) e na granulosidade (SSC-H) de células B16-F10 após 24 h de incubação.



A) Controle. B) ocelatina-F1 48,57 μM .

Da mesma forma, as contagens realizadas pelo método de exclusão do azul de tripano mostraram uma redução significativa no número total de células presentes na placa após o tratamento. Porém, a ocelatina-F1 não induziu alterações significativas na integridade da membrana celular, que sim foram observadas no caso de células incubadas com 1 mM H_2O_2 (Figura 23).

Figura 23 — Contagem pelo método de exclusão do azul de tripano, de células B16-F10 incubadas (24 h) com o peptídeo sintético ocelatina-F1.



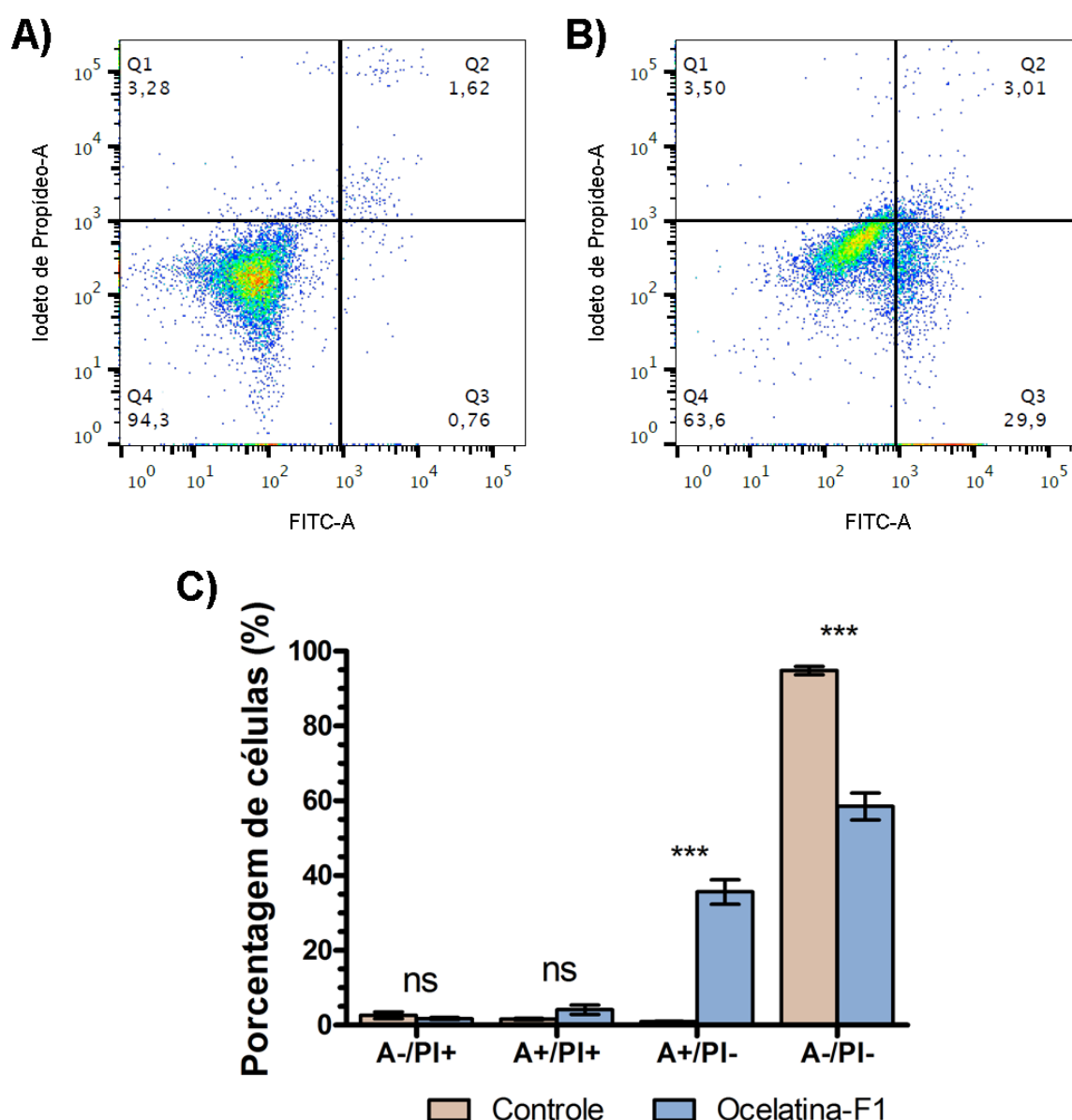
A) Contagem de células totais (viáveis e não viáveis) após incubação com ocelatina-F1 48,57 μ M e H₂O₂ 1 mM. **B).** Percentual de células com a membrana plasmática íntegra (viáveis) e alterada (não viáveis) após incubação com ocelatina-F1 48,57 μ M e H₂O₂ 1 mM. Com relação à ocelatina-F1: ns: diferença não significativa ($p > 0,05$); *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$.

A condição das células após o tratamento foi também analisada por citometria de fluxo, utilizando marcação dupla com Anexina-FITC e iodeto de propídeo (Figura 24). Diferente do observado com o peptídeo HCC77(K), a ocelatina-F1 na concentração de 48,57 μ M apenas induziu mudanças significativas na quantidade de células que responderam positivamente à marcação com Anexina V-FITC (A+/PI-, ~1 % no controle vs ~36 % no tratamento com ocelatina-F1). Consequentemente houve uma redução significativa no número de células “duplas negativas” (A-/PI-, ~95 % no controle vs ~59 % no tratamento com ocelatina-F1), sugerindo um efeito apoptótico, sem presença de necrose, na concentração de peptídeo utilizada.

Experimentos realizados por citometria de fluxo com Rodamina 123 permitiram identificar alterações no $\Delta\Psi_m$ das células após sua incubação com ocelatina-F1. Embora que o teste estatístico não apontasse diferenças significativas nas médias geométricas das distribuições, quando comparadas as células do controle e as tratadas com ocelatina-F1 (Figura 25, B), foi evidente nestas últimas a aparição de duas populações de células ao redor do pico principal (controle), indicando a presença simultânea de células com a Mmi despolarizada e de células com a Mmi hiperpolarizada. O aumento no $\Delta\Psi_m$ (hiperpolarização) já foi observado em células cancerosas e normais como etapa prévia à despolarização da Mmi durante o processo apoptótico (Sánchez-Alcázar *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2007; Giovannini *et al.*, 2002). Tal efeito tem sido geralmente associado à produção

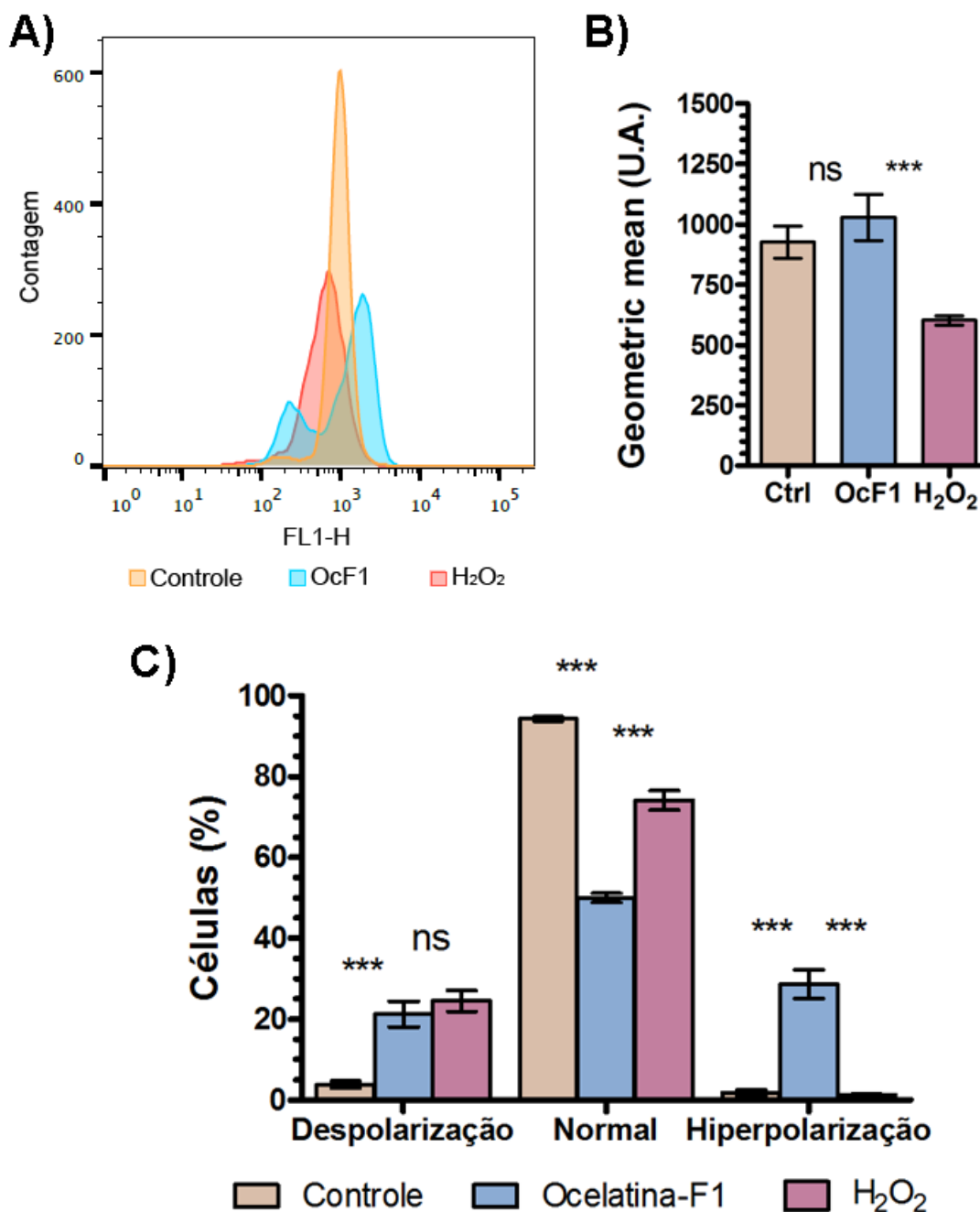
excessiva de ROS na mitocôndria, principalmente através da cadeia respiratória (Skulachev, 2006). Observou-se também que o efeito foi diferente daquele provocado pela incubação das células com H_2O_2 1 mM, que produziu apenas o incremento na região de despolarização, mais característico do processo apoptótico (Figura 25, A e C).

Figura 24 — Efeito da ocelatina-F1 na exposição de fosfatidilserina e na permeabilidade da membrana celular.



Gráficos bidimensionais mostrando diferenças na marcação de células incubadas simultaneamente com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo após o tratamento com água (A) e com ocelatina-F1 48,57 μ M (B). C) Comparação da proporção de células em cada quadrante. Com relação ao controle: ns: diferença não significativa ($p > 0,05$); ***: $p < 0,001$.

Figura 25 — Efeito da ocelatina-F1 após 24 h de incubação sobre o potencial de membrana mitocondrial de células B16-F10.

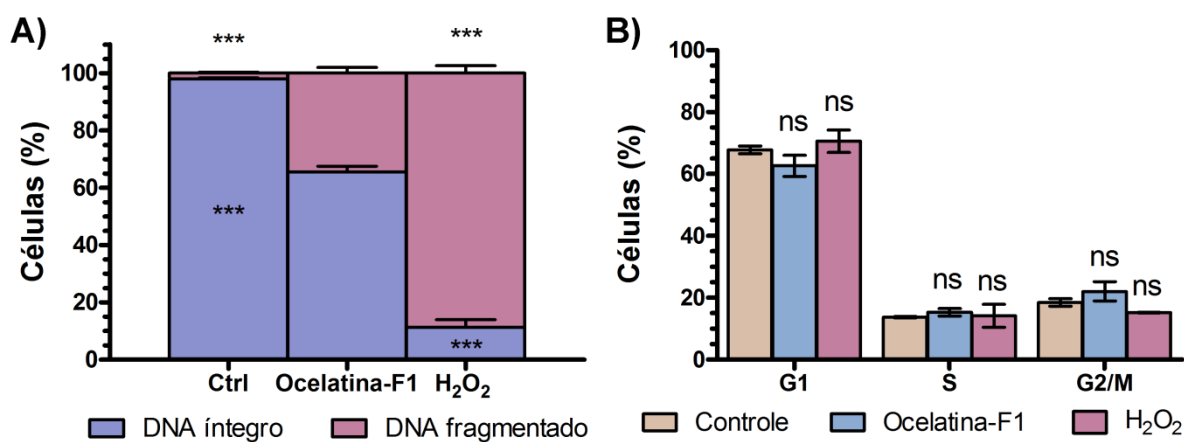


A) Histograma de frequências absolutas de células marcadas com Rodamina 123. **B)** Média geométrica da fluorescência em FL1-H (Rodamina 123). **C)** Proporção de células distribuídas em três intervalos de fluorescência da Rodamina 123 indicando o grau de polarização da membrana mitocondrial. Com relação à ocelatina-F1: ns: diferença não significativa ($p > 0,05$); ***: $p < 0,001$.

