



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Universidade de Brasília**

**INVESTIGAÇÃO DOS COMPONENTES DA PELE DO ANURO
Boana albopunctata (Spix, 1824) EMPREGANDO ABORDAGENS
MOLECULARES E BIOQUÍMICAS**

MARIAH RIBEIRO ROCHA

**BRASÍLIA
2019**



Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Universidade de Brasília

INVESTIGAÇÃO DOS COMPONENTES DA PELE DO ANURO *Boana albopunctata* (Spix, 1824) EMPREGANDO ABORDAGENS MOLECULARES E BIOQUÍMICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestra em Biologia Animal.

Autora: Mariah Ribeiro Rocha
Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

BRASÍLIA
2019



MARIAH RIBEIRO ROCHA

**INVESTIGAÇÃO DOS COMPONENTES DA PELE DO ANURO
Boana albopunctata (Spix, 1824) EMPREGANDO ABORDAGENS
MOLECULARES E BIOQUÍMICAS**

Comissão Examinadora:

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

**Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Membro Titular
Departamento de Biologia Celular/IB
Universidade de Brasília**

**Dr. Rodrigo da Rocha Fragoso
Membro Titular
EMBRAPA CERRADOS**

O tempo não é o que é, mas sim o modo como é sentido.

Z. Smith, Sobre a Beleza.

APOIO FINANCEIRO

A dissertação de mestrado intitulada “Investigação dos componentes da pele do anuro *Boana albopunctata* (Spix, 1824) empregando abordagens moleculares e bioquímicas” desenvolvida por Mariah Ribeiro Rocha sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq (processos no. 311202/2015-2 - Produtividade em Pesquisa e no. 407801-2013 - Rede Centro-Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação - REDE PRÓ-CENTRO-OESTE), da FAPDF (processos no. 193.000.955/2015 e no. 0193.001736/2017), da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) vêm ganhando cada vez mais destaque no cenário científico atual como uma alternativa na luta contra microrganismos patogênicos resistentes a múltiplos antibióticos (ATBs). O presente estudo teve como objetivo geral investigar a secreção cutânea do anuro *Boana albopunctata* empregando uma abordagem combinada de técnicas de biologia molecular e de química de peptídeos. A tradução *in silico* dos cDNAs obtidos indicou 14 precursores diferentes, permitindo a identificação do precursor do PAM Hilina-a1, previamente isolado dessa secreção. Esta técnica foi utilizada em paralelo com técnicas clássicas de bioquímica que permitiram o isolamento e a caracterização de um PAM inédito presente na secreção cutânea de *B. albopunctata*. A secreção cutânea obtida por meio de estimulação elétrica foi fracionada por RP-HPLC. Três frações apresentaram atividade antimicrobiana acentuada sobre a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Estas frações foram analisadas por MALDI-TOF MS. Tal análise permitiu a identificação de dois PAMs já isolados dessa secreção: a Hilina-a1 e a Ceratotoxina-Ha (Ctx-Ha). O terceiro componente identificado é um peptídeo antimicrobiano inédito com massa molecular de 2981,8 Da. Este é constituído por 28 resíduos de aminoácidos (¹FLGAILRIGQALAKTVIPLVTNAIHPKQ²⁸) e se assemelha ao peptídeo antimicrobiano Figainina 2, identificado com o emprego da estratégia de clonagem de cDNAs da pele do anuro *Boana raniceps*. O novo peptídeo isolado foi nomeado como Figainina 2-Ba e apresentou um amplo espectro antimicrobiano, incluindo atividade sobre bactérias de interesse veterinário, a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* e a Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, ambos de isolados clínicos veterinários, com valores de CIM iguais a 8 e 32 µM, respectivamente. Além disso, o PAM Figainina 2-Ba apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* ATCC 14053 e *Cryptococcus neoformans* H99 com valores de CIM iguais a 16 e 8 µM, respectivamente. Estes resultados sugerem o PAM Figainina 2-Ba como um bom candidato para o desenvolvimento de novos medicamentos. No presente estudo, também foram avaliados os efeitos antimicrobianos de cinco análogos do PAM Ceratotoxina-Ha, um PAM também identificado na secreção de *B. albopunctata*. Dentre os análogos do PAM Ctx-Ha, o análogo Ctx Ha-A3 demonstrou boa capacidade antimicrobiana com valores de CIM iguais a 4 µM contra as bactérias multirresistentes de interesse veterinário, indicando ser um promissor agente terapêutico no tratamento dessas afecções. Os resultados deste trabalho enfatizam a importância da combinação de clonagem de cDNAs e estratégias clássicas de purificação de peptídeos, o que permitiu uma melhor compreensão do conjunto de peptídeos presentes na pele do anuro estudado.

Palavras-chave: Anuros, *Boana albopunctata*, Secreção cutânea, cDNA, Peptídeos antimicrobianos, Purificação, Caracterização

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) have been gaining increasing prominence in the current scientific scenario as an alternative in the fight against pathogenic microorganisms resistant to multiple antibiotics (ATBs). The present study aimed to investigate the cutaneous secretion of the anuran *Boana albopunctata* using an approach combining molecular biology and chemistry of peptides techniques. The *in silico* translation of the obtained cDNAs indicated 14 different precursors, allowing the identification of the precursor of the AMP Hylin a1, previously isolated from this secretion. This technique was used in parallel with the classic techniques of biochemistry that allowed the isolation and characterization of a novel AMP present in the cutaneous secretion of *B. albopunctata*. Cutaneous secretion obtained by electrical stimulation was fractionated by RP-HPLC. Three fractions showed marked antimicrobial activity on Gram-positive *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). These fractions were analyzed by MALDI-TOF MS. This analysis allowed the identification of two previously isolated AMPs from this secretion: Hylin-a1 and Ceratotoxin-Ha (Ctx-Ha). The third identified component is a novel antimicrobial peptide with a molecular mass of 2,981.8 Da. This peptide consists of 28 amino acid residues (¹FLGAILRIGQALAKTVIPLVTNAIHPKQ²⁸) and resembles the antimicrobial peptide Figainin 2, identified using the cloning strategy of cDNAs of the skin of the anuran *Boana raniceps*. The new isolated peptide was named as Figainin 2-Ba and presented a broad antimicrobial spectrum, including activity on bacteria of veterinary interest, Gram-negative *Escherichia coli* and Gram-positive *Staphylococcus aureus*, both veterinary clinical isolates, with MIC values of 8 and 32 µM, respectively. In addition, AMP Figainin 2-Ba showed antifungal activity against *Candida albicans* ATCC 14053 and *Cryptococcus neoformans* H99 with MIC values of 16 and 8 µM, respectively. These results suggest the AMP Figainin 2-Ba as a good candidate for the development of new drugs. The antimicrobial effects of five AMP analogs of Ceratotoxin-Ha, an AMP also identified in the *B. albopunctata* secretion, were also evaluated in the present study. Among the analogs of Ctx-Ha, the analog Ctx-Ha-A3 demonstrated good antimicrobial capacity with MIC values of 4 µM against multiresistant bacteria of veterinary interest, indicating to be a promising therapeutic agent in the treatment of these affections. The results of this work emphasize the importance of the combination of cDNA cloning and classical strategies of peptide purification, which allowed a better understanding of the set of peptides in the skin of the studied anuran.