Finalmente foi analisado o efeito da ocelatina-F1 sobre a fragmentação de DNA e o ciclo celular em células B16-F10 (Figura 26, A). A marcação com iodeto de propídeo permitiu detectar diferenças na quantidade de DNA fragmentado em

células incubadas com o peptídeo na concentração de 48,57 μM , ocorrendo, como no caso das células tratadas com H_2O_2 , um aumento na fragmentação de DNA (~32 % na ocelatina-F1 e ~87 % no peróxido). Por outra parte, nem o peróxido nem o peptídeo foram capazes de induzir mudanças significativas na proporção de células presentes nas diferentes fases do ciclo celular após o tratamento (Figura 26, B).

Figura 26 — Efeitos no ciclo celular e na fragmentação de DNA de células B16-F10 incubadas com ocelatina-F1.



A) Integridade do DNA após incubação com ocelatina-F1 48,57 μM . **B)** Efeitos sobre a proporção de células nas diferentes fases do ciclo celular após incubação com ocelatina-F1 48,57 μM . ***: $p < 0,001$ com relação à ocelatina-F1; ns: diferença não significativa com relação ao controle ($p > 0,05$).

5.7 ANÁLISE PEPTIDÔMICA DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE *Hypsiboas crepitans* COLETADA NO BRASIL

A secreção cutânea bruta de indivíduos de *H. crepitans* coletados no Brasil, utilizada neste estudo para a realização de testes de viabilidade celular, foi também fracionada por RP-HPLC e, as frações foram analisadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Esses procedimentos foram realizados com o propósito de avaliar a similaridade, em termos de composição peptídica, das duas amostras de secreção desta espécie utilizadas ao longo deste trabalho.

Como pode se apreciar na Figura 27, o perfil cromatográfico da secreção de indivíduos coletados no Brasil (*pool* N° 2) mostrou um padrão completamente distinto do observado para a secreção de indivíduos coletados na Colômbia (*pool* N° 1, Figura 6). Todavia, foi perceptível a complexidade desta secreção, que também apresentou um grande número de frações (aproximadamente 68).

As análises realizadas por espectrometria de massas confirmaram a grande diferença na composição peptídica das duas secreções utilizadas. Através de uma análise geral realizada com todas as frações cromatográficas obtidas do *pool* N° 2, foram identificadas as massas monoisotópicas de 77 peptídeos na faixa de 700–4.000 Da, em 42 frações (Tabela 6). A modo de observação, mais de 2/3 dos peptídeos identificados encontram-se nas faixas de 700–1.000 Da e de 1.300–1.900 Da.

Foi realizada uma busca de identidades nas massas detectadas após o fracionamento das duas secreções, encontrando-se apenas dois peptídeos com massa similar (diferença até 1 Da), que poderiam tratar-se de peptídeos idênticos presentes nas duas amostras. Esses dois peptídeos ao que parece eluem juntos (aparecem na mesma fração) nas duas secreções e possuem massas monoisotópicas de 887,4 e 944,9 Da (fração N° 21, RT = 17,0 min no *pool* N° 1) e 888,4 e 945,4 Da (fração N° 15, RT = 17,7 min e fração N° 16, RT = 17,9 no *pool* N° 2).

Finalmente, nenhum dos dois peptídeos caracterizados a partir da secreção de *H. crepitans* da população da Colômbia (HCC76 e HCC77) foi encontrado na secreção dos indivíduos coletados no Brasil.

Figura 27 — Perfil cromatográfico obtido após o fracionamento da secreção cutânea bruta de *H. crepitans* (Brasil) empregando-se coluna C₁₈.

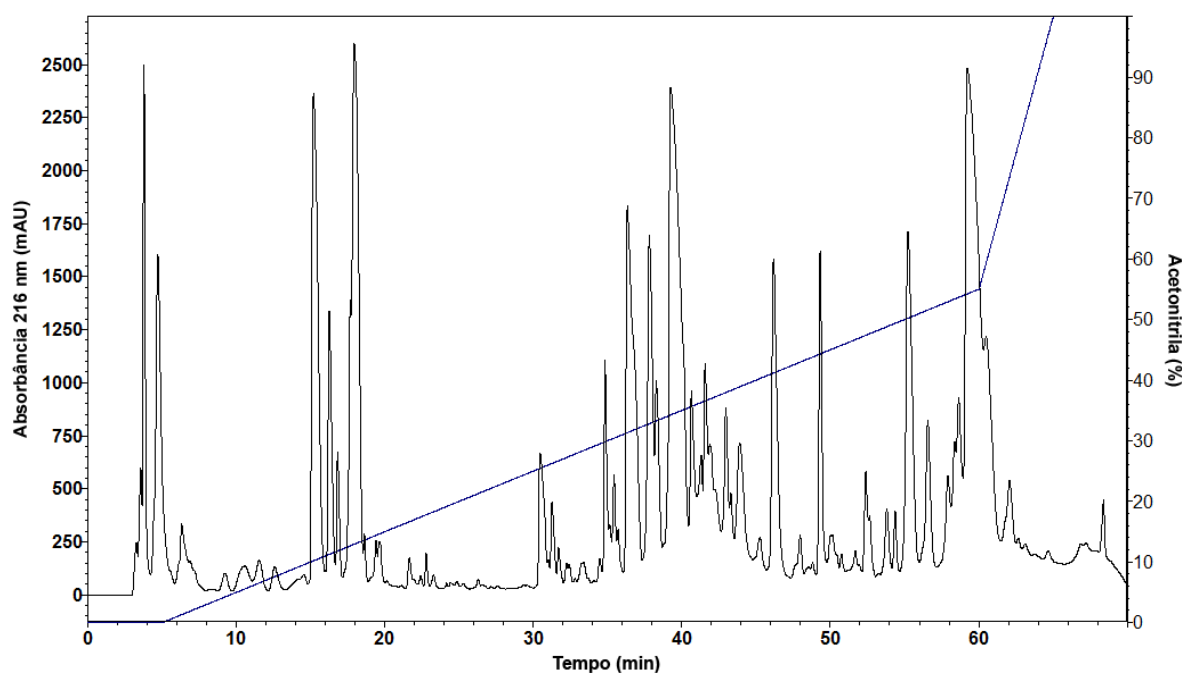


Tabela 6 — Relação dos peptídeos identificados em frações cromatográficas obtidas da secreção cutânea de *H. crepitans* (Brasil).

Fração	RT (min)	Massa Monoisotópica (Da)
11	14,5	813,0
13	16,3	906,5 1.046,7
14	16,8	906,5
15	17,7	888,4 945,4 1.028,5 1.391,5
16	17,9	785,1 888,4 945,4 824,3
17	18,6	976,3 1.275,7 1.460,9
18	19,4	927,5 1.227,6 1.590,0
19	19,6	870,4 1.403,8 1.591,0
20	21,6	1.947,0
21	22,4	791,6 2.399,3 2.474,4
22	22,8	2.399,3
23	23,3	2.399,3 1.947,0 1.711,9 2.381,5
23A	26,6	1.991,3
24	30,4	811,7 1.539,1
25	31,0	839,7 869,8
25A	31,3	839,7 869,8
26	31,7	839,7 869,8
27	32,2	1.422,9 839,7
28	32,4	839,7 869,8 754,7
29	33,3	1.423,0 822,6 1.027,9 839,7 995,9
30	34,5	1.531,1
31	34,8	1.406,0

Fração	RT (min)	Massa Monoisotópica (Da)
34	35,7	1.326,0
		1.383,1
38	39,2	1.402,0
		1.340,5
41	41,6	1.939,3
42	41,9	1.275,9
		1.261,3
		1.461,3
		1.477,2
45	43,9	1.467,4
		1.499,4
48	47,6	845,9
		889,9
49	48,0	845,9
		889,9
50	49,3	1.124,0
		1.140,0
53	51,7	2.272,7
54	52,4	1.473,0
55	52,6	1.473,0
56	53,8	1.546,0
		1.562,0
		1.575,0
		1.597,1
		1.603,1
		1.613,1
57	54,4	1.603,1
		1.619,0
58	55,2	2.919,6
59	56,6	2.933,7
		1.716,2
62	58,6	2.723,9
		1.995,3
		2.011,3
63	59,2	1.879,4
		1.835,2
		1.863,4
64	60,5	1.863,4
		1.879,4
		1.885,3
		1.901,3
65	62,1	1.764,4
		1.863,4
		1.879,4
		2.160,7
66	68,4	2.218,7
		1.874,4
		1.890,3
		1.879,4
		1.863,4

6. DISCUSSÃO

Um grande número de estudos utilizando secreções de anfíbios tem permitido até hoje o isolamento de milhares de peptídeos com diversas atividades biológicas, que incluem neuropeptídeos, PAMs e PACs, agentes antivirais, fungicidas, entre outros (Pukala *et al.*, 2006). O presente trabalho permitiu a caracterização da secreção de *Hypsiboas crepitans* de duas populações aliada à descrição de dois peptídeos inéditos presentes na população colombiana; bem como o avanço no conhecimento das propriedades biológicas de outros dois peptídeos previamente descritos em secreções de *Leptodactylus spp.*

As secreções de *Hypsiboas crepitans* obtidas das duas populações estudadas, presentes na Colômbia (*pool* N° 1) e no Brasil (*pool* N° 2) mostraram grande complexidade na sua composição, como pode ser inferido pela observação dos dois perfis cromatográficos (Figura 6 e Figura 27) e pelo número de peptídeos identificados por espectrometria de massas (Tabela 3 e Tabela 6). Essa mesma complexidade já foi observada em secreções de outras espécies do gênero estudadas por nosso grupo, como *H. lundii* (Castro *et al.*, 2005) e *H. albopunctatus* (Castro *et al.*, 2009). De um ponto de vista ecológico, *H. crepitans* é uma espécie com ampla distribuição espacial e altitudinal, presente em uma grande variedade de ambientes, muitos dos quais apresentam uma marcada intervenção antrópica (La Marca *et al.*, 2011). Desta forma, é presumível que os animais estejam expostos a um número considerável de patógenos, sendo que a ocorrência de vários peptídeos de defesa na pele pode constituir uma estratégia vantajosa de modo a permitir a sobrevivência da espécie em ambientes muito perturbados. De fato, um estudo recente realizado em condições *ex-situ* indica que *H. crepitans* é capaz de sobrepor-se à infecção pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* dias após contraí-la (Márquez *et al.*, 2010).

A análise dos perfis cromatográficos das duas secreções, aliada às análises por espectrometria de massas confirma a presença de grandes diferenças na composição peptídica dos venenos. Diferenças entre populações da mesma espécie já foram reportadas em hílídeos australianos (Pukala *et al.*, 2006) e inclusive utilizadas como ferramenta para validar a separação de espécies próximas (Wabnitz *et al.*, 1999). Sendo que a identidade de *H. crepitans* ao longo das diferentes populações conhecidas ainda é motivo de debates, dados de peptidômica da

secreção como os obtidos aqui podem fornecer informação importante a ser considerada pelos taxonomistas. No entanto, estes estudos devem considerar fatores sazonais, visto que a composição ou abundância relativa de peptídeos na pele de anfíbios pode mudar de acordo com a atividade reprodutiva da espécie (Wabnitz *et al.*, 2000; Brinkworth *et al.*, 2005).

O isolamento através de cromatografia líquida aliado às análises por espectrometria de massas e sequenciamento químico permitiram a determinação quase total da estrutura primária de dois novos peptídeos (HCC76 e HCC77) suspeitos de serem responsáveis pela atividade antimicrobiana observada nos testes preliminares com bactérias e fungos. O uso de ferramentas bioinformáticas para a busca por sequências similares e o posterior alinhamento destas sugeriu a classificação desses dois peptídeos como novos membros da família das hilinas. O alinhamento dos peptídeos HCC76 e HCC77 junto às hilinas descritas previamente na literatura (Quadro 1) mostra a alta incidência, nessa família, dos resíduos hidrofóbicos leucina, alanina e glicina, que são conhecidos por estabilizarem ou promoverem a formação de α -hélices (Dennison, 2004; Rollins-Smith *et al.*, 2005; Tossi, Sandri e Giangaspero, 2000).

Embora não exista certeza ainda sobre os mecanismos específicos de ação de muitos PAMs, é geralmente aceito que sua eficácia depende em grande parte da interação com a membrana da célula-alvo (Hancock e Rozek, 2002). Muitos PAMs podem adotar estruturas em α -hélice anfífilas ao ligar-se à membrana citoplasmática ou interagir com a superfície externa de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas (Devine, 2003; Tossi, Sandri e Giangaspero, 2000). De fato, os α -PAMs encontram-se entre os PAMs mais abundantes e melhor distribuídos na natureza (Tossi, Sandri e Giangaspero, 2000). A amidação no C-terminal, presente em todas as hilinas descritas até a data (e proposta também para estes dois novos peptídeos) é uma característica que, em muitos casos, favorece a formação e estabilização de estruturas em α -hélice (White e Wimley, 1999), ao mesmo tempo que incrementa a carga líquida da molécula e reduz a susceptibilidade frente a enzimas carboxipeptidases (Shalev, Mor e Kustanovich, 2002). Ensaios de dicroísmo circular (Castro *et al.*, 2009) sugeriram que a hilina-a1 adota conformação em α -hélice em presença de solventes indutores de estrutura secundária, de modo que a similaridade estrutural observada nas hilinas sugere que seu mecanismo de ação implica, como em muitos PAMs de anfíbios, a adoção de estruturas em hélice.