Key words: Anurans, *Boana albopunctata*, Cutaneous secretion, cDNA, Antimicrobial peptides, Purification, Characterization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral do cDNA codificador de peptídeos antimicrobianos.	3
Figura 2. Diferentes estruturas de peptídeos antimicrobianos. A) mista α e β ; B) folha β ; C) α -hélice; D) estendida.	5
Figura 3. Modelo explicativo da seletividade de peptídeos antimicrobianos catiônicos em relação às bactérias Gram-positivas.	6
Figura 4. (A) Interação de PAMs catiônicos com a membrana interna; B) Modelo <i>barrel stave</i> ; C) Modelo poro toroidal; D) Modelo SMH; E) Modelo carpete.	7
Figura 5. Ilustração do modelo Shai-Matzuzaki-Huang (SMH).	8
Figura 6. Mecanismos de ação de algumas classes de antibióticos e seus respectivos mecanismos de resistência antimicrobiana.	10
Figura 7. Espécime adulto do anuro <i>Boana albopunctata</i> .	18
Figura 8. Perfil cromatográfico típico resultante do fracionamento da secreção cutânea de <i>B. albopunctata</i> em coluna C_{18} (Vydac 218TP54, 4.6 ID x 250 mm, 5 μ) em sistema HPLC com fluxo de 1 mL/min e detecção ao ultravioleta em 216 nm.	30
Figura 9. Espectro de massas da fração 23 obtida em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). Esse peptídeo corresponde ao PAM Ctx-Ha.	31
Figura 10. Espectro de massas da fração 25 obtida em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). Esse peptídeo corresponde ao PAM Hilina-a1.	31
Figura 11. Espectro de massas da fração 26 obtida em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). O inserto mostra a presença de adutos com os íons sódio e potássio.	32
Figura 12. Projeção em roda helicoidal do peptídeo isolado a partir da fração 26.	32
Figura 13. Alinhamento das sequências do peptídeo presente na fração 26 (denominado Figainina 2-Ba) de <i>B. albopunctata</i> com a do peptídeo Figainina 2 isolado de <i>B. raniceps</i> .	33
Figura 14. Alinhamento das sequências do peptídeo presente na fração 26 (denominado Figainina 2-Ba) de <i>B. albopunctata</i> com a do peptídeo Hilina-a1 também isolado de <i>B. albopunctata</i> .	33

- Figura 15.** Espectros dicróicos na região do ultravioleta distante dos peptídeos em água (linha sólida) e SDS (35 mM) (linha tracejada). (A) Figainina 2-Ba; (B) Ctx-Ha; (C) Ctx-Ha-A1; (D) Ctx-Ha-A2; (E) Ctx-Ha-A3; (F) Ctx-Ha-A4 e (G) Ctx-Ha-A5. 38
- Figura 16.** Gel de agarose a 1% para verificação da integridade do RNA total isolado a partir dos tecidos cutâneos de *B. albopunctata* em poços 1, 2, 3, 4 e 5. 39
- Figura 17.** Análise em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR obtidos a partir do cDNA de *B. albopunctata* utilizando os oligonucleotídeos (1) PPS-1, (2) PPS-1A, (3) PPS-2 e (4) PPS-2A. 39
- Figura 18.** Vetor pGEM-T-Easy e visualização dos sítios das enzimas de restrição. 40
- Figura 19.** Sequência nucleotídica de um cDNA que codifica um pré-pró-peptídeo antimicrobiano obtido a partir do tecido cutâneo de *B. albopunctata*. (A) Tradução *in silico* e (B) oligopeptídeo traduzido. 41
- Figura 20.** Alinhamento das sequências do peptídeo presente na fração 26 (denominado Figainina 2-Ba) de *B. albopunctata* com a do peptídeo derivado do clone B.albo_c6. 42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Oligonucleotídeos complementares à região 3' de RNAs e cDNAs. 27
- Tabela 2.** Oligonucleotídeos degenerados complementares à região 5' de cDNAs que codificam peptídeos antimicrobianos em hilídeos. 27
- Tabela 3.** Avaliação dos efeitos antimicrobianos (CIM, μM) dos peptídeos antimicrobianos Figainina 2-Ba e Ctx-Ha e de seus análogos sobre as bactérias resistentes Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa *Escherichia coli* de interesse veterinário. 34
- Tabela 4.** Avaliação dos efeitos antimicrobianos (CIM, μM) dos peptídeos antimicrobianos Figainina 2-Ba e Ctx-Ha e de seus análogos sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas susceptíveis de interesse médico. 35
- Tabela 5.** Avaliação dos efeitos antimicrobianos (CIM, μM) dos peptídeos antimicrobianos Figainina 2-Ba e Ctx-Ha e de seus análogos sobre as leveduras de interesse médico *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. 35
- Tabela 6.** Estimativa do conteúdo em α -hélice (%) dos peptídeos em água e em SDS 35 mM. 38
- Tabela 7.** Sequências peptídicas codificadas pelos cDNAs isolados da pele do anuro *B. albopunctata*. Em negrito e sublinhado, a sequência do peptídeo maduro. Cada sequência foi identificada como B.albo_cX, onde X se refere à sua ordem de apresentação na tabela. 41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATB - Antibiótico

ATCC - Coleção americana de culturas típicas, do inglês *American Type Culture Collection*

BHI - Infusão cérebro-coração, do inglês *Brain Heart Infusion*

cCath - Catelicidina

cDNA - DNA complementar, do inglês *Complementary DNA*

CIM - Concentração inibitória mínima, do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*

Da - Dalton

DNA - Ácido Desoxiribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

EDTA - Ácido Etileno diamino Tetra-Acético, do inglês *Ethylene diamine tetraacetic acid*

g - Gravidade

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

LHRH - Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante, do inglês *Luteinizing hormone-releasing hormone*

LPS - Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF - Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz, do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*

Meio LB - Meio Luria-Bertani

Min - Minuto

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MS - Espectrometria de massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MTT - Teste Colorimétrico para Avaliar a Viabilidade Celular, do inglês *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*

nm - Nanômetro

p/v - Peso/Volume

PAM - Peptídeo antimicrobiano

Pb - Pares de bases nitrogenadas

PBS - Tampão Salino Fosfato, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

RNA - Ácido Ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*

RP-HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa, do inglês *Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography*

RPM - Rotação por minuto

s - Segundo

SOC - Meio Super Ótimo com Repressão de Catabólitos, do inglês *Super Optimal Broth with Catabolite Repression*

TAE - Tris-Acetato-EDTA

UFC - Unidade formadora de colônia, do inglês *Colony Forming Unit*

v/v - Volume/Volume

ÍNDICE GERAL

PREFÁCIO	iv
APOIO FINANCEIRO	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
ÍNDICE GERAL	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Peptídeos antimicrobianos (PAMs) de anuros	2
1.2. Modos de ação dos PAMs	4
1.3. Mecanismos de resistência antimicrobiana	9
1.4. Análogos de peptídeos	12
1.5. Peptídeos na Medicina Veterinária	13
1.6. Microrganismos patogênicos de interesse médico	13
1.7. Microrganismos patogênicos de interesse veterinário	15
1.7.1. <i>Staphylococcus aureus</i> isolado de mastite bovina	15
1.7.2. <i>Escherichia coli</i> isolada de urina de cães com infecções de trato urinário	17
1.8. O anuro <i>Boana albopunctata</i>	18
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. OBJETIVO GERAL	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Captura dos espécimes e obtenção da secreção cutânea de <i>B. albopunctata</i>	21
4.2. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de <i>B. albopunctata</i>	21
4.3. Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF	21
4.4. Determinação da estrutura primária do peptídeo antimicrobiano de <i>B. albopunctata</i>	22
4.5. Bioinformática	22
4.6. Síntese química de peptídeos	22
4.7. Quantificação dos peptídeos	22
4.8. Análise dos componentes de estrutura secundária dos peptídeos sintéticos	23

4.9. Avaliação da atividade sobre bactérias patogênicas de interesse médico	23
4.10. Avaliação da atividade sobre bactérias patogênicas de interesse veterinário	24
4.11. Avaliação da atividade sobre leveduras patogênicas	25
4.12. Construção do banco de cDNAs de precursores de PAMs expressos no tegumento do anuro <i>B. albopunctata</i>	25
4.12.1. Dissecção da pele	25
4.12.2. Extração de RNA total e síntese de cDNAs	26
4.12.3. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e determinação da estrutura dos RNAs que codificam peptídeos antimicrobianos (PAMs) em <i>B. albopunctata</i>	26
4.12.4. Ligação de fragmentos de DNA em vetor, transformação de bactérias e seleção das colônias de interesse	27
4.12.5. Isolamento de DNA plasmideal	28
4.12.6. Sequenciamento automático de nucleotídeos	29
4.12.7. Análises das sequências nucleotídicas e peptídicas	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Fracionamento da secreção bruta de <i>B. albopunctata</i> por cromatografia líquida de alta eficiência e purificação de um PAM inédito	30
5.2. Caracterização da atividade antimicrobiana dos peptídeos	33
5.3. Caracterização estrutural dos peptídeos por dicroísmo circular (DC)	35
5.4. Determinação da integridade de RNAs e construção de banco de cDNAs que codificam peptídeos antimicrobianos	38
5.5. Sequências peptídicas derivadas de cDNAs isolados da pele de <i>B. albopunctata</i>	40
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÕES	46
8. PERSPECTIVAS	47
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. Introdução