No presente estudo foram propostos dois análogos do PAM HCC77(K), uma vez que esse peptídeo apresentou moderada atividade antiproliferativa sobre bactérias e células tumorais. A proposição de análogos de PAMs busca, de maneira geral, aprimorar a sua eficiência biológica, aumentando tanto sua potência como seletividade. Vários parâmetros são levados em consideração durante tal abordagem como, por exemplo, a redução na extensão da cadeia polipeptídica de modo a produzir um análogo ativo com uma cadeia mais curta, reduzindo dessa forma os custos de sua produção. Outros aspectos bastante explorados estão relacionados à cationicidade do peptídeo e a sua tendência à formação de uma hélice anfipática, características muito importantes para sua interação com as membranas dos microrganismos, bem como para sua permeabilização (Guimarães *et al.*, 2016).

A substituição do resíduo de prolina na posição 7 nos dois análogos foi realizada em virtude da menor propensão desse aminoácido em promover a formação de estruturas em α -hélice, uma vez que o grupo amino secundário do aminoácido prolina não forma ligações de hidrogênio com os átomos presentes em suas vizinhanças, o que garante uma certa rigidez à molécula, dificultando a formação de estruturas em α -hélice (Bahar e Ren, 2013). A substituição dos demais resíduos do peptídeo HCC77(K)1 por resíduos polares ou catiônicos foi implementada com o propósito de aumentar seu caráter anfipático e, conseqüentemente, gerar um análogo com maior afinidade pelas membranas bacterianas aniônicas (Sitaram e Nagaraj, 1999). Já as demais substituições promovidas no análogo HCC77(K)2 objetivaram garantir um aumento substancial na cationicidade do peptídeo, o que poderia proporcionar uma ligação mais forte às membranas bacterianas, devido à maior extensão da área catiônica que interage com a superfície aniônica destas. Além disso, a substituição dos resíduos de alanina nas posições 10 e 12 por resíduos de leucina garantiram um aumento no caráter hidrofóbico dessa região, em virtude da presença de um grupo lateral mais apolar e ramificado.

Predições de estrutura secundária utilizando o algoritmo SOPMA sugerem que o peptídeo HCC76 tem propensão para formar uma α -hélice entre os resíduos 1–16, o que representa 89 % da sua estrutura. Por sua vez, as predições sugerem que o peptídeo HCC77(K) e os dois análogos projetados pela modificação da sua

sequência poderiam adotar a conformação em α -hélice ao longo da cadeia inteira (100 % dos resíduos, 1–18).

Para um melhor entendimento sobre a possível relação da estrutura-função destes peptídeos foram realizadas projeções em rede e em roda helicoidal (Figura 28) e foram analisados, por métodos teóricos, parâmetros considerados importantes para a interação dos α -PAMs com membranas biológicas (Tabela 7). Os peptídeos HCC76 e HCC77 foram encontrados nas duas últimas frações coletadas durante o fracionamento da secreção bruta, sugerindo um alto grau de hidrofobicidade nas duas moléculas. Pela observação das projeções em rede é possível inferir a presença de interações múltiplas entre resíduos hidrofóbicos que podem contribuir para a formação da hélice. De fato, uma característica evidente nos peptídeos analisados por esses métodos é o alto grau de hidrofobicidade $\langle H \rangle$ obtido através dos cálculos, com valores acima de 0,65.

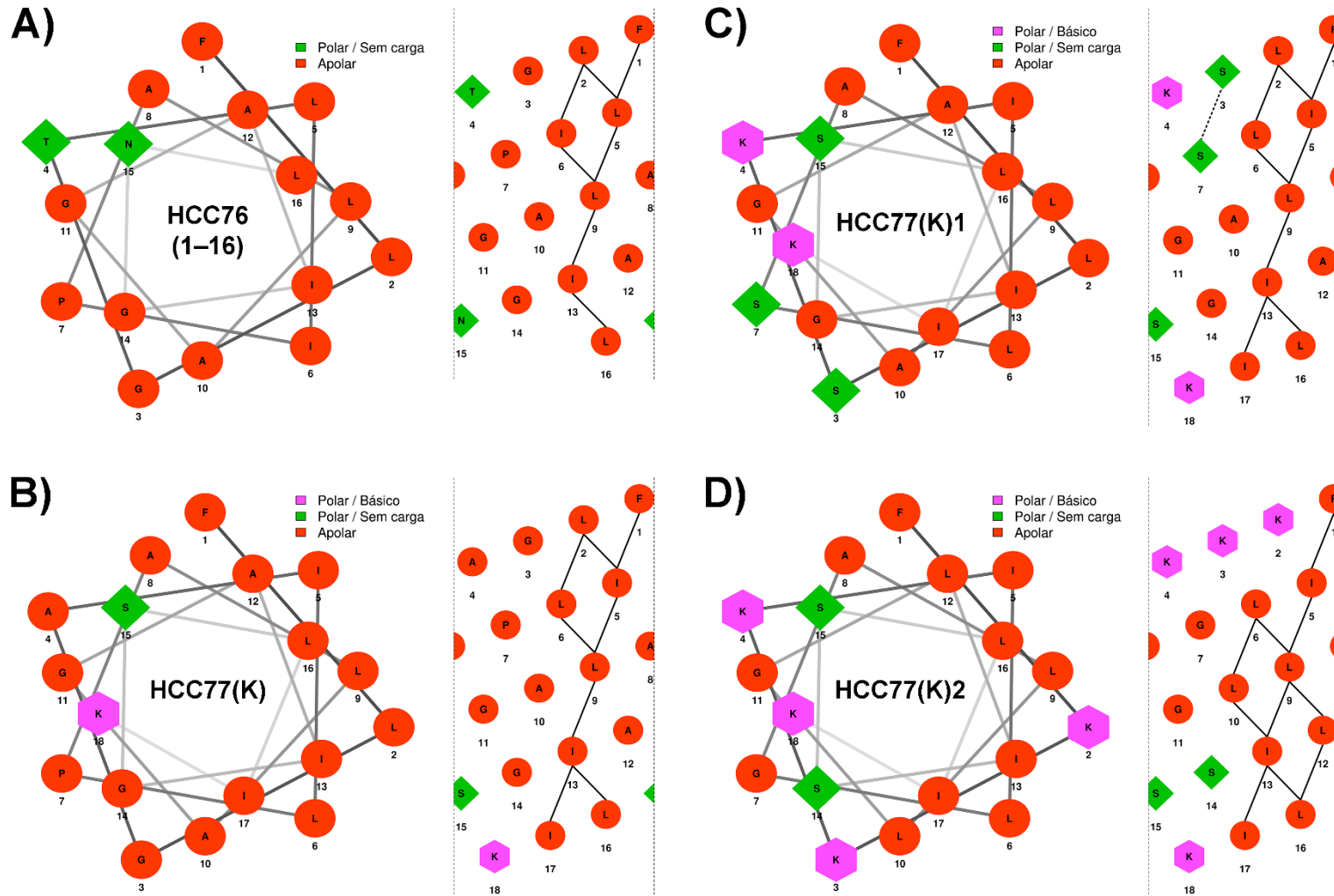
Tabela 7 — Propriedades físico-químicas teóricas de peptídeos derivados da secreção cutânea bruta de *H. crepitans* (Colômbia).

Peptídeo	MM (Da)	Q	% Hélice	$\langle H \rangle$	$\langle \mu H \rangle$
HCC76	1.754,12	+1	89	0,864	0,474
HCC76 (1–16)*	-	-	-	0,844	0,516
HCC77(K)	1.724,14	+2	100	0,829	0,520
HCC77(K)1	1.801,22	+3	100	0,712	0,620
HCC77(K)2	1.941,49	+5	100	0,664	0,522

MM = Massa molecular média; Q = carga (em pH = 7,0); $\langle H \rangle$ = Hidrofobicidade média (Fauchère e Pliška, 1983); $\langle \mu H \rangle$ = Momento hidrofóbico médio (Eisenberg, Weiss e Terwilliger, 1982). *Região em α -hélice, de acordo com a predição de estrutura secundária.

A conformação em α -hélice e a anfipaticidade são consideradas importantes para a atividade hemolítica e para a atividade sobre bactérias Gram-positivas (Dathe *et al.*, 1997; Giangaspero, Sandri e Tossi, 2001). A observação das projeções em roda helicoidal mostram o alto grau de anfipaticidade dessas moléculas que apresentaram regiões hidrofóbicas e hidrofílicas diferenciadas e valores de $\langle \mu H \rangle$ acima de 0,45. Essa diferença é ainda mais estreita quando se consideram unicamente as regiões de suposta conformação helicoidal no peptídeo HCC76.

Figura 28 — Projeções em roda helicoidal e projeções em rede de peptídeos derivados da secreção de *H. crepitans* (Colômbia) e dos dois peptídeos desenhados a partir destes.



A) HCC76 (resíduos 1–16). **B)** HCC77(K). **C)** Análogo desenhado HCC77(K)1. **D)** Análogo desenhado HCC77(K)2.

Considerando a atividade biológica observada para os peptídeos HCC76 e HCC77(K), resulta surpreendente a similaridade observada nos valores de μH calculados para essas duas moléculas, assim como em outras características inferidas a partir das sequências primárias. O alinhamento das sequências desses dois peptídeos (Quadro 1) também mostrou alta similaridade entre elas, com 72 % de identidade e várias substituições conservativas. Entretanto, os peptídeos sintéticos HCC76 e HCC77(K) apresentaram atividades biológicas muito diferentes, sendo que HCC76 teve uma atividade fraca em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, uma atividade igualmente fraca em células de câncer de mama humano e nenhuma atividade hemolítica em hemácias humanas. Já o peptídeo HCC77(K) mostrou atividade considerável em bactérias Gram-positivas e células de melanoma murino, câncer de mama humano e fibroblastos murinos, atividade hemolítica moderada, pouca atividade em leveduras, e nenhuma atividade sobre bactérias Gram-negativas.

Estudos feitos com membranas miméticas sugerem que o caráter catiônico dos PAMs pode ser determinante para a formação de poros nas membranas biológicas (Sengupta *et al.*, 2008). Isso sugere que provavelmente é a carga líquida da molécula (e não a anfipaticidade) quem determina em grande medida a atividade citolítica das hilinas. Esta hipótese encontra apoio, não apenas à luz dos resultados de atividade observados para HCC76 e HCC77(K) (Q = +1 e +2, respectivamente), mas também no fato da hilina-a1 (com carga líquida +3) ser muito mais hemolítica que do HCC77(K) (Castro *et al.*, 2009). É possível que a atividade antifúngica também seja afetada por este parâmetro, pois a hilina-a1 também mostrou uma atividade considerável em várias espécies de *Candida*. Por outro lado, e reforçando esta hipótese, os resultados dos testes de viabilidade celular mostraram uma diminuição nas concentrações inibitórias 50 (IC₅₀) em células de melanoma murino e fibroblasto murino, quando usados os dois análogos desenhados HCC77(K)1 e HCC77(K)2, menos hidrofóbicos e mais catiônicos.

Diversas pesquisas têm validado o potencial de extratos e secreções de anuros como fontes de agentes anticâncer. Estudos efetuados com amostras da pele de bufonídeos demonstraram efeitos deletérios em linhagens tumorais de fígado (Qi *et al.*, 2010); glândula mamária (Sciani *et al.*, 2013); colon, ovário e cérebro (Ferreira *et al.*, 2013); estômago, pulmão e bexiga (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2014) bem como em várias linhagens de leucemia (Ferreira *et al.*, 2013; Schmeda-

Hirschmann *et al.*, 2014; Giri *et al.*, 2006). O estudo realizado por Sciani *et al.* (2013) também evidenciou o potencial citotóxico da secreção cutânea do hilídeo sul-americano *Pithecopus hypochondrialis* (antigamente *Phyllomedusa hypochondrialis*) em linhagens de câncer de mama. Os resultados dos testes de proliferação realizados neste trabalho com a secreção de *H. crepitans* sobre células de mamíferos evidenciaram uma atividade fraca quando comparada às secreções desses anfíbios. No estudo de Sciani *et al.* (2013) as secreções de vários bufonídeos mostraram valores de IC₅₀ abaixo de 50 µg/mL, e no caso de *P. hypochondrialis* esse valor chegou a 5 µg/mL. Outro trabalho, realizado recentemente por nosso grupo utilizando secreção bruta de *Physalaemus nattereri* (Leptodactylidae: Leiuperinae) mostrou valores de IC₅₀ abaixo de 3 µg/mL (e Carvalho *et al.*, 2015).

Além disso, foram observadas diferenças notáveis na atividade da secreção bruta sobre células aderentes de mamíferos em comparação aos resultados obtidos para os peptídeos sintéticos isolados HCC76 e HCC77(K). Como se observa na Figura 9, a linhagem de melanoma murino (B16-F10) apresentou pouca suscetibilidade ao tratamento com a secreção, com valores acima de 200 µg/mL, sendo a linhagem que menos respondeu ao tratamento, entre as três testadas. O peptídeo HCC76 não evidenciou nenhuma atividade inibitória sobre esta linhagem, enquanto o peptídeo HCC77(K) mostrou a maior suscetibilidade nos ensaios (Tabela 5). A observação das grandes diferenças existentes nos perfis cromatográficos (Figura 6 e Figura 27) e na composição peptídica dos dois *pools* de secreção utilizados (Tabela 3 e Tabela 6) já explica em grande medida a falta de correspondência entre atividade biológica da secreção e dos peptídeos isolados dela. Por outra parte, a efetividade da secreção na toxicidade sobre células de mamífero ainda pode depender da presença de outras moléculas não peptídicas. Embora incomum para esta família, um estudo recente de Lamadrid-Feris *et al.* (2015) sugeriu a presença de vários alcaloides na secreção cutânea de *H. crepitans*, alguns dos quais tem reportado atividade citotóxica *in vitro* em linhagens celulares de mamíferos (Casapullo *et al.*, 2001; Melegari *et al.*, 2015) e em culturas primárias de neurônios de peixe (Silva *et al.*, 2014).

Os resultados globais deste estudo mostraram uma seletividade baixa *in vitro* por células cancerosas por parte da secreção cutânea de *H. crepitans* e dos peptídeos HCC77(K), HCC77(K)1, HCC77(K)2, G16OCP1 e ocelatina-F1 (Página 54

e Tabela 5), fato evidente pela observação dos valores de IC₅₀ muito próximos para fibroblastos (NIH-3T3) e células de melanoma murino (B16-F10). Diferenças na membrana plasmática entre células cancerosas e células saudáveis podem contribuir para a seletividade de muitos PACs por células malignas. Características como a carga líquida da superfície, o potencial de membrana, a fluidez da bicamada, o conteúdo de colesterol, e as modificações em glicolípídios e glicoproteínas associadas à membrana podem ser determinantes neste aspecto (Hoskin e Ramamoorthy, 2008).

Em termos gerais, considera-se que a interação entre as características dos peptídeos e a composição da membrana celular é o que determina a especificidade e a potência da atividade desempenhada pelo peptídeo (Dennison *et al.*, 2006). Além das propriedades já descritas para os peptídeos derivados de *H. crepitans*, as predições de estrutura secundária para a ocelatina-F1 mostram que este peptídeo tem propensão para formar α -hélices, possui anfipaticidade moderada e, além disso é catiônico (com carga +3 em pH 7,0) (Libério, 2008).

Estudos avaliando a atividade antimicrobiana da ocelatina-F1 têm sido divergentes quanto às concentrações efetivas deste peptídeo sobre vários tipos de bactérias (Tabela 2). Apesar disso, parece haver consenso em que o peptídeo possui uma atividade moderada sobre várias bactérias Gram-negativas. O estudo de Libério (2008) ainda mostrou uma atividade moderada em bactérias Gram-positivas e a comparação desses dados com os dados de Rollins-Smith *et al.* (2005) e Nielsen *et al.* (2007) sugerem que as diferenças observadas poderiam relacionar-se com o tipo de cepas bacterianas usadas nos diferentes ensaios.

Assim mesmo, parece razoável que o tipo de amostra utilizada (peptídeo nativo isolado da secreção vs peptídeo sintético) possua alguma influência sobre a atividade biológica deste peptídeo em bactérias (Tabela 2) e células tumorais (Tabela 8). Os testes realizados neste trabalho com o peptídeo sintético mostraram valores de IC₅₀ maiores para células B16-F10 e MCF-7, quando comparados aos resultados obtidos em um estudo anterior utilizando o peptídeo isolado da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* (Prías-Márquez, 2010). É provável que as diferenças observadas sejam produto do método utilizado para quantificar os peptídeos. O método do peso seco, bem como outros métodos de estimação indireta têm sido amplamente usados para determinar a concentração de proteínas em solução (Pace *et al.*, 1995). No entanto, desde várias décadas atrás existem incertezas em relação

ao uso do peso seco para tais fins, principalmente pela falta de critérios adequados e padronizados para garantir a remoção total do solvente sem alterar o estado oxidativo da molécula (Hunter, 1966). Desta forma, moléculas iguais, mas de procedências distintas podem divergir quanto à magnitude de uma propriedade derivada da sua massa (Kupke e Dorrier, 1978).

Tabela 8 — Comparação da atividade antiproliferativa da ocelatina-F1 em dois estudos independentes utilizando amostras de peptídeo nativo ou sintético.

OCELATINA-F1	IC50 (µM)	
	B16-F10	MCF-7
Peptídeo Nativo ^a	21,11	55,51
Peptídeo Sintético ^b	48,57	86,38

^a Prías-Márquez (2010). ^b Este trabalho.

Por outra parte, a utilização dos parâmetros de MIC e HC₅₀ pareceu ter pouca confiabilidade em prever a seletividade dos peptídeos por células cancerosas, principalmente no caso dos peptídeos de *L. labyrinthicus*. O peptídeo ocelatina-F1 apresenta atividade antimicrobiana a partir de 16 µM contra várias cepas de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, com um fraco efeito hemolítico acima dos 128 µM (Tabela 2). No entanto, esse peptídeo mostrou-se mais tóxico sobre fibroblastos normais nos testes realizados aqui (Figura 15). A mesma situação foi observada com o peptídeo G16OCP1 (Figura 14), que apresenta atividade antimicrobiana a partir de 32 µM e nenhuma atividade hemolítica perceptível até 128 µM (Prías-Márquez, 2012). A fraca atividade desse peptídeo foi de fato surpreendente, pois seu peptídeo análogo, ocelatina-P1 (que difere unicamente na substituição conservativa Gly¹⁶ → Ser e apresenta atividade antimicrobiana similar) possui atividade em células B16-F10 e NIH-3T3 abaixo de 40 µM (Libério *et al.*, 2011). Também de forma similar aos peptídeos de *L. labyrinthicus* usados nesse trabalho, a ocelatina-P1 possui um fraco efeito hemolítico (King *et al.*, 2005; Libério, 2008). Aparentemente, a previsão da atividade citotóxica em células aderentes de mamíferos tem mais significado quando analisados os peptídeos de *H. crepitans*, HCC76 e HCC77(K). O primeiro apresentou uma fraca atividade em todos os testes realizados, sendo que atividade antimicrobiana (acima de 128 µM) não pôde ser determinada com precisão, a atividade hemolítica foi imperceptível em 128 µM e a IC₅₀ em células de câncer esteve acima desse valor (MCF-7, Figura 10). Por sua vez, o peptídeo HCC77(K) foi antimicrobiano a partir de 32 µM e moderadamente

hemolítico ($HC_{50} = 79,4 \mu M$), mostrando assim mesmo um efeito pouco seletivo entre células aderentes normais e cancerosas (Figura 12).

Os diferentes testes realizados com os peptídeos ocelatina-F1 e HCC77(K) empregando-se técnicas mais específicas de microscopia, coloração, marcação com fluoróforos e análise por citometria permitiram observar aspectos mais detalhados sobre o efeito desses dois peptídeos em células de melanoma murino.

Em ambos os casos foi observada uma diminuição no número total de células presentes após o tratamento (Figura 18 e Figura 23). Este fato levanta duas possíveis situações: a primeira, que esses dois peptídeos exercem um efeito antiproliferativo, impedindo ou atrasando a replicação das células, ou, a segunda, que o efeito dessas moléculas é tão rápido que permite observar um rápido declínio na população após 24 h de incubação. O tempo de duplicação de células B16-F10 tem sido abordado em alguns estudos, mostrando tempos inferiores a 21 h (Danciu *et al.*, 2013; Ohira *et al.*, 1994), portanto considera-se que o tempo de 24 h utilizado neste estudo é suficiente para permitir a replicação das células em condições normais. Esse fato ainda foi corroborado pelo aumento na confluência das células do controle após as 24 horas do tratamento.

Células incubadas com o peptídeo HCC77(K) a $25,57 \mu M$ mostraram mudanças drásticas na morfologia que sugerem uma morte celular rápida com apenas 2 horas de incubação (dados não apresentados). Após 24 horas ainda foi possível observar uma redução no tamanho, acompanhada do arredondamento das células (Figura 16), características que são consistentes com o processo de morte celular por apoptose (Boleti *et al.*, 2008). A contagem de células pelo método do azul de tripano evidenciou alterações na membrana em células incubadas com o peptídeo na concentração de $25,57 \mu M$ (IC_{75}), mas não na concentração de $18,34 \mu M$ (Figura 18), sugerindo, por outra parte, um efeito necrótico em concentrações altas.

Observações realizadas no citômetro de fluxo evidenciaram uma diminuição nos sinais dos canais FSC e SSC para o peptídeo HCC77(K) ($25,57 \mu M$, Figura 17). O canal FSC responde a mudanças no índice de refração das células assim como à sua área de seção plana, enquanto os valores de SSC estão relacionados com a rugosidade (irregularidade) e granularidade da partícula (Longobardi Givan, 2001). A diminuição desses valores é característica em células que sofrem necrose, mas também é possível observá-la em certas etapas do processo apoptótico, mostrando

que a simples análise dessas duas variáveis não constitui um marcador confiável de morte atribuída a um processo ou outro (Wlodkowic *et al.*, 2011). Como prova disso, o comportamento desses dois parâmetros foi similar em células tratadas com ocelatina-F1 (Figura 22), sem que fossem evidenciadas alterações na membrana, pelo método do azul de tripano.

Os resultados dos testes de citometria utilizando marcação dupla com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo permitiram esclarecer as dúvidas geradas pelos dados de morfologia celular. No caso da ocelatina-F1 (Figura 24) foi observado um aumento no número de células positivas unicamente para o fluoróforo FITC conjugado à Anexina V, mudança que veio acompanhada da diminuição no número de células que não incorporaram nenhum dos dois fluoróforos (duplas negativas). Essa observação constitui uma forte evidência de que grande parte (~29 %) das células tratadas com ocelatina-F1 encontrava-se com a membrana intacta enquanto submetidas ao processo apoptótico, evidente pela exposição de fosfatidilserina na face externa da membrana celular.

Por outro lado, o tratamento com HCC77(K) a 25,57 μ M também levou a uma diminuição no número de células duplas negativas, mas essa mudança esteve acompanhada pelo aumento do número de células positivas unicamente para FITC (~53 %) assim como de duplas positivas (~29 %) (Figura 19). Essas observações evidenciam que as células tratadas com HCC77(K) também sofrem o processo apoptótico, mas ainda corroboram (devido à penetração e consequente fluorescência do iodeto de propídeo) que boa parte dessas células apresentava a membrana celular alterada, como foi demonstrado pela coloração das células com azul de tripano. Tais fatos sugerem que, após o tratamento, as células encontravam-se em fase tardia de apoptose, ou que os dois processos poderiam estar acontecendo de forma simultânea. Todavia, a permeabilização da membrana é um evento que acontece cedo no processo necrótico, enquanto que na apoptose essa característica só aparece nas etapas finais do processo (Longobardi Givan, 2001). A observação de que o efeito na morfologia celular aparece após poucas horas de incubação e sem mostrar evidência de vesiculação na superfície da membrana (Figura 16, C), apoia a ideia de que (pelo menos) as células observadas com dupla marcação no citômetro encontravam-se em fases tardias do processo apoptótico, o que tampouco descarta que a necrose aparecesse cedo como um processo paralelo àquele.

Células incubadas com os peptídeos HCC77(K) e ocelatina-F1 também mostraram alterações no potencial de membrana mitocondrial. No caso de HCC77(K) foi observado um deslocamento no pico de fluorescência de Rodamina 123, indicando um aumento no número de células com a MMi despolarizada. Ainda que a estatística apontasse a ausência de diferenças significativas entre os valores da média geométrica do controle e do tratamento, foi evidente pela observação da Figura 20, A, a existência de duas populações de células superpostas, indicando claramente condições diferentes no $\Delta\Psi_m$. Apesar desse efeito não ter envolvido grande parte das células (~13 %), essa quantidade resultou significativa no teste estatístico.