A resistência antimicrobiana tem sido considerada um desafio para a saúde pública e para a Medicina Veterinária. Apesar de ser um fenômeno natural nos microrganismos, o uso demasiado de antibióticos nas diferentes populações, seja humana ou animal, facilita a seleção de genes de resistência. Mesmo com o avanço da microbiologia, das engenharias, da farmácia, da medicina humana e veterinária, esta resistência compromete o orçamento dos sistemas de saúde, sejam eles públicos ou privados, além de intensificar a ocorrência e a gravidade de infecções hospitalares e recidivas de patologias (da Costa e Júnior, 2017).

Agentes antimicrobianos têm um papel fundamental no tratamento de doenças em humanos e animais, demonstrando que estes dois grupos estão intimamente ligados. O uso indiscriminado de antimicrobianos na Medicina Veterinária gera um aumento no aparecimento de microrganismos resistentes, sejam eles patogênicos ou comensais (Argudín, *et al.*, 2017). A multirresistência a antimicrobianos tem se tornado frequente nas instituições de saúde, na comunidade, no meio ambiente e no meio rural. Um exemplo são os relatos de isolamento de cepas Gram-negativas multirresistentes e cepas Gram-positivas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) nos ambientes hospitalares (Barriere, 2015; Lee *et al.*, 2018; Woolhouse, *et al.*, 2018). Outro exemplo são as infecções crônicas causadas por cepas de *Staphylococcus* spp. em casos de mastite subclínica em vacas, o que dificulta o tratamento e a cura destes animais (de Souza, *et al.*, 2016).

Pesquisas voltadas ao reconhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos produtos de fontes naturais com atividade antimicrobiana são essenciais para o desenvolvimento de novos medicamentos (da Costa e Júnior, 2017). Venenos e toxinas de origem natural possuem singulares efeitos farmacológicos. Os vertebrados, mais especificamente os anfíbios da ordem Anura, fabricam um arsenal de princípios ativos que despertam interesse devido às suas atividades como possíveis mediadores farmacológicos (Prates e Júnior, 2001; Nascimento *et al.*, 2003; Xu e Lai, 2015).

A classe Amphibia contém 7.993 espécies descritas, as quais estão divididas em três ordens: Gymnophiona (cecílias), Caudata (salamandras) e Anura (sapos, rãs e pererecas), sendo que a ordem Anura possui o maior número de representantes, totalizando, até o momento, 7.100 espécies (Frost, 2019). Estes animais adaptaram-se a ambientes distintos, gerando diversidade de locomoção e estratégias de defesa. Seu tegumento é um órgão multifuncional envolvido na respiração cutânea, proteção contra abrasão, osmorregulação, termorregulação,

além de secreção de substâncias protetoras. Em espécies terrestres, a pele permite o movimento passivo de água e de gases, regulando o equilíbrio osmótico e a entrada de água (Clarke, 1997; Nascimento *et al.*, 2003). Desta forma, há a criação de um ambiente propício para desenvolvimento de microrganismos oportunistas, como vírus, bactérias, fungos e protozoários. Essa susceptibilidade permitiu o desenvolvimento de um mecanismo de defesa formado por uma secreção rica em compostos bioativos, incluindo aminas biogênicas, alcaloides, bufodienolídeos, proteínas e peptídeos (Clarke, 1997; Nascimento *et al.*, 2003). Tais moléculas apresentam diversas funções biológicas, incluindo propriedades neurotóxicas, vasoconstritoras, alucinógenas, hipotensoras, antimicrobianas, citotóxicas, entre outros (Nascimento *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2015). Dentre estes compostos, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) vêm ganhando cada vez mais destaque no cenário científico como uma alternativa no combate aos microrganismos patogênicos e resistentes a antimicrobianos (Mangoni, 2006; Pukala *et al.*, 2006; Azevedo Calderon *et al.*, 2011; Conlon *et al.*, 2012; Bahar e Ren, 2013; Ladram e Nicolas, 2016).

1.1. Peptídeos antimicrobianos (PAMs) de anuros

Peptídeos antimicrobianos são importantes componentes do sistema imune inato de diferentes espécies, como mamíferos, inclusive seres humanos, plantas, pássaros, peixes, anfíbios, insetos e microrganismos (Bahar e Ren, 2013; Mojsoska e Jensen, 2015).

Grandes quantidades de peptídeos biologicamente ativos são produzidos na pele de anfíbios, dentre os quais merecem destaque os peptídeos antimicrobianos que são moléculas utilizadas não só contra predadores macroscópicos, como ectoparasitas, mas também microscópicos, como microrganismos patogênicos (Bevins e Zasloff, 1990; Raaymakers *et al.*, 2017).

Em anfíbios, a produção de peptídeos antimicrobianos parece ser constitutiva, sendo liberados em resposta a um estímulo externo. Apesar da pouca especificidade, o sistema imune inato proporciona um reservatório imediato de peptídeos presente nas glândulas granulosas com atividade contra uma variedade de microrganismos (Barra e Simmaco, 1995; Raaymakers, *et al.*, 2017).

Os PAMs de anuros são moléculas pequenas (1-3 kDa), majoritariamente catiônicos e, em muitos casos, são anfipáticos (possuem uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica) (Nascimento *et al.*, 2003). Podem ser capazes de induzir seus efeitos diretamente a partir da interação com membranas biológicas ou indiretamente agindo sobre o sistema imune por

modulação de citocinas (Juarez *et al.*, 2003). As características físico-químicas comuns aos peptídeos antimicrobianos de anuros são essenciais para a sua ação na inibição da proliferação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, assim como, parasitas (Conlon *et al.*, 2012; Guimarães *et al.*, 2016; Ladram e Nicolas, 2016; Marr *et al.*, 2016). Além disso, há também relatos de ação antiviral. De acordo com Holthausen e colaboradores (2017) o peptídeo urumina, também isolado de anuros, parece ter um efeito em cepas do vírus Influenza a partir de uma área antigenicamente conservada, conhecida como proteína hemaglutina A. Cao e colaboradores (2017) demonstraram que o peptídeo antimicrobiano Hilina-a1 tem efeito antitumoral *in vitro* e, quando encapsulado em nanopartículas de sílica conjugado a um tripeptídeo (Arg-Gli-Asp), inibe o crescimento de tumores *in vivo*.

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) presentes na secreção cutânea de anuros são sintetizados e processados a partir da tradução de um RNA mensageiro característico o qual contém regiões altamente conservadas (Wang *et al.*, 2016). A tradução do RNA mensageiro nas células cutâneas dos anfíbios resulta em um pré-pró-peptídeo que comunga três regiões distintas, demarcadas pela presença de sítios de clivagem enzimática reconhecidos por serinoproteases análogas à tripsina. Uma região de peptídeo sinal formada por 20-27 resíduos de aminoácidos; uma região ácida, rica em resíduos de ácido glutâmico, formada por cerca de 20 resíduos de aminoácidos; e a região do peptídeo ativo, que pode ser constituída por polímeros contendo 10 a 50 resíduos de aminoácidos, os quais serão estocados nas glândulas granulosas após o processamento (Figura 1) (Popov, 2013).