Por outra parte, o teste realizado com a ocelatina-F1 mostrou um efeito um tanto diferente (Figura 25). Se houve uma mudança no padrão de fluorescência observado para a Rodamina 123, o deslocamento aconteceu nas duas direções, evidenciando que a metade das células encontrava-se com fluorescência normal, enquanto a outra metade distribuía-se de forma não uniforme entre a região de despolarização (aumento de ~17 %) e a região de hiperpolarização (aumento de ~27 %). Novamente o teste de significância avaliando as médias geométricas dos histogramas de fluorescência falhou em mostrar a evidente diferença existente entre o controle e as células tratadas com o peptídeo. Contrariamente, os testes estatísticos avaliando a quantidade de células envolvida reafirmam o evidente incremento no número de células com a MMi despolarizada e com a MMi hiperpolarizada.

A avaliação do $\Delta\Psi_m$ tem sido usada como um mecanismo indireto para conhecer em parte o estado fisiológico da mitocôndria através do transporte de membrana e assim avaliar o estado energético da célula (Ludovico, Sansonetty e Corte-Real, 2001). Esse potencial usualmente é reduzido quando afetado o metabolismo energético, o qual é notável durante a apoptose (Sklar, 2005). Alguns PAMs e, por extensão, PACs interagem com membranas bacterianas, as quais compartilham similaridades estruturais com a membrana mitocondrial externa dos eucariotas (Kim *et al.*, 2003) podendo inclusive desencadear processos apoptóticos após alterarem a função da mitocôndria (Ellerby *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001). Portanto parece plausível que através da alteração do $\Delta\Psi_m$, peptídeos como a ocelatina-F1 ou HCC77(K) consigam causar a liberação de fatores indutores de apoptose que residem no espaço intermembrana da mitocôndria, como a enzima

AK-2 (adenilato cinase-2) ou a proteína Smac/DIABLO. Interações eletrostáticas entre moléculas catiônicas e fosfolipídios aniônicos presentes na Mmi poderiam causar a liberação do citocromo c para o citosol (Ott *et al.*, 2002), com a consequente ativação da apoptose pela via intrínseca. Um estudo recente demonstrou que um pequeno peptídeo em α -hélice derivado da peçonha da vespa *Vespa lewisii* é capaz de induzir apoptose por essa via após alterar a função e a morfologia da mitocôndria em células B16-F10-Nex2 (de Azevedo *et al.*, 2015).

Ensaio realizado por citometria de fluxo permitiram observar um aumento considerável na quantidade de DNA fragmentado após a exposição das células B16-F10 ao peptídeo ocelatina-F1 (Figura 26, A). Apesar deste aumento não ser tão evidente quanto foi nas amostras tratadas com H_2O_2 , constitui aproximadamente 1/3 da proporção total de células, o que é um valor considerável diante das alterações de menor proporção observadas nos outros testes. Por outro lado, células tratadas com o peptídeo HCC77(K) só mostraram alterações significativas na proporção de DNA fragmentado, quando incubadas na concentração de 25,57 μ M (IC_{75}) não sendo assim em 18,34 μ M (IC_{50}). (Figura 21, A e B).

Esses dados parecem reafirmar a hipótese de que a atividade inibitória por parte do peptídeo HCC77(K) envolve a ativação da apoptose, visto que o aumento na fragmentação de DNA é considerado um indício de atividade apoptótica em fase tardia, como consequência da ativação de enzimas endonucleases (Longobardi Givan, 2001; Bhutia *et al.*, 2008). Assim mesmo, essas informações apoiam a hipótese de que a necrose participa, ao menos parcialmente, como uma etapa final no processo de morte celular por apoptose induzido pelo peptídeo HCC77(K) na concentração de 25,57 μ M.

Por outro lado, e de forma recíproca, a aparição de danos no DNA também pode agir como um fator determinante para a indução do processo apoptótico (Sellins e Cohen, 1987). Essa explicação parece mais plausível para a ocelatina-F1, que mesmo não tendo mostrado sinais de indução de necrose, foi capaz de induzir a fragmentação de DNA em boa parte das células. Interessantemente, a proporção de células com DNA fragmentado (~35 %, Figura 26, A) foi similar à proporção de células “marcadas para apoptose” (~36 %, Figura 24, C) após o tratamento com ocelatina-F1.

Finalmente, as marcações realizadas com iodeto de propídeo em células lisadas permitiram analisar mudanças nas diferentes fases do ciclo celular. Nenhuma

alteração foi detectada nas células incubadas com ocelatina-F1, nem em células incubadas paralelamente com H₂O₂ (Figura 26). Em contraste, as células incubadas com o peptídeo HCC77(K) mostraram um aumento significativo na proporção de células na fase diploide G₀/G₁ e uma redução significativa no número de células na fase tetraploide G₂/M (Figura 21). Estudos tem reportado que algumas drogas como os antifúngicos imidazólicos ketoconazol e miconazol são capazes de induzir apoptose ou parada na fase G₀ em células de câncer hepático e colorretal, por mecanismos que envolvem a via de sinalização p53 e a eventual regulação na expressão de ciclinas e de cinasas dependentes de ciclinas (CDKs) (Ho *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2002). A progressão do ciclo celular é controlada por vários complexos Ciclina-CDK (Besson, Dowdy e Roberts, 2008), desta forma, uma possível interferência do peptídeo HCC77(K) na regulação destes complexos poderia estar comprometendo o funcionamento regular do ciclo acelerando a passagem das células pela divisão celular e provocando a sua entrada em estado de quiescência.

Ensaio realizados em células MCF-7 modificadas geneticamente demonstram que a caspase-3 é necessária para a fragmentação de DNA e algumas mudanças morfológicas típicas das células apoptóticas como o encolhimento e a formação de vesículas na superfície da membrana (Jänicke *et al.*, 1998). Infelizmente, testes de detecção de atividade de caspases realizados com os peptídeos ocelatina-F1 e HCC77(K) não foram conclusivos (dados não mostrados), mas as características observadas nas células B16-F10 tratadas com essas moléculas sugerem que a apoptose tem um papel chave no mecanismo de ação desses dois peptídeos e que esse processo contaria com a participação destas enzimas.

Ao mesmo tempo, os resultados do estudo sugerem que não seria apenas um, e sim vários mecanismos que contribuem com o efeito citotóxico desses peptídeos. Ignora-se se fenômenos como a morte celular, a apoptose, a senescência, a necrose, a autofagia ou a catástrofe mitótica são programas independentes ou relacionados em algum grau, e se estes acontecem de forma sucessiva ou simultânea (Okada e Mak, 2004).

Além dos peptídeos amplamente caracterizados neste trabalho, outros com propriedades anticâncer têm sido descritos a partir das secreções de anfíbios de diversas famílias. Esses peptídeos incluem os antitumorais e angiostáticos dermaseptinas B2 e B3, isolados das rãs-macaco *Phyllomedusa bicolor* (Phyllomedusidae) (van Zoggel *et al.*, 2012); a temporina-1CEa de *Rana*

chensinensis (Ranidae) (Wang *et al.*, 2012), de amplo espectro; e a potente, mas pouco seletiva himenoquirina-1Pa de *Pseudhymenochirus merlini* (Pipidae) (Serra *et al.*, 2014).

Os peptídeos isolados da secreção cutânea de *Hypsiboas crepitans* descritos neste trabalho representam um aporte inédito para o conhecimento desta espécie e mais duas contribuições para o crescente número de peptídeos antimicrobianos que vêm sendo descritos para o gênero. Poucos trabalhos até hoje abordaram o estudo da secreção desta espécie de um ponto de vista biotecnológico (Riveros Triana, 2006; Lamadrid-Feris *et al.*, 2015). Adicionalmente, o estudo da atividade biológica dos peptídeos G16OCP1 e ocelatina-F1 vem contribuir para o melhor conhecimento do potencial biotecnológico dos peptídeos da família das ocelatinas. Vários peptídeos desta família vêm sendo objeto de diversos estudos de caracterização química e biológica (Prías-Márquez, 2012; Alves, 2012; Libério *et al.*, 2011) e também têm servido como modelos para o desenho racional de novos peptídeos com características aprimoradas (Guimarães, 2015).

Apesar de que a atividade antitumoral *in vitro* dos peptídeos avaliados neste trabalho não foi seletiva em relação à célula normal usada como referente, eles constituem um bom modelo para o aprimoramento da sua estrutura, como foi demonstrado pela avaliação da atividade dos dois peptídeos desenhados HCC77(K)1 e HCC77(K)2 que, embora continuassem sendo pouco seletivos, mostraram melhoras na atividade antitumoral, com relação ao peptídeo de origem HCC77(K). Se bem que estes peptídeos e seus derivados resultam interessantes para o desenho de drogas anticâncer, é importante que sejam consideradas as limitações dos testes realizados em condições *in vitro* e em períodos curtos, tendo em conta que os efeitos biológicos *in vivo* de um agente anticâncer não necessariamente são comparáveis aos observados *in vitro*, porquanto esse tipo de testes não conseguem imitar de maneira satisfatória a complexidade do efeito no paciente (Reimann e Schimtt, 2007).

Finalmente, outros estudos discutindo o mecanismo de ação destes peptídeos, acompanhados do desenvolvimento de estratégias para incrementar a potência, seletividade e resistência a componentes do plasma sanguíneo podem significar importantes avanços para seu uso como modelos terapêuticos (Shadidi e Sioud, 2003).

7. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu, pela primeira vez, a avaliação da atividade antitumoral da secreção cutânea bruta de *Hypsiboas crepitans*, uma espécie de hílideo sul-americano de ampla abundância e distribuição, utilizando amostras de indivíduos coletados em território brasileiro. Ao mesmo tempo foi possível a purificação e caracterização química e biológica de compostos peptídicos presentes na secreção cutânea de indivíduos coletados em território colombiano.

O emprego do RP-HPLC levou ao fracionamento da secreção bruta, o que evidenciou uma grande riqueza de compostos e permitiu a posterior identificação por MALDI-TOF MS das massas moleculares monoisotópicas de vários peptídeos providos de atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e leveduras de interesse clínico.

Ao mesmo tempo essa técnica permitiu o isolamento e purificação de dois peptídeos (HCC76 e HCC77) que tiveram suas estruturas primárias determinadas, sendo incluídos como novos membros da família das hilinas. HCC76 e HCC77 são dois polipeptídeos compostos cada um por 18 resíduos, hidrofóbicos, fracamente catiônicos e com propensão para formar α -hélices anfipáticas.

A versão sintética do peptídeo HCC76 apresentou uma atividade antimicrobiana fraca, tendo-se mostrado pouco ativo em bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e leveduras. Além disso, careceu de efeito hemolítico inclusive em concentrações moderadas.

A versão sintética do peptídeo HCC77 (HCC77(K)), que tivera a sequência determinada de forma inacabada, foi completada de acordo com informações estatísticas para seu uso em testes de atividade biológica, mostrando-se ativo unicamente em bactérias Gram-positivas e fracamente em leveduras. Este peptídeo foi moderadamente hemolítico, com concentrações de HC_{50} poucas vezes acima das concentrações determinadas como efetivas em bactérias.

A secreção cutânea bruta de *H. crepitans* mostrou uma atividade inibitória bastante fraca em células cancerígenas e normais aderentes, sendo pouco seletiva para células de câncer.

O peptídeo sintético HCC76 apresentou uma atividade antitumoral fraca contra a linhagem celular MCF-7 (câncer de mama humano) em altas concentrações e foi completamente inativo em células da linhagem B16-F10 (melanoma murino).

O peptídeo sintético HCC77(K) apresentou uma atividade moderada em linhagens celulares de câncer de mama humano (MCF-7), melanoma murino (B16-F10) e fibroblasto murino (NIH-3T3), com baixa seletividade por células de câncer.

Os peptídeos sintéticos HCC77(K)1 e HCC77(K)2 foram ativos em células de melanoma murino (B16-F10) e fibroblasto murino (NIH-3T3), mostrando melhoras na atividade com relação ao peptídeo de origem HCC77(K).

O peptídeo sintético G16OCP1, presente em secreções de *Leptodactylus labyrinthicus*, mostrou uma atividade bastante fraca em células de melanoma murino (B16-F10), sendo ligeiramente mais tóxico em fibroblastos murinos (NIH-3T3).

O peptídeo sintético ocelatina-F1, presente em secreções de *Leptodactylus spp.* apresentou uma atividade moderada nas linhagens de células cancerosas B16-F10 e MCF-7, assim como em células normais NIH-3T3 em concentrações ligeiramente menores.

O peptídeo sintético HCC77(K) foi capaz de induzir a morte celular através de um processo que incluiu alterações nas fases G_0/G_1 e G_2/M do ciclo celular, perceptíveis a partir de $18,34 \mu\text{M}$ (IC_{50}). Além disso, em concentrações maiores ($25,57 \mu\text{M} = IC_{75}$) este peptídeo provocou encolhimento e desprendimento das células, perfuração da membrana celular, aumento na quantidade de células apoptóticas e necróticas, despolarização da membrana mitocondrial e aumento na fragmentação de DNA.

O peptídeo sintético ocelatina-F1 foi capaz de induzir a morte celular através de um processo que incluiu aumento na quantidade de células apoptóticas, hiperpolarização e, em menor medida, despolarização da membrana mitocondrial e aumento na fragmentação de DNA.

REFERÊNCIAS

ALBIOL MATANIC, V. C.; CASTILLA, V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 23, n. 4, p. 382-389, 2004.

ALI, M. F. *et al.* Antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the diploid frog, *Xenopus tropicalis* (Pipidae). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology** v. 1550, n. 1, p. 81-89, 2001.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research** v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ALVES, E. S. F. **Estudo estrutural por ¹H-RMN de peptídeos bioativos isolados da secreção cutânea de *Hypsiboas Albopunctatus* e *Leptodactylus labyrinthicus***. 2012. 73 p. Dissertação (MSc). Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

AMICHE, M. *et al.* Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family. **European Journal of Biochemistry** v. 267, n. 14, p. 4583-4592, 2000.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals** v. 6, n. 12, p. 1543, 2013.

BARNA, B. P. *et al.* Activation of alveolar macrophage TNF and MCP-1 expression in vivo by a synthetic peptide of C-reactive protein. **Journal of Leukocyte Biology** v. 59, n. 3, p. 397-402, 1996.

BASIR, Y. J. *et al.* Multiple antimicrobial peptides and peptides related to bradykinin and neuromedin N isolated from skin secretions of the pickerel frog, *Rana palustris*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology** v. 1543, n. 1, p. 95-105, 2000.

BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. Membrane Biophysics of Antimicrobial Peptides** v. 1758, n. 9, p. 1529-1539, 2006.

BELAID, A. *et al.* In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. **J Med Virol.** v. 66, n. 2, p. 229-234, 2002.

BELL, H. S. *et al.* A p53-derived apoptotic peptide derepresses p73 to cause tumor regression in vivo. **The Journal of Clinical Investigation** v. 117, n. 4, p. 1008-1018, 2007.

BESSON, A.; DOWDY, S. F.; ROBERTS, J. M. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. **Developmental Cell** v. 14, n. 2, p. 159-169, 2008.

BHUTIA, S. K.; MAITI, T. K. Targeting tumors with peptides from natural sources. **Trends in Biotechnology** v. 26, n. 4, p. 210-217, 2008.

BHUTIA, S. K. *et al.* Induction of mitochondria-dependent apoptosis by Abrus agglutinin derived peptides in human cervical cancer cell. **Toxicol.In Vitro** v. 22, n. 2, p. 344-351, 2008.

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

BLONDELLE, S. E.; LOHNER, K.; AGUILAR, M. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. **Biochim.Biophys.Acta** v. 1462, n. 1-2, p. 89-108, 1999.

BOLETI, A. P. *et al.* Pouterin, a novel potential cytotoxic lectin-like protein with apoptosis-inducing activity in tumorigenic mammalian cells. **Toxicon** v. 51, n. 8, p. 1321-1330, 2008.

BOND, P. J.; KHALID, S. Antimicrobial and cell-penetrating peptides: Structure, assembly and mechanisms of membrane lysis via atomistic and coarse-grained molecular dynamic simulations. **Protein and Peptide Letters** v. 17, n. 11, p. 1313-1327, 2010.

BRADFORD, A. M. *et al.* Novel Uperin Peptides From the Dorsal Glands of the Australian Floodplain Toadlet *Uperoleia inundata*. **Australian Journal of Chemistry** v. 49, n. 4, p. 475-484, 1996.

BRINKWORTH, C. S. *et al.* The rothein peptides from the skin secretion of Roth's tree frog *Litoria rothii*. Sequence determination using positive and negative ion electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** v. 19, n. 18, p. 2716-2724, 2005.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat Rev Micro** v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.

BROGDEN, K. A.; ACKERMANN, M.; HUTTNER, K. M. Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 41, n. 7, p. 1615-1617, 1997.

BURDICK, M. D. *et al.* Oligosaccharides Expressed on MUC1 Produced by Pancreatic and Colon Tumor Cell Lines. **Journal of Biological Chemistry** v. 272, n. 39, p. 24198-24202, 1997.

CAO, J. *et al.* Curcumin induces apoptosis through mitochondrial hyperpolarization and mtDNA damage in human hepatoma G2 cells. **Free Radical Biology and Medicine** v. 43, n. 6, p. 968-975, 2007.

CARDOSO, S. *et al.* Transgenic Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Expressing the *attacin* A Gene for Resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plant Molecular Biology Reporter** v. 28, n. 2, p. 185-192, 2010.

CASAPULLO, A. *et al.* Makaluvamine P, a New Cytotoxic Pyrroloiminoquinone from *Zyzzya cf. fuliginosa*. **Journal of Natural Products** v. 64, n. 10, p. 1354-1356, 2001.

CASSIDY, J.; MISSET, J. L. Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. **Semin.Oncol.** v. 29, n. 5 Suppl 15, p. 11-20, 2002.

CASTRO, M. S.; CILLI, E. M.; FONTES, W. Combinatorial synthesis and directed evolution applied to the production of alpha-helix forming antimicrobial peptides analogues. **Curr.Protein Pept.Sci.** v. 7, n. 6, p. 473-478, 2006.

CASTRO, M. S. *et al.* Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides** v. 30, n. 2, p. 291-296, 2009.

CASTRO, M. S. *et al.* Hylins: bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the Brazilian tree-frog *Hyla biobeba*. **Protein and Peptide Letters** v. 12, n. 1, p. 89-93, 2005.

CHAKRABARTI, A. *et al.* MSI-99, a magainin analogue, imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana. **Planta** v. 216, n. 4, p. 587-596, 2003.

CHEN, H. *et al.* Kassorins: novel innate immune system peptides from skin secretions of the African hyperoliid frogs, *Kassina maculata* and *Kassina senegalensis*. **Mol Immunol** v. 48, n. 4, p. 442-451, 2011.

CHEN, Y. *et al.* RGD-Tachyplesin Inhibits Tumor Growth. **Cancer Research** v. 61, n. 6, p. 2434-2438, 2001.

CHERNYSH, S. *et al.* Antiviral and antitumor peptides from insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 99, n. 20, p. 12628-12632, 2002.

CHO, J.; LEE, D. G. The antimicrobial peptide arenicin-1 promotes generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects** v. 1810, n. 12, p. 1246-1251, 2011.

CHRISTIAN, W. Cloning of cDNAs encoding new peptides of the dermaseptin-family. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology** v. 1388, n. 1, p. 279-283, 1998.

CLARK, D. P. *et al.* Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. **Journal of Biological Chemistry** v. 269, n. 14, p. 10849-10855, 1994.

COCA, M. *et al.* Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a cecropin A gene in transgenic rice. **Planta** v. 223, n. 3, p. 392-406, 2006.

COMBET, C. *et al.* NPS@: Network Protein Sequence Analysis. **Trends in Biochemical Sciences** v. 25, n. 3, p. 147-150, 2000.

CONLON, J. M. *et al.* Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. **Methods. Natural Product Research: The Challenges Facing the Modern Researcher** v. 42, n. 4, p. 349-357, 2007.

CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics** v. 1696, n. 1, p. 1-14, 2004.

CONLON, J. M. *et al.* The ascaphins: a family of antimicrobial peptides from the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 320, n. 1, p. 170-175, 2004.

COOTE, P. J. *et al.* Inhibitory Action of a Truncated Derivative of the Amphibian Skin Peptide Dermaseptin s3 on *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 42, n. 9, p. 2160-2170, 1998.

CRUCIANI, R. A. *et al.* Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 88, n. 9, p. 3792-3796, 1991.

CSORDÁS, A.; MICHL, H. Isolierung und Strukturaufklärung eines hämolytisch wirkenden Polypeptides aus dem Abwehrsekret europäischer Unken. **Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly** v. 101, n. 1, p. 182-189, 1970.

DAGAN, A. *et al.* In Vitro Antiplasmodium Effects of Dermaseptin S4 Derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 46, n. 4, p. 1059-1066, 2002.

DANCIU, C. *et al.* A characterization of four B16 murine melanoma cell sublines molecular fingerprint and proliferation behavior. **Cancer Cell International** v. 13, n. 1, p. 1-12, 2013.

DATHE, M. *et al.* Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. **FEBS Lett** v. 403, n. 2, p. 208-212, 1997.

DE AZEVEDO, R. A. *et al.* Mastoparan induces apoptosis in B16F10-Nex2 melanoma cells via the intrinsic mitochondrial pathway and displays antitumor activity in vivo. **Peptides** v. 68, n. 0, p. 113-119, 2015.

DENNISON, S. R. **Investigation into the structure function relationship of the membrane interaction of amphiphilic alpha helical antimicrobial peptides.** 2004. p. Thesis (PhD). University of Central Lancashire, Preston, Lancashire, UK.

DENNISON, S. R. *et al.* Amphiphilic α -helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. **Protein Peptide Lett.** v. 12, n. 1, p. 31-39, 2005.

DENNISON, S. R. *et al.* Anticancer α -Helical Peptides and Structure / Function Relationships Underpinning Their Interactions with Tumour Cell Membranes. **Current Protein and Peptide Science** v. 7, p. 487-499, 2006.

DEVINE, D. A. Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. **Mol Immunol** v. 40, n. 7, p. 431-443, 2003.

DOBRZYŃSKA, I. *et al.* Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry** v. 276, n. 1, p. 113-119, 2005.

DUNNILL, P. The Use of Helical Net-Diagrams to Represent Protein Structures. **Biophysical Journal** v. 8, n. 7, p. 865-875, 1968.

DÜRR, U. H. N.; SUDHEENDRA, U. S.; RAMAMOORTHY, A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. Membrane Biophysics of Antimicrobial Peptides** v. 1758, n. 9, p. 1408-1425, 2006.

E CARVALHO, A. C. *et al.* Cytotoxic Activity and Antiproliferative Effects of Crude Skin Secretion from *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) on in vitro Melanoma Cells. **Toxins** v. 7, n. 10, p. 3989, 2015.

EDMAN, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. **Acta chem. scand** v. 4, n. 7, p. 283-293, 1950.

EFRON, L. *et al.* Direct Interaction of Dermaseptin S4 Aminoheptanoyl Derivative with Intraerythrocytic Malaria Parasite Leading to Increased Specific Antiparasitic Activity in Culture. **Journal of Biological Chemistry** v. 277, n. 27, p. 24067-24072, 2002.

EISENBERG, D.; WEISS, R. M.; TERWILLIGER, T. C. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. **Nature** v. 299, n. 5881, p. 371-374, 1982.

EL AMRI, C. *et al.* The Plasticins: Membrane Adsorption, Lipid Disorders, and Biological Activity. **Biochemistry** v. 45, n. 48, p. 14285-14297, 2006.

ELLERBY, H. M. *et al.* Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. **Nat.Med.** v. 5, n. 9, p. 1032-1038, 1999.

ESPINOSA, E. *et al.* Classification of anticancer drugs—a new system based on therapeutic targets. **Cancer Treatment Reviews** v. 29, n. 6, p. 515-523, 2003.

FAUCHÈRE, J. L.; PLIŠKA, V. Hydrophobic parameters II of amino-acid side chains from the partitioning of N-acetyl-amino-acid amides. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 18, n. 4, p. 369-375, 1983.

FERLAY, J. *et al.* **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11.** Lyon, France.: International Agency for Research on Cancer 2013.

FERREIRA, P. M. P. *et al.* Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon. **Toxicon** v. 72, n. 0, p. 43-51, 2013.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**: Humana Press, 2005. p.571-607. ISBN 978-1-58829-343-5.

GAUTIER, R. *et al.* HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. **Bioinformatics** v. 24, n. 18, p. 2101-2102, 2008.

GAZIT, E. *et al.* Interaction of the Mammalian Antibacterial Peptide Cecropin P1 with Phospholipid Vesicles. **Biochemistry** v. 34, n. 36, p. 11479-11488, 1995.

GEOURJON, C.; DELÉAGE, G. SOPMA: Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. **Bioinformatics** v. 11, n. 6, p. 681-684, 1995.

GIACOMETTI, A. *et al.* Activity of buforin II alone and in combination with azithromycin and minocycline against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 47, n. 1, p. 97-99, 2001.

GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic α -helical antimicrobial peptides. A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. **European Journal of Biochemistry** v. 268, n. 21, p. 5589-5600, 2001.

GIOVANNINI, C. *et al.* Mitochondria hyperpolarization is an early event in oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in Caco-2 intestinal cells. **FEBS Letters** v. 523, n. 1-3, p. 200-206, 2002.

GIRI, B. *et al.* Antiproliferative, cytotoxic and apoptogenic activity of Indian toad (*Bufo melanostictus*, Schneider) skin extract on U937 and K562 cells. **Toxicon** v. 48, n. 4, p. 388-400, 2006.

GORAYA, J.; KNOOP, F. C.; CONLON, J. M. Ranatuerins: Antimicrobial Peptides Isolated from the Skin of the American Bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 250, n. 3, p. 589-592, 1998.