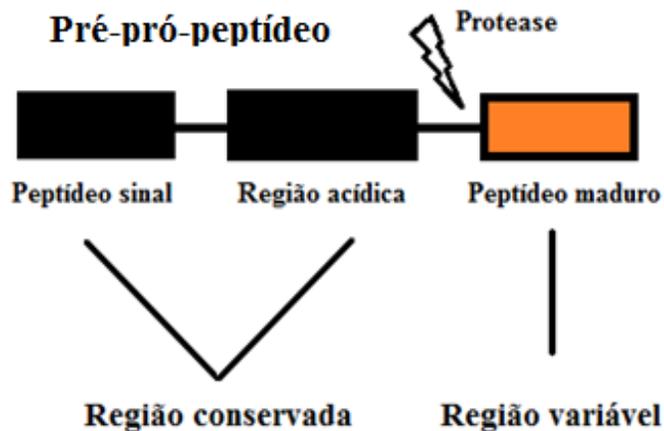


Figura 1. Estrutura geral do cDNA codificador de peptídeos antimicrobianos. Retirado de Popov (2013) com modificações.

Diferente das duas primeiras regiões, as quais são bastante conservadas entre espécies, a região do peptídeo ativo pode ser altamente variável (Popov, 2013; Wang *et al.*, 2016). A similaridade da pré-pró-região, a qual resulta em diversas estruturas, sugere que essa região vem do mesmo ancestral (Vanhoye *et al.*, 2003).

A porção sinal do precursor tem como função direcionar o peptídeo para a região correta da glândula. Após esse direcionamento, a porção sinal é clivada e liberada. Quando o animal é estimulado, seja por um ataque ou doença, o pró-peptídeo é clivado e o peptídeo maduro é secretado na pele ou no trato gastrointestinal. Pode ocorrer de este peptídeo ser citotóxico para o animal e assim há a degradação peptídica através de uma protease a qual inativa o peptídeo (Pukala *et al.*, 2006).

1.2. Modos de ação dos PAMs

As principais características que determinam a atividade biológica dos PAMs são a estrutura secundária, a cationicidade, a hidrofobicidade e a anfipaticidade destas moléculas (Mojsoska e Jenssen, 2015). Quando comparados com a terapêutica tradicional de antibióticos (ATBs) e quimioterápicos, os PAMs possuem propriedades únicas, tais como: efeito rápido, amplo espectro de ação e imunomodulação do organismo. Além disso, dificultam o aparecimento de microrganismos multirresistentes e têm ação anti-biofilmes, uma vez que seu principal alvo na membrana celular não depende de receptores e sim da interação física entre as partes (Huang *et al.*, 2015; Fuente-Núñez *et al.*, 2016). Estas interações ocorrem entre as estruturas secundárias (α -hélice e folha β) e os fosfolípidos presentes na membrana do microrganismo (Matsuzaki, 1999).

Os PAMs podem ser classificados de acordo com sua composição e também de acordo com sua estrutura secundária. Assim, eles podem ser lineares (ex.: magaininas, dermaseptinas); ricos em cisteínas (ex.: esculentina) ou ricos em aminoácidos específicos, como glicina, prolina, arginina e histidina. Em relação à estrutura, os PAMs podem assumir a forma de α -hélice; folha β ; mista α e β e ainda estendida (Mojsoska e Jenssen 2015; Narayana *et al.*, 2015) (Figura 2).

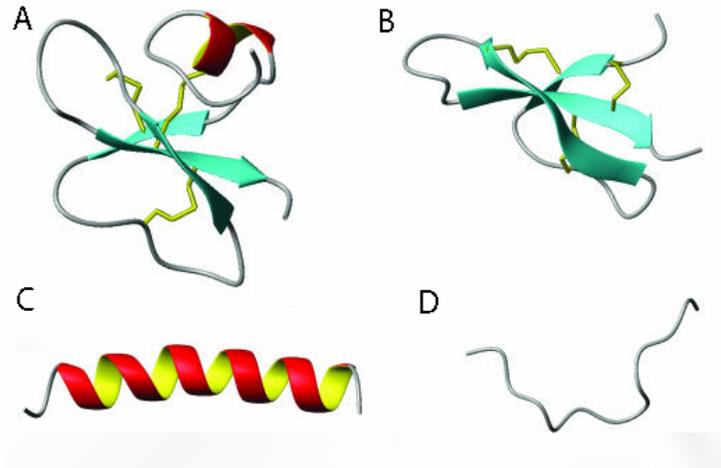


Figura 2. Diferentes estruturas de peptídeos antimicrobianos. A) mista α e β ; B) folha β ; C) α -hélice; D) estendida. Retirado de Jenssen *et al.* (2006) com modificações.

A seletividade de ação dos PAMs é devida, principalmente, à diferença entre as membranas celulares eucarióticas e procarióticas. Nas primeiras, a membrana é composta principalmente de fosfatidilcolina e esfingomieleina, o que proporciona uma carga positiva. Já nas membranas de microrganismos, estas são organizadas de forma que a região dos fosfolípidos carregada negativamente se encontra exposta, conferindo uma carga negativa para a membrana celular (Zasloff, 2002; Kumar *et al.*, 2018).

No caso de bactérias Gram-negativas, a camada externa contém lipopolissacarídeos e as Gram-positivas, ácidos teoicos. Desta forma, interações hidrofóbicas e eletrostáticas permitem a união e posterior efeito dos peptídeos antimicrobianos (Matsuzaki, 1999; Nascimento *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2018). Além disso, a presença de colesterol em células eucarióticas deixa sua membrana mais rígida, dificultando a ação dos PAMs nestas células (Figura 3) (Bechinger e Gorr, 2017).

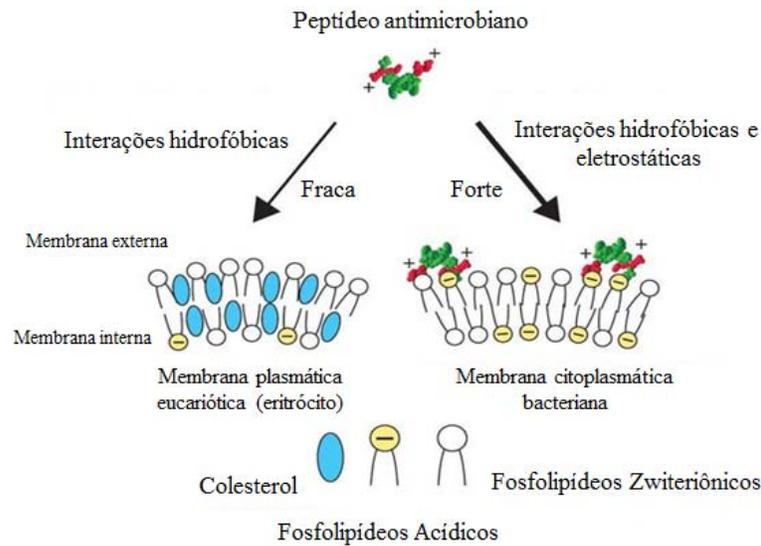


Figura 3. Modelo explicativo da seletividade de peptídeos antimicrobianos catiônicos em relação às bactérias Gram-positivas. Retirado de Zasloff (2002) com modificações.

Peptídeos antimicrobianos podem agir de diferentes formas a depender de sua estrutura, da razão peptídeo:lipídeo e ainda das propriedades dos lipídeos de membrana (Bechinger e Gorr, 2017). A ação destas moléculas precisa ser seletiva, rápida, de amplo espectro e com mínima indução de resistência microbiana (Matsuzaki, 1999). Em suma, peptídeos antimicrobianos catiônicos interagem com a membrana microbiana e desestabilizam esta, causando a morte do microrganismo. A interação é ainda mais forte com bactérias Gramnegativas, devido à presença de lipopolissacarídeos (LPS) na membrana (Mojsoska e Jenssen, 2015). Além disso, há indícios de que pode haver sinergismo na interação destas moléculas, possibilitando uma maior especificidade e também o uso de menores doses em futuras abordagens terapêuticas (Yu *et al.*, 2016).

As variações na composição, tamanho e carga residual de PAMs são responsáveis pela diversidade de modos de ação destas moléculas (Mishra *et al.*, 2018). Os principais modelos de interação entre peptídeos e membranas, são: *barrel stave* (forma de barril), tapete e poro toroidal.

O modelo de *barrel stave* sugere que, após a ligação de PAMs com a membrana, os primeiros se alinham perpendicularmente e se agregam a fim de formar poros ou canais na membrana. As cadeias hidrofóbicas dos peptídeos antimicrobianos se voltam para o centro

hidrofóbico da membrana, enquanto a parte polar dos PAMs cria um poro hidrofílico (Figura 4). Mesmo havendo desestabilização da membrana microbiana, este modelo não explica exatamente como ocorre a formação dos poros, uma vez que estes são, em sua maioria irregulares tanto em tamanho quanto em seletividade (Hale e Hancock, 2007; Mojsoska e Jenssen, 2015).

O modelo de poro toroidal é parecido com o *barrel stave*, porém os peptídeos permanecem ligados às cabeças dos lipídeos de membrana. Os lipídeos se dobram para dentro formando um poro que consiste exclusivamente de peptídeos e dos grupos hidrofílicos dos lipídeos (Figura 4). Após a formação do poro, há vazamento celular e posterior morte do microrganismo (Brogden, 2005; Hale e Hancock, 2007; Mojsoska e Jenssen, 2015).

Já no modelo de carpete, os peptídeos antimicrobianos catiônicos se reúnem na camada externa da membrana citoplasmática e em um determinado momento a quantidade de PAMs sobrecarrega a região e causa um colapso de membrana (Figura 4). Desta forma, há a formação de micelas e perda de componentes citoplasmáticos (Hale e Hancock, 2007).

Por fim, há o modelo conhecido como Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) (Figuras 4 e 5), o qual explica a maioria das atividades de PAMs. Inicialmente há interação entre o peptídeo e a membrana, logo em seguida ocorre o desarranjo dos fosfolipídeos e consequente alteração da estrutura da membrana, muito parecido com os outros modelos (Zaslhoff, 2002).

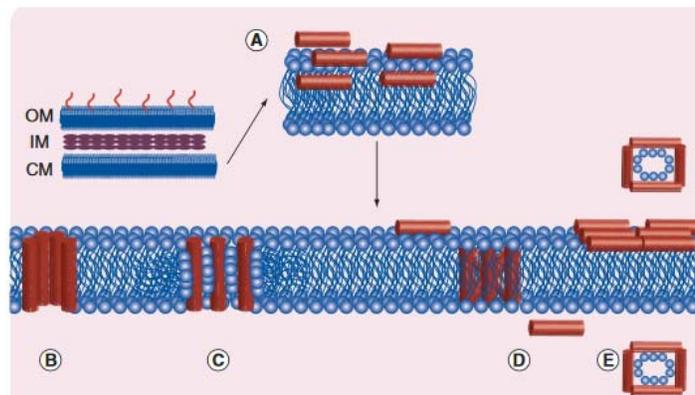


Figura 4. (A) Interação de PAMs catiônicos com a membrana interna; B) Modelo *barrel stave*; C) Modelo poro toroidal; D) Modelo SMH; E) Modelo carpete. CM: Membrana citoplasmática; IM: Membrana interna; OM: Membrana externa. Retirado de Hale e Hancock (2007) com modificações.

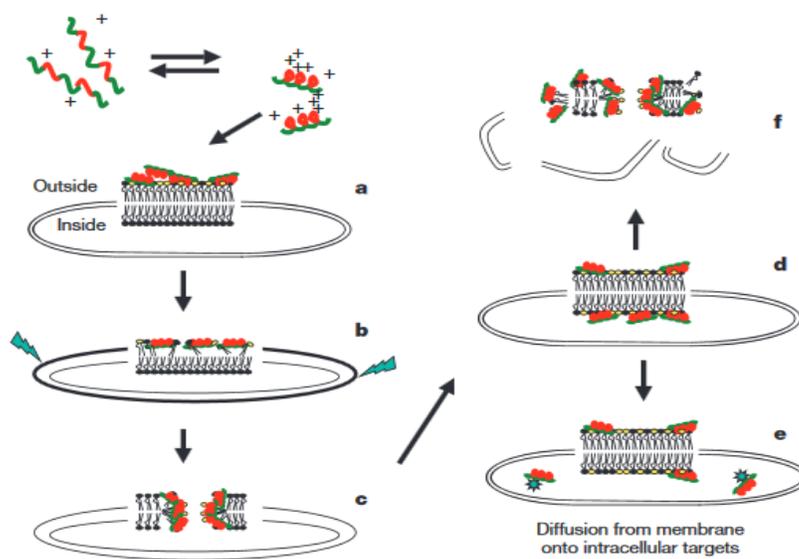


Figura 5. Ilustração do modelo Shai-Matzuzaki-Huang (SMH). Retirado de Zasloff (2002) com modificações.

Com ajuda da tecnologia do laser confocal, Park e colaboradores (2000) concluíram que análogos do peptídeo antimicrobiano Buforina II têm ação acumulativa no interior da célula bacteriana a depender da substituição do aminoácido leucina por prolina. Além disso, Buforina II e seus análogos apresentaram maior atividade antimicrobiana, com alta afinidade pelo material genético de microrganismos, DNA/RNA, quando comparado com o seu selvagem, Buforina I, isolado do sapo *Bufo bufo garagrizans* (Park *et al.*, 2000). Em outro estudo, Anunthawan e colaboradores (2015) demonstraram a capacidade dos peptídeos catiônicos KT2 e RT2 serem translocados para dentro da célula procariótica e se ligarem ao DNA. De acordo com o estudo realizado em membranas lipossomais, peptídeos catiônicos são capazes de interagir fortemente com o LPS, por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, o que levaria a captação e consequente translocação dos PAMs pela própria membrana citoplasmática (Anunthawan *et al.*, 2015).

Apesar da grande quantidade de estudos a respeito do potencial dos PAMs na terapêutica clínica, um melhor entendimento da ação destas moléculas ainda se faz necessário. O conhecimento das respostas de diferentes microrganismos frente aos PAMs permitirá o desenvolvimento de novos peptídeos com maior especificidade (Bechinger e Gorr, 2017).

1.3. Mecanismos de resistência antimicrobiana

Desde a descoberta da penicilina em 1928, o mau uso e abuso de antibióticos na saúde humana e veterinária têm acelerado o fenômeno da resistência antimicrobiana. Antibióticos são frequentemente prescritos de forma errônea para infecções virais como, por exemplo, gripes ou resfriados, e também para doenças bacterianas que muitas vezes são auto-limitantes, não necessitando de uma intervenção medicamentosa. Além deste abuso, as chamadas infecções multirresistentes têm se tornado cada vez mais comuns, principalmente em ambientes hospitalares. Dentre elas, as causadas por *Staphylococcus aureus* são as mais frequentes (Mendes e Palmer, 2018).

Como resposta ao uso inapropriado de tais medicamentos, microrganismos acabam passando por um processo de seleção natural, onde se multiplicam e produzem uma progênie mais resistente. Importante salientar que esse mecanismo de defesa foi desenvolvido a mais de 30.000 anos atrás, ou seja, a presença de alguns genes que conferem resistência às bactérias patogênicas e não patogênicas é notada anteriormente ao uso de antibióticos pelos seres humanos (Crofts *et al.*, 2017). Ademais, desde 1980, houve uma paralisação na descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos, majoritariamente devido à perda de interesse por parte das grandes empresas farmacêuticas (Ventola, 2015). Uma das razões que explica este comportamento é o desenvolvimento, quase inevitável, de mecanismos de resistência mesmo diante de novos antimicrobianos (Gould e Bal, 2013; Ventola, 2015).