GUIMARÃES, A. B. **Síntese química e avaliação das propriedades antibacterianas e antiparasitárias de análogos de peptídeos antimicrobianos de anuros**. 2015. 143 p. Tese (DSc). Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

GUIMARÃES, A. B. *et al.* The Amazing World of Peptide Engineering: the Example of Antimicrobial Peptides from Frogs and Their Analogues. **Protein & Peptide Letters** v. 23, n. 8, p. 722-737, 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell** v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

_____. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell** v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANCOCK, R. E. Peptide antibiotics. **Lancet** v. 349, n. 9049, p. 418-422, 1997.

_____. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **Lancet Infect.Dis.** v. 1, n. 3, p. 156-164, 2001.

HANCOCK, R. E.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. **Antimicrob.Agents Chemother.** v. 43, n. 6, p. 1317-1323, 1999.

HANCOCK, R. E.; ROZEK, A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. **FEMS Microbiol.Lett.** v. 206, n. 2, p. 143-149, 2002.

HARRIS, F.; DENNISON, S. R.; PHOENIX, D. A. Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. **Current Protein and Peptide Science** v. 10, n. 6, p. 585-606, 2009.

HEHIR, K. M. *et al.* A potential antitumor peptide therapeutic derived from antineoplastic urinary protein. **Peptides** v. 25, n. 4, p. 543-549, 2004.

HILEMAN, E. O. *et al.* Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** v. 53, n. 3, p. 209-219, 2004.

HO, Y.-S. *et al.* Ketoconazole-Induced Apoptosis through P53-Dependent Pathway in Human Colorectal and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. **Toxicology and Applied Pharmacology** v. 153, n. 1, p. 39-47, 1998.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes** v. 1778, n. 2, p. 357-375, 2008.

HUANG, C. M.; CHEN, H. C.; ZIERDT, C. H. Magainin analogs effective against pathogenic protozoa. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 34, n. 9, p. 1824-1826, 1990.

HUNTER, M. J. A Method for the Determination of Protein Partial Specific Volumes. **The Journal of Physical Chemistry** v. 70, n. 10, p. 3285-3292, 1966.

HWANG, B. *et al.* The antimicrobial peptide, psacothecin induces reactive oxygen species and triggers apoptosis in *Candida albicans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 405, n. 2, p. 267-271, 2011.

ISAACSON, T. *et al.* Antimicrobial peptides with atypical structural features from the skin of the Japanese brown frog *Rana japonica*. **Peptides** v. 23, n. 3, p. 419-425, 2002.

JACKWAY, R. J. *et al.* Disulfide-containing peptides from the glandular skin secretions of froglets of the genus *Crinia*: Structure, activity and evolutionary trends. **Regulatory Peptides** v. 151, n. 1-3, p. 80-87, 2008.

JALOTA-BADHWAR, A. *et al.* SMAR1-derived P44 Peptide Retains Its Tumor Suppressor Function through Modulation of p53. **Journal of Biological Chemistry** v. 282, n. 13, p. 9902-9913, 2007.

JANG, W. S. *et al.* Antifungal activity of synthetic peptide derived from halocidin, antimicrobial peptide from the tunicate, *Halocynthia aurantium*. **FEBS Letters** v. 580, n. 5, p. 1490-1496, 2006.

JÄNICKE, R. U. *et al.* Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis. **Journal of Biological Chemistry** v. 273, n. 16, p. 9357-9360, 1998.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews** v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

JIA, Z. *et al.* Enhanced resistance to fungal pathogens in transgenic *Populus tomentosa* Carr. by overexpression of an nsLTP-like antimicrobial protein gene from motherwort (*Leonurus japonicus*). **Tree Physiology** v. 30, n. 12, p. 1599-1605, 2010.

KALYANARAMAN, B. *et al.* Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. **Mol.Cell.Biochem.** v. 234-235, n. 1-2, p. 119-124, 2002.

KAVANAGH, K.; DOWD, S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 56, p. 285-289, 2004.

KAWASAKI, H. *et al.* A protein with antimicrobial activity in the skin of Schlegel's green tree frog *Rhacophorus schlegelii* (Rhacophoridae) identified as histone H2B. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 312, n. 4, p. 1082-1086, 2003.

KIM, S. *et al.* In vitro activities of native and designed peptide antibiotics against drug sensitive and resistant tumor cell lines. **Peptides** v. 24, n. 7, p. 945-953, 2003.

KING, J. D. *et al.* Pentadactylin: An antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** v. 141, n. 4, p. 393-397, 2005.

KLUGE, A. G. The gladiator frogs of Middle America and Colombia - A reevaluation of their systematics (Anura: Hylidae). **Occasional papers of the Museum of Zoology, University of Michigan**, n. 668, 1979.

KOO, J. C. *et al.* Pn-AMP1, a Plant Defense Protein, Induces Actin Depolarization in Yeasts. **Plant and Cell Physiology** v. 45, n. 11, p. 1669-1680, 2004.

KÜCKELHAUS, S. A. S. *et al.* Antiplasmodial and antileishmanial activities of phylloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa azurea* (Amphibia). **Experimental Parasitology** v. 123, n. 1, p. 11-16, 2009.

KUPKE, D. W.; DORRIER, T. E. Protein concentration measurements: The dry weight. In: **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 48, 1978. p.155-162. ISBN 0076-6879.

LA MARCA, E. *et al.* **IUCN 2010: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4.**, 2011. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 2/3/2011.

LAI, R. *et al.* An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 295, n. 4, p. 796-799, 2002a.

LAI, R. *et al.* Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*. **Peptides** v. 23, n. 3, p. 427-435, 2002b.

LAMADRID-FERIS, F. *et al.* Identification of compounds from White Frog (Anura: Hylidae) cutaneous secretions with potential to be used in biotechnological processes. **PharmacologyOnline** v. 2, p. 118-123, 2015.

LEE, D. G. *et al.* Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 305, n. 2, p. 305-310, 2003.

LEITE, J. R. *et al.* Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides** v. 26, n. 4, p. 565-573, 2005.

LEUSCHNER, C.; HANSEL, W. Membrane Disrupting Lytic Peptides for Cancer Treatments. **Current Pharmaceutical Design** v. 10, n. 19, p. 2299-2310, 2004.

LI, J. *et al.* Anti-infection Peptidomics of Amphibian Skin. **Molecular Cellular Proteomics** v. 6, n. 5, p. 882-894, 2007.

LI, X. *et al.* Kasstasin: A novel potent vasoconstrictor peptide from the skin secretion of the African red-legged running frog, *Kassina maculata*. **Biochimie** v. 93, n. 9, p. 1537-1542, 2011.

LIBÉRIO, M. S. **Caracterização química e biológica da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*: peptídeos antimicrobianos e anticarcinogênicos, fosfolipases e peptidases**. 2008. 128 p. Dissertação (MSc). Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

LIBÉRIO, M. S. *et al.* Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. **Amino Acids** v. 40, n. 1, p. 51-59, 2011.

LIVANT, D. L. *et al.* Anti-invasive, Antitumorigenic, and Antimetastatic Activities of the PHSCN Sequence in Prostate Carcinoma. **Cancer Research** v. 60, n. 2, p. 309-320, 2000.

LONGOBARDI GIVAN, A. **Flow Cytometry: First Principles**. 2. New York: Wiley-Liss, Inc., 2001. ISBN 0-471-38224-8.

LÓPEZ-GARCÍA, B. *et al.* Stabilisation of mixed peptide/lipid complexes in selective antifungal hexapeptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes** v. 1660, n. 1-2, p. 131-137, 2004.

LORIN, C. *et al.* The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. **Virology** v. 334, n. 2, p. 264-275, 2005.

LUDOVICO, P.; SANSONETTY, F.; CORTE-REAL, M. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. **Microbiology** v. 147, n. 12, p. 3335-3343, 2001.

MADER, J. S.; HOSKIN, D. W. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. **Expert Opinion on Investigational Drugs** v. 15, n. 8, p. 933-946, 2006.

MAGALHÃES, B. S. *et al.* Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 377, n. 4, p. 1057-1061, 2008.

MANGONI, M. L. *et al.* Ranacyclins, a New Family of Short Cyclic Antimicrobial Peptides: Biological Function, Mode of Action, and Parameters Involved in Target Specificity. **Biochemistry** v. 42, n. 47, p. 14023-14035, 2003.

MÁRQUEZ, M. *et al.* Immunological Clearance of *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection at a Pathogen-optimal Temperature in the Hylid Frog *Hypsiboas crepitans*. **EcoHealth** v. 7, n. 3, p. 380-388, 2010.

MARTINS, L. B.; SILVA, W. R.; GIARETTA, A. A. Distribution and calls of two South American frogs (Anura). **Salamandra** v. 45, n. 2, 2009.

MCGWIRE, B. S.; KULKARNI, M. M. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. **Experimental Parasitology. Immunology and Cell Biology of Protozoan Parasites** v. 126, n. 3, p. 397-405, 2010.

MELEGARI, S. P. *et al.* Evaluation of Cytotoxicity and Cell Death Induced In Vitro by Saxitoxin in Mammalian Cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A** v. 78, n. 19, p. 1189-1200, 2015.

MENON, J. *et al.* Angiotensin-(1-7) Inhibits Growth of Human Lung Adenocarcinoma Xenografts in Nude Mice through a Reduction in Cyclooxygenase-2. **Cancer Research** v. 67, n. 6, p. 2809-2815, 2007.

MIELE, R. *et al.* Molecular cloning of a bombinin gene from *Bombina orientalis*: detection of NF- κ B and NF-IL6 binding sites in its promoter. **FEBS Letters** v. 431, n. 1, p. 23-28, 1998.

MITEVA, M. *et al.* Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. **FEBS Letters** v. 462, n. 1-2, p. 155-158, 1999.

MIZEJEWSKI, G. J.; MUEHLEMANN, M.; DAUPHINEE, M. Update of Alpha Fetoprotein Growth-Inhibitory Peptides as Biotherapeutic Agents for Tumor Growth and Metastasis. **Chemotherapy** v. 52, n. 2, p. 83-90, 2006.

MOR, A. *et al.* Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. **Biochemistry** v. 30, n. 36, p. 8824-8830, 1991.

MORIKAWA, N.; HAGIWARA, K. i.; NAKAJIMA, T. Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipoda porsa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 189, n. 1, p. 184-190, 1992.

NASCIMENTO, A. C. *et al.* Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. **Protein Peptide Lett.** v. 10, n. 3, p. 227-238, 2003.

NASCIMENTO, A. C. *et al.* Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). **Protein Journal** v. 23, n. 8, p. 501-508, 2004.

NIELSEN, S. L. *et al.* Structure-activity study of the antibacterial peptide fallaxin. **Protein Science** v. 16, n. 9, p. 1969-1976, 2007.

OGUIURA, N. *et al.* In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. **J Antibiot** v. 64, n. 4, p. 327-331, 2011.

OHIRA, T. *et al.* In vitro and in vivo growth of B16F10 melanoma cells transfected with interleukin-4 cDNA and gene therapy with the transfectant. **J Cancer Res Clin Oncol** v. 120, n. 11, p. 631-635, 1994.

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

OLSON, L. *et al.* Pseudin-2: An Antimicrobial Peptide with Low Hemolytic Activity from the Skin of the Paradoxical Frog. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 288, n. 4, p. 1001-1005, 2001.

OTT, M. *et al.* Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 99, n. 3, p. 1259-1263, 2002.

PACE, C. N. *et al.* How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science** v. 4, n. 11, p. 2411-2423, 1995.

PAPO, N.; SHAI, Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. **Cellular and Molecular Life Sciences** v. 62, n. 7, p. 784-790, 2005.

PARK, S. *et al.* Structural study of novel antimicrobial peptides, nigrocins, isolated from *Rana nigromaculata*. **FEBS Letters** v. 507, n. 1, p. 95-100, 2001.

PARK, Y.; LEE, D. G.; HAHM, K. S. HP(2-9)-magainin 2(1-12), a synthetic hybrid peptide, exerts its antifungal effect on *Candida albicans* by damaging the plasma membrane. **Journal of Peptide Science** v. 10, n. 4, p. 204-209, 2004.

PASQUALINI, R. *et al.* Aminopeptidase N is a Receptor for Tumor-homing Peptides and a Target for Inhibiting Angiogenesis. **Cancer Research** v. 60, n. 3, p. 722-727, 2000.

PIERRE, T. N. *et al.* Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/opioid peptide precursors. **European Journal of Biochemistry** v. 267, n. 2, p. 370-378, 2000.

POKORNY, A.; ALMEIDA, P. F. F. Kinetics of Dye Efflux and Lipid Flip-Flop Induced by δ -Lysin in Phosphatidylcholine Vesicles and the Mechanism of Graded Release by Amphipathic, α -Helical Peptides. **Biochemistry** v. 43, n. 27, p. 8846-8857, 2004.

PORAT, Y. *et al.* Acyl-substituted dermaseptin S4 derivatives with improved bactericidal properties, including on oral microflora. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 50, n. 12, p. 4153-4160, 2006.

POUNY, Y. *et al.* Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. **Biochemistry** v. 31, n. 49, p. 12416-12423, 1992.

PRATES, M. V. *et al.* The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*. **Journal of Biological Chemistry** v. 279, n. 13, p. 13018-13026, 2004.