Recentemente, alguns antibióticos contra bactérias Gram-positivas foram desenvolvidos como, por exemplo, a oritavancina derivada da vancomicina. Porém, nenhuma nova classe de antibióticos contra bactérias Gram-negativas foi descoberta ou aprovada desde as fluoroquinolonas, há mais de 50 anos atrás (Fuente-Núñez *et al.*, 2016; Kaur, 2018). Em decorrência deste cenário, existe uma necessidade premente em desenvolver novos candidatos medicamentosos que tenham diferentes modos de ação de maneira a impedir a resistência cruzada que ocorre entre estes microrganismos. Antes disso, se fazem indispensáveis a compreensão dos mecanismos de resistência, o comprometimento de pesquisadores no desenvolvimento de novos antimicrobianos e a futura aplicabilidade destes na clínica médica humana e veterinária (Kaur, 2018).

Alguns dos mecanismos de resistência desenvolvidos por microrganismos incluem: evitar penetração de antimicrobianos nas células; degradação enzimática dos medicamentos; desenvolvimento de novas rotas metabólicas; modificações em receptores, como no caso da

resistência à vancomicina, onde são necessárias seis mutações em diferentes genes a fim de reduzir o acesso da droga e ainda mudanças na permeabilidade de membrana como, por exemplo, bactérias Gram-negativas que impedem a entrada de compostos hidrofóbicos, como os antibióticos macrolídeos e beta-lactâmicos (Ferri *et al.* 2015; Foster, 2017). Os principais mecanismos de resistência bacteriana estão esquematizados na Figura 6.

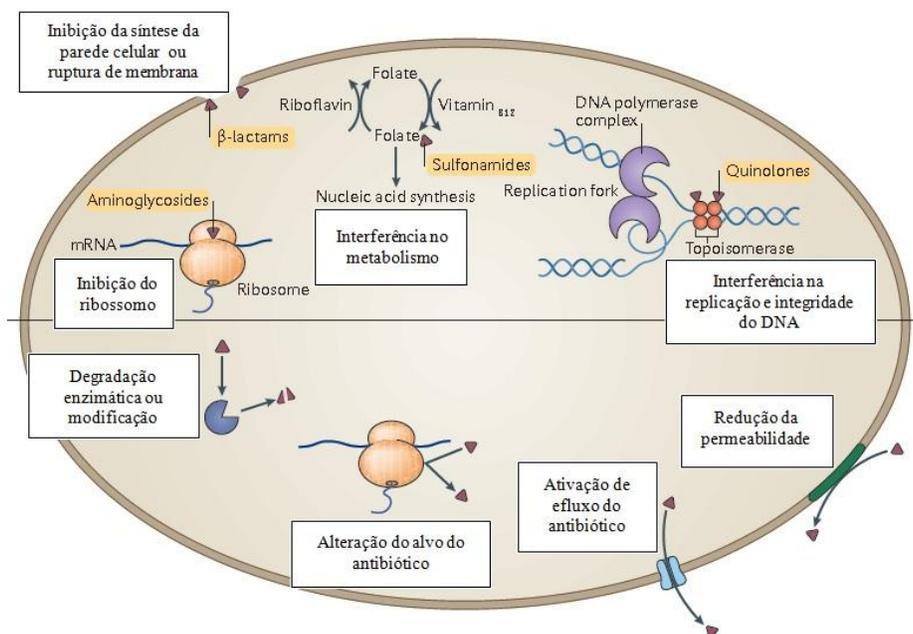


Figura 6. Mecanismos de ação de algumas classes de antibióticos e seus respectivos mecanismos de resistência antimicrobiana. Retirado de Crofts (2017) com modificações.

A maioria dos antibióticos usados na Medicina Veterinária para tratamento de doenças infecciosas são também usados na Medicina Humana, ou seja, o aparecimento de resistência em uma destas áreas interfere na seleção de bactérias resistentes na outra e vice-versa. Além da utilização no tratamento de doenças infecciosas, ATBs também são utilizados como profiláticos e estimuladores de crescimento em animais de produção. Normalmente essa medicação é feita na água ou no alimento sem levar em conta a variação de peso dos animais. Assim, é bastante comum a administração de doses subterapêuticas de antibióticos, o que leva à seleção de microrganismos resistentes (Meek *et al.*, 2015). Apesar de vários países já terem proibido o uso de antibióticos como fatores de crescimento, ela ainda ocorre no Brasil.

O uso excessivo de ATBs não só aumenta as chances de seleção de microrganismos resistentes, mas também de contaminação do meio ambiente. Alta solubilidade em água, longa

meia vida e a contínua introdução destes medicamentos em diversos tratamentos facilita sua persistência no solo (Tasho e Cho, 2016). A depender da classe do antibiótico, da quantidade usada e do animal a ser tratado, este medicamento pode ser fitotóxico e até mesmo mutagênico, podendo interferir na microbiota do solo e facilitar a propagação de genes de resistência (Jechalke *et al.*, 2014; Tasho e Cho, 2016). Outro ponto a ser considerado é a possível acumulação de resíduos medicamentosos nos produtos de origem animal o que pode gerar sérios riscos à saúde do consumidor. No Brasil, o órgão responsável pela promoção da segurança química dos alimentos de origem animal é o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), por intermédio do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC/Animal (PNCRC, 2018).

Um dos maiores responsáveis por resíduos antimicrobianos no leite é o tratamento para mastite bovina, o qual é feito, majoritariamente, por meio da aplicação do medicamento pela via intramamária, permitindo uma alta carga do princípio ativo na região (Pereira e Scussel, 2016). Nos últimos anos, tem sido difícil impedir que linhagens virulentas de *Staphylococcus aureus* causem mastite em bovinos de leite. Principalmente, por que estas linhagens são, em sua maioria, resistentes a vários antibióticos beta-lactâmicos, como a meticilina, considerado um dos mais eficazes da classe (Hamid *et al.*, 2017). Essa resistência se deve ao gene *MecA*, encontrado na maioria das linhagens de *S. aureus* resistentes (Lowy, 2003). Em um estudo feito com 160 amostras de leite de vaca e de búfala, 94,4% dos isolados de *S. aureus* se mostraram resistentes à penicilina. O antibiograma revelou ainda que dos dez isolados resistentes à meticilina, seis foram confirmados com a presença do gene *MecA* (Hamid *et al.*, 2017).

Fazendeiros que lidam com animais de produção como porcos, gado e galináceos, infectados com *S. aureus* resistente, têm grandes chances de se contaminarem e desenvolverem a doença (WHO, 2015). A crescente resistência antimicrobiana em meio aos patógenos de interesse veterinário dificulta e inviabiliza tratamentos nessa área.

O controle da resistência antimicrobiana necessita de uma abordagem mais holística, onde envolva não só a saúde humana e animal, mas também o meio ambiente (Puyvelde *et al.*, 2017). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o mundo está lidando com uma era pós-antibióticos, na qual infecções comuns podem levar à morte mais uma vez. Esta nova era é marcada pela onipresença da resistência a antibióticos e, devido a isso, deve-se melhorar o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas, focando principalmente em genes de resistência que são os principais responsáveis pela transferência horizontal da resistência

(Crofts *et al.*, 2017). Em 2015, a OMS desenvolveu o Plano Global em Resistência a Antimicrobianos, o qual inclui: melhorar o entendimento da resistência antimicrobiana, reforçar a pesquisa na área, reduzir a incidência de infecções recidivantes, conscientizar a população do uso desses medicamentos e propiciar um investimento sustentável no desenvolvimento de novos medicamentos (WHO, 2015).

1.4. Análogos de peptídeos

Atualmente há mais de 60 medicamentos baseados em peptídeos no mercado e este número tende a subir, uma vez que já são aproximadamente 140 peptídeos em fase de teste clínico e mais de 500 peptídeos terapêuticos em desenvolvimento (Fosgerau e Hoffman, 2015). Apesar do grande potencial farmacológico, peptídeos selvagens são pouco estáveis e têm uma meia vida muito curta, o que dificulta seu uso como medicamento. Uma das maneiras de amenizar esses obstáculos é o desenho racional destas moléculas. Essa estratégia permite a identificação de aminoácidos essenciais que compõem o peptídeo e ainda a localização para possíveis substituições a fim de alterar as características físicoquímicas da molécula em questão. Assim, de acordo com as propriedades farmacocinéticas e farmacológicas desejadas é possível evitar agregação, aumentar seletividade e também a solubilidade destes peptídeos terapêuticos (Fosgerau e Hoffman, 2015).