PRÍAS-MÁRQUEZ, C. A. **Evaluación de la actividad anticarcinogénica de la ocelatina-F1 (falaxina), un péptido citolítico aislado de la secreción cutánea de ranas del género *Leptodactylus***. 2010. 77 p. TCC (Biólogo). Programa de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Colômbia.

_____. **Purificação e caracterização de um análogo da ocelatina-P1 isolado da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus***. 2012. 73 p. Dissertação (MSc). Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

PUKALA, T. L. *et al.* Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. **Nat Prod Rep** v. 23, n. 3, p. 368-393, 2006.

QI, F. *et al.* Cinobufacini, an aqueous extract from *Bufo bufo gargarizans* Cantor, induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway in human hepatocellular carcinoma cells. **Journal of Ethnopharmacology** v. 128, n. 3, p. 654-661, 2010.

REIMANN, M.; SCHIMTT, C. A. Apoptosis and Cancer Therapy. In: SRIVASTAVA, R. (Ed.). **Apoptosis, Cell Signaling and Human Diseases: Molecular Mechanisms**. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., v.1, 2007. cap. 13, p.303-319. ISBN 978-1-58829-677-1.

RIVEROS TRIANA, G. I. **Efectos antimicrobianos de sustancias secretadas por la piel de ranas en cultivos de micro-órganos**. 2006. 87 p. Dissertação (MSc). Programa de Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Bogotá.

ROLLINS-SMITH, L. A.; CONLON, J. M. Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. **Dev.Comp Immunol** v. 29, n. 7, p. 589-598, 2005.

ROLLINS-SMITH, L. A. *et al.* An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura:Leptodactylidae). **Regulatory Peptides** v. 124, n. 1-3, p. 173-178, 2005.

ROUILLE, Y. *et al.* Hydrins, hydroosmotic neurohypophysial peptides: osmoregulatory adaptation in amphibians through vasotocin precursor processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 86, n. 14, p. 5272-5275, 1989.

ROZEK, T. *et al.* The maculatin peptides from the skin glands of the tree frog *Litoria genimaculata*: a comparison of the structures and antibacterial activities of maculatin 1.1 and caerin 1.1. **J Pept Sci** v. 4, n. 2, p. 111-115, 1998.

ROZEK, T. *et al.* The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. **European Journal of Biochemistry** v. 267, n. 17, p. 5330-5341, 2000.

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science** v. 238, n. 4826, p. 491-497, 1987.

SAI, K. P. *et al.* Tigerinins: Novel Antimicrobial Peptides from the Indian Frog *Rana tigrina*. **Journal of Biological Chemistry** v. 276, n. 4, p. 2701-2707, 2001.

SÁNCHEZ-ALCÁZAR, J. A. *et al.* Increased mitochondrial cytochrome c levels and mitochondrial hyperpolarization precede camptothecin-induced apoptosis in Jurkat cells. **Cell Death Differ** v. 7, n. 11, p. 1090-1100, 2000.

SATO, S. *et al.* High-affinity urokinase-derived cyclic peptides inhibiting urokinase/urokinase receptor-interaction: effects on tumor growth and spread. **FEBS Letters** v. 528, n. 1-3, p. 212-216, 2002.

SCHIFFER, M.; EDMUNDSON, A. B. Use of Helical Wheels to Represent the Structures of Proteins and to Identify Segments with Helical Potential. **Biophysical Journal** v. 7, n. 2, p. 121-135, 1967.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. *et al.* Antiproliferative activity and new argininyl bufadienolide esters from the "cururú" toad *Rhinella (Bufo) schneideri*. **Journal of Ethnopharmacology** v. 155, n. 2, p. 1076-1085, 2014.

SCIANI, J. M. *et al.* Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition** v. 3, n. 1, p. 10-18, 2013.

SELLINS, K. S.; COHEN, J. J. Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. **The Journal of Immunology** v. 139, n. 10, p. 3199-3206, 1987.

SENGUPTA, D. *et al.* Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes** v. 1778, n. 10, p. 2308-2317, 2008.

SERRA, I. *et al.* Conformational analysis and cytotoxic activities of the frog skin host-defense peptide, hymenochirin-1Pa. **Peptides** v. 61, n. 0, p. 114-121, 2014.

SHADIDI, M.; SIOUD, M. Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides. **Drug Resistance Updates** v. 6, n. 6, p. 363-371, 2003.

SHALEV, D. E.; MOR, A.; KUSTANOVICH, I. Structural Consequences of Carboxyamidation of Dermaseptin S3. **Biochemistry** v. 41, n. 23, p. 7312-7317, 2002.

SHALEV, D. E. *et al.* Consequences of N-acylation on structure and membrane binding properties of dermaseptin derivative K4-S4-(1-13). **J Biol Chem.** v. 281, n. 14, p. 9432-9438, 2006.

SIEVERS, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol Syst Biol** v. 7, 2011.

SILVA, C. A. d. *et al.* Saxitoxins induce cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in teleost neurons in vitro. **Toxicon** v. 86, p. 8-15, 2014.

SIMMACO, M. *et al.* Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta*. **FEBS Letters** v. 324, n. 2, p. 159-161, 1993.

SIMMACO, M. *et al.* Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. **Journal of Biological Chemistry** v. 269, n. 16, p. 11956-11961, 1994.

SIMMACO, M. *et al.* Temporins, Antimicrobial Peptides from the European Red Frog *Rana temporaria*. **European Journal of Biochemistry** v. 242, n. 3, p. 788-792, 1996.

SITARAM, N.; NAGARAJ, R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes** v. 1462, n. 1–2, p. 29-54, 1999.

SKLAR, L. A. **Flow Cytometry for Biotechnology**. Oxford University Press, 2005. ISBN 9780198034780.

SKULACHEV, V. P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. **Apoptosis** v. 11, n. 4, p. 473-485, 2006.

SOK, M.; ŠENTJURC, M.; SCHARA, M. Membrane fluidity characteristics of human lung cancer. **Cancer Letters** v. 139, n. 2, p. 215-220, 1999.

SPELLBERG, B. *et al.* Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future. **Clinical Infectious Diseases** v. 38, n. 9, p. 1279-1286, 2004.

STATON, C. A. *et al.* Alphastatin, a 24-amino acid fragment of human fibrinogen, is a potent new inhibitor of activated endothelial cells in vitro and in vivo. **Blood** v. 103, n. 2, p. 601-606, 2004.

STEWART, J. M. *et al.* Combination cancer chemotherapy with one compound: Pluripotent bradykinin antagonists. **Peptides** v. 26, n. 8, p. 1288-1291, 2005.

STONE, D. J. M. *et al.* Peptides from Australian frogs. Structures of the caerins and caeridin 1 from *Litoria splendida*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1** v. 1992, n. 23, p. 3173-3178, 1992.

STRELKOV, L. A. *et al.* The bone marrow peptide (myelopeptide-2) abolishes induced by human leukemia HL-60 cell suppression of T lymphocytes. **Immunol.Lett.** v. 50, n. 3, p. 143-147, 1996.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Research** v. 43, n. D1, p. D204-D212, 2015.

THOMPSON, A. H. *et al.* Amphibian Skin Secretomics: Application of Parallel Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry and Peptide Precursor cDNA Cloning to Rapidly Characterize the Skin Secretory Peptidome of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*: Discovery of a Novel Peptide Family, the Hyposins. **Journal of Proteome Research** v. 6, n. 9, p. 3604-3613, 2007.

TJIN THAM SJIN, R. M. *et al.* A 27-Amino-Acid Synthetic Peptide Corresponding to the NH₂-Terminal Zinc-Binding Domain of Endostatin Is Responsible for Its Antitumor Activity. **Cancer Research** v. 65, n. 9, p. 3656-3663, 2005.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers** v. 55, n. 1, p. 4-30, 2000.

TYLER, M. J.; STONE, D. J. M.; BOWIE, J. H. A novel method for the release and collection of dermal, glandular secretions from the skin of frogs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods** v. 28, n. 4, p. 199-200, 1992.

UTSUGI, T. *et al.* Elevated Expression of Phosphatidylserine in the Outer Membrane Leaflet of Human Tumor Cells and Recognition by Activated Human Blood Monocytes. **Cancer Research** v. 51, n. 11, p. 3062-3066, 1991.

VAN ZOGGEL, H. *et al.* Antitumor and angiostatic peptides from frog skin secretions. **Amino Acids** v. 42, n. 1, p. 385-395, 2012.

VANCOMPERNOLLE, S. E. *et al.* Antimicrobial peptides from amphibian skin potently inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells. **J Virol.** v. 79, n. 18, p. 11598-11606, 2005.

WABNITZ, P. A. *et al.* Differences in the skin peptides of the male and female Australian tree frog *Litoria splendida*. **European Journal of Biochemistry** v. 267, n. 1, p. 269-275, 2000.

WABNITZ, P. A. *et al.* Peptides from the Skin Glands of the Australian Buzzing Tree Frog *Litoria electrica*. Comparison with the Skin Peptides of the Red Tree Frog *Litoria rubella*. **Australian Journal of Chemistry** v. 52, n. 7, p. 639-646, 1999.

WANG, C. *et al.* Antitumor effects and cell selectivity of temporin-1CEa, an antimicrobial peptide from the skin secretions of the Chinese brown frog (*Rana chensinensis*). **Biochimie** v. 94, n. 2, p. 434-441, 2012.

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

WANG, H. *et al.* Senegalin: a novel antimicrobial/myotropic hexadecapeptide from the skin secretion of the African running frog, *Kassina senegalensis*. **Amino Acids** v. 44, n. 5, p. 1347-1355, 2013.

WANG, W.; RASTINEJAD, F.; EL-DEIRY, W. S. Restoring p53-dependent tumor suppression. **Cancer Biology & Therapy** v. 2, n. 4 Suppl 1, p. S55-S63, 2003.

WANG, Z.; WANG, G. APD: The Antimicrobial Peptide Database. **Nucleic Acids Res.** v. 32, n. Database issue, p. D590-D592, 2004.

WEGENER, K. L. *et al.* Host defence peptides from the skin glands of the Australian blue mountains tree-frog *Litoria citropa*. Solution structure of the antibacterial peptide citropin 1.1. **Eur.J.Biochem.** v. 265, n. 2, p. 627-637, 1999.

WHITE, S. H.; WIMLEY, W. C. Membrane Protein Folding and Stability: Physical Principles. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure** v. 28, n. 1, p. 319-365, 1999.

WLODKOWIC, D. *et al.* Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. In: DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.* (Eds.). **Methods in Cell Biology**: Academic Press, v.103, 2011. cap. 4, p.55-98. ISBN 0091-679X.

WOODHAMS, D. C. *et al.* Population trends associated with skin peptide defenses against chytridiomycosis in Australian frogs. **Oecologia**. v. 146, n. 4, p. 531-540, 2006a.

WOODHAMS, D. C. *et al.* Predicted disease susceptibility in a Panamanian amphibian assemblage based on skin peptide defenses. **J Wildl.Dis.** v. 42, n. 2, p. 207-218, 2006b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Report on Infectious Diseases. Overcoming Antimicrobial Resistance.** 2000. Disponível em: http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/other_versions/index-rpt2000_text.html. Acesso em: 10/21/2009.

_____. **The Global Burden of Disease: 2004 Update.** Switzerland: WHO Press, 2008.

_____. **World Health Statistics 2014.** Italy: WHO Press, 2014.

WU, C.-H. *et al.* Antitumor Effects of Miconazole on Human Colon Carcinoma Xenografts in Nude Mice through Induction of Apoptosis and G0/G1 Cell Cycle Arrest. **Toxicology and Applied Pharmacology** v. 180, n. 1, p. 22-35, 2002.

XING, H. *et al.* Increased pathogen resistance and yield in transgenic plants expressing combinations of the modified antimicrobial peptides based on indolicidin and magainin. **Planta** v. 223, n. 5, p. 1024-1032, 2006.

YASSER, P. *et al.* Systemic administration of a peptide that impairs the protein kinase (CK2) phosphorylation reduces solid tumor growth in mice. **International Journal of Cancer** v. 122, n. 1, p. 57-62, 2008.

YOO, Y.-C. *et al.* Apoptosis in Human Leukemic Cells Induced by Lactoferricin, a Bovine Milk Protein-Derived Peptide: Involvement of Reactive Oxygen Species. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 237, n. 3, p. 624-628, 1997.

YOON, W.-H. *et al.* Effect of O-Glycosylated Mucin on Invasion and Metastasis of HM7 Human Colon Cancer Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 222, n. 3, p. 694-699, 1996.

ZACHOWSKI, A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. **Biochemical Journal** v. 294, n. Pt 1, p. 1-14, 1993.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** v. 84, n. 15, p. 5449-5453, 1987.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature** v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

ZHI, Y. *et al.* Tripeptide tyrosyleutide enhances the antitumor effects of macrophages and stimulates macrophage secretion of IL-1 β , TNF- α , and NO in vitro. **Cancer Immunology, Immunotherapy** v. 55, n. 1, p. 56-60, 2006.