A incorporação de D-aminoácidos e aminoácidos não-naturais na sequência peptídica têm sido usados a fim de aumentar sua atividade biológica e diminuir chances de proteólise (Giuliani *et al.*, 2008). A helicidade do PAM é uma característica importante, uma vez que uma maior quantidade de hélices em sua formação permite uma melhor interação com membranas biológicas anfífilas. Alguns aminoácidos facilitam a formação destas hélices e propiciam uma melhor atividade do peptídeo. Porém, é importante salientar que algumas substituições podem afetar outras propriedades e prejudicar a seletividade do PAM. Como, por exemplo, PAMs com uma carga catiônica extensa demonstram uma diminuição de especificidade procariótica (Dathe e Wieprecht, 1999; Pál *et al.*, 2005).

Além da substituição de aminoácidos não codificados, é possível ainda conjugar peptídeos antimicrobianos a nanopartículas, a fim de facilitar a chegada deste material em células alvo. O uso deste carreador possibilita o aumento da concentração de peptídeos no local de ação, além de proteger estes contra o meio externo e posterior degradação. De acordo com Casciaro e colaboradores (2017), o uso do peptídeo antimicrobiano Esculentina-1a(1-21)NH₂, com suas devidas modificações estruturais, conjugado com nanopartículas de ouro possibilitou

uma maior ação contra a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* quando comparado ao peptídeo selvagem livre. Também houve queda na citotoxicidade em queratinócitos com a presença do carreador, provando um potencial uso de nano-formulações em tratamentos tópicos.

1.5. Peptídeos na Medicina Veterinária

Atualmente drogas baseadas em peptídeos são bastante indicadas para o tratamento de animais de companhia, cavalos e, principalmente, animais de produção, como ruminantes, porcos, frangos e peixes. Essa escolha é devido a estes compostos ativos requererem menores doses para realizar suas ações (Mergler, 2017). O emprego de peptídeos antimicrobianos é uma alternativa ao uso indiscriminado de antibióticos na produção animal. Além de terem uma ampla ação contra diferentes microrganismos e uma rápida degradabilidade no organismo do animal, reduzem a chance de causar resistência microbiana, facilitando e diminuindo o tempo de tratamento (Mergler, 2017).

Inúmeros análogos do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) têm sido estudados afim de regular as etapas reprodutivas de animais de produção como, por exemplo, alarelina, deslorelina, lutrelina, entre outros (Bachem, 2016). O uso do LHRH e seus agonistas ou antagonistas são utilizados para regular a fertilidade de animais de produção e tratar patologias do trato reprodutivo (Bachem, 2016).

Estudos recentes na medicina humana e veterinária indicaram o uso do C-peptídeo como um excelente marcador de função pancreática. O C-peptídeo representa o produto da quebra da extremidade C-terminal durante o processo de formação da molécula ativa de insulina. O uso deste biomarcador na clínica veterinária permitiria a avaliação do desempenho pancreático em cães, gatos e cavalos, além de monitorar o status nutricional de primatas e investigar potenciais tratamentos relacionados à diabetes. Infelizmente, a medicina veterinária ainda está iniciando esses estudos e mais pesquisas devem ser realizadas a fim de validar tais resultados (Rosenfield *et al.*, 2017). Apesar do alto custo desta tecnologia, peptídeos antimicrobianos nativos servem como modelos para o desenvolvimento de análogos mais potentes e mais fáceis de serem produzidos em larga escala (Galdiero *et al.*, 2015).

1.6. Microrganismos patogênicos de interesse médico

Várias doenças causadas por microrganismos têm afetado cada vez mais a saúde humana e, também, a estabilidade econômica da sociedade. Além de doenças transmitidas por animais, sabe-se ainda do aumento de agentes multirresistentes causadores de diferentes

patogênicas, como salmonelose, tuberculose, choque endotóxico, entre outras (Morens e Fauci, 2013).

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa, atualmente reconhecida como uma ameaça urgente à saúde humana, devido ao surgimento de linhagens multirresistentes associadas a surtos hospitalares e linhagens hipervirulentas associadas a infecções graves adquiridas. Em ambientes hospitalares é especialmente problemática, pois provoca uma série de infecções agudas em pacientes imunodebilitados (Holt *et al.*, 2015).

Dentre as principais causas que favorecem a incidência de infecções hospitalares, destacam-se: a suscetibilidade do paciente, os métodos de diagnóstico e os procedimentos terapêuticos utilizados. Também contribuem para o aumento da incidência, o próprio meio ambiente hospitalar, incluindo o ar, a água e a superfície de alvenarias e móveis, pois representam focos de crescimento de microrganismos (de Souza *et al.* 2016). As Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) apresentam uma maior frequência de contaminação, principalmente devido à maior quantidade de equipamentos nesse setor e as condições dos pacientes, que tendem a apresentar mais fatores de risco e uma alta taxa de infecção (De Oliveira e Damasceno, 2010).

A multirresistência a antibióticos das bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp, entre outras, tem aumentado com o passar dos anos, principalmente aos antibióticos beta-lactâmicos. Infecções causadas por estas bactérias ocorrem, normalmente, em doentes imunocomprometidos, principalmente em doentes em ambiente hospitalar, e estão frequentemente associadas ao uso de dispositivos como ventiladores e cateteres, mas também ao uso prolongado de antibióticos (Matos e Silva, 2017).

Staphylococcus aureus pode ser considerado uma bactéria Gram-positiva comensal ou patogênica no nosso organismo. Quando oportunista causa infecções na pele, osteoarticulares, em tecidos moles, bacteremia e endocardite. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é uma das causas mais frequentes de infecções hospitalares atualmente. Esta maior incidência leva à utilização de antibióticos mais potentes, como a daptomicina, os quais são mais caros e podem apresentar um maior número de efeitos adversos, sendo necessária a sua monitorização. No passado, MRSA era restrito a ambientes hospitalares enquanto que hoje também causa infecções adquiridas na comunidade (Matos e Silva, 2017).

De acordo com Stojanović-Radić e colaboradores (2016), os agentes mais comuns em infecções de feridas de pele são os do gênero *Staphylococcus*. No estudo, *Staphylococcus epidermidis* foi o mais predominante (18,4%), seguido pelo *S. aureus* (16,8%), *P. aeruginosa* (12,7%) e, por fim, *E. faecalis* (10,4%). As bactérias Gram-positivas mostraram um maior grau de resistência à penicilina, enquanto que a maioria das Gram-negativas foram resistentes à tetraciclina.

1.7. Microrganismos patogênicos de interesse veterinário

1.7.1. *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina

A mastite bovina é um processo infeccioso e inflamatório da glândula mamária, acarretando modificações na composição do leite *in natura*, como o aumento de células somáticas, principalmente neutrófilos (Moritz e Moritz, 2016). Dentre os microrganismos causadores desta patologia, a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* é um dos mais comuns.

O *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva que atua como agente de uma ampla variedade de infecções, variando desde aquelas localizadas até algumas disseminadas, com elevada gravidade. Os principais fatores de virulência deste microrganismo são os componentes da superfície celular, toxinas e enzimas, sendo suas principais funções evitar a fagocitose, lisar células e coagular o sangue do hospedeiro (Trabulsi *et al.*, 2005). Mesmo não sendo considerado um patógeno tipicamente intracelular, como *Listeria monocytogenes* e *Shigella flexneri*, *S. aureus* pode invadir e sobreviver dentro de células mamárias do hospedeiro, no caso da mastite (Bardiau *et al.* 2016, Garzoni e Kelley, 2009). A invasão de células epiteliais por bactérias é um importante mecanismo para a progressão da mastite e pode ser modulada pelo ambiente, genética e ainda, fatores hormonais do animal (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009).

Apesar da bactéria *S. aureus* ser susceptível à ação de diversas drogas (ex.: penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol), ainda há uma alta capacidade desta em apresentar resistência. A porcentagem de cura usando antibióticos previamente aprovados é de aproximadamente 10-30% (Gomes e Henriques, 2016). Tal resistência é determinada por mutações em genes e também por aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie, por meio de plasmídeos e transposons (Trabulsi *et al.*, 2005). Devido a esta múltipla resistência, se faz necessário a realização periódica de testes de sensibilidade *in vitro*, uma vez que existem variações no perfil de

sensibilidade e resistência, o que compromete o tratamento do animal e aumenta os custos da produção rural (Medeiros *et al.*, 2009).

A mastite infecciosa é considerada a mais importante, pois não é auto-limitante, podendo evoluir eventualmente para um quadro de septicemia. Além disso, apresenta baixa porcentagem de cura espontânea e representa um potencial risco a saúde do consumidor por veicular microrganismos zoonóticos (da Costa, 1998).

Além dos aspectos ligados à saúde, a mastite é uma das principais causas de prejuízos na produção leiteira. Este prejuízo é devido a uma série de fatores, sendo o principal a redução na produção das glândulas mamárias com mastite subclínica. Outros fatores são: a perda por leite descartado por alteração e/ou pela presença de resíduos após tratamento; gastos com tratamentos, isto é, honorários de veterinários e despesas com medicamentos e, por fim, a morte, descarte do animal, e a desvalorização comercial do animal, devido a glândulas mamárias afuncionais ou atrofiadas (Gomes e Henriques, 2016; da Costa, 1998).

A mastite pode ser classificada em clínica e subclínica. A mastite clínica caracteriza-se por alterações visíveis da glândula e/ou do leite. Pode ser aguda ou crônica. No caso da primeira, observam-se sinais claros do processo inflamatório (edema, dor, calor, rubor) com ou sem alterações das características do leite. Já na mastite clínica crônica observa-se fibrosamento de tetos e alterações no leite, como grumos e coágulos. Já a mastite subclínica não é tão evidente. Sua principal característica é a diminuição da produção leiteira sem a presença de sinais de processo inflamatório ou fibrosamento, o que torna o diagnóstico mais difícil (da Costa, 1998).

Recentemente o controle de mastite subclínica em vacas tem sido bastante discutido, principalmente em relação à redução do uso de antibióticos nestes animais. Alternativas para o uso indiscriminado destes medicamentos no campo se fazem necessárias, especialmente pela entrada de bactérias resistentes na cadeia alimentícia (Geetha *et al.*, 2015; Gomes e Henriques, 2016). Além disso, a presença de resíduos de antibióticos em produtos lácteos consumidos por humanos representa uma enorme preocupação. Desta forma, é preciso desenvolver novas terapias antimicrobianas, além de antibióticos, a fim de minimizar o uso destes últimos em animais de produção (Gomes e Henriques, 2016). Alguns tratamentos alternativos ao uso de antibióticos incluem bacteriófagos, nanopartículas e agentes antimicrobianos derivados de plantas ou animais (Gomes e Henriques, 2016).

1.7.2. *Escherichia coli* isolada de urina de cães com infecções de trato urinário

As infecções bacterianas do trato urinário (ITUs) são causa comum de doença em cães, gatos e humanos. Embora bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp., possam ocasionar ITUs, as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. e *Enterobacter* spp.) respondem por mais de 70% dos casos (Carvalho *et al.*, 2014). A proximidade com o ânus e com a uretra, além do uso de cateteres, facilita o acesso dessas bactérias ao trato urogenital.

De acordo com Kern e colaboradores (2018), as ITUs são classificadas como não complicadas e complicadas. As infecções não complicadas são definidas como infecções sem causas primárias, como anormalidades anatômicas, doenças metabólicas ou endócrinas, imunossupressão, e as complicadas são infecções com causas primárias e/ou genéticas e o sexo definido como macho.

Escherichia coli uropatogênica tem características que a permitem infectar o trato urinário como, por exemplo, a presença de flagelos e pili. Apesar de vários estudos serem desenvolvidos a fim de identificar aspectos moleculares que facilitam sua adaptação em seres humanos, pouco se sabe a respeito das linhagens de *E. coli* que infectam o trato urinário de cães e gatos. O conhecimento da patogenia desta bactéria em animais domésticos se faz necessária, uma vez que existem fatores de risco aí associados que diferem dos já conhecidos nos seres humanos (Hill *et al.*, 2015).

A escolha do antimicrobiano para o tratamento desta afecção deveria fundamentar-se em testes de sensibilidade microbiana. Porém, sabe-se que a escolha de antibióticos se dá, comumente, baseado na experiência profissional, no apelo comercial ou no custo destes medicamentos. Este uso indevido e indiscriminado no combate às infecções do trato urinário de cães e gatos tem aumentado a pressão seletiva de linhagens multirresistentes nos animais de companhia (Siqueira *et al.*, 2008).

Estudos continuados de sensibilidade bacteriana, principalmente para *E. coli*, é de extrema importância para otimizar protocolos terapêuticos e investigar a ocorrência de linhagens multirresistentes em virtude de transmissão cruzada entre homens e animais (Siqueira *et al.*, 2008). Kern *et al.* (2018) demonstraram que cães infectados com linhagens de *E. coli* formadoras de biofilme não têm distinção clínica daqueles com infecção de trato urinário por linhagens não-formadoras de biofilmes. Isso significa que a terapêutica antibiótica usada

normalmente é a mesma para ambas as infecções, o que prova a pouca especificidade dos tratamentos realizados para esta afecção.

1.8. O anuro *Boana albopunctata*

O anuro *Boana albopunctata* (Spix, 1824) pertence à família Hylidae que representa uma das famílias com maior diversidade de espécies entre os anuros. (Frost, 2019). Apresenta ampla distribuição pela América do Sul, ocorrendo na Argentina, Uruguai, Bolívia, Paraguai e Brasil (Pacheco *et al.*, 2017). Apesar da preferência por matas rasteiras e áreas inundadas com presença de fossos ou rios, seu habitat se estende por todo o território brasileiro, principalmente pela sua adaptabilidade a ambientes desmatados e modificados (Brandão e Araújo, 2001). A coloração deste anuro é bastante variável, indo do amarelo ao marrom-claro. Sua característica diferencial é a presença de pontos amarelos em face ventral das coxas, o que contribui para sua captura, além da vocalização típica dos machos. Estes vocalizam juntos, às vezes em quartetos, com o corpo em posição horizontal ou com a cabeça levemente voltada para cima (Clemente, 2008) (Figura 7). Os componentes da secreção desta espécie ainda são pouco estudados, sabendo-se da presença do peptídeo citolítico Hilina-a1 (Castro *et al.*, 2009) e do peptídeo antimicrobiano denominado Ctx-Ha, o qual possui similaridade com as ceratoxinas isoladas da mosca *Ceratitis capitata* (Cespedes *et al.*, 2012). O PAM Hilina-a1, com estrutura primária IFGAILPLALGALKNLIK-NH₂, contém alta taxa de resíduos hidrofóbicos (I, L e V) e uma porção C-terminal amidada. A presença de uma hélice anfipática bastante estável explica sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e também sua atividade hemolítica (Castro, *et al.* 2009; Alves *et al.*, 2015).



Figura 7. Espécime adulto do anuro *Boana albopunctata* (Foto gentilmente cedida por Carlos Henrique L. N. Almeida).

2. JUSTIFICATIVA

O entendimento dos mecanismos que regem a expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos é um passo de extrema importância para a compreensão da diversificação dos peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea de anuros. Além disso, de posse das sequências de cDNAs é possível a seleção e síntese química de PAMs que serão caracterizados biologicamente, permitindo ganhos consideráveis no tempo de execução dos projetos de pesquisa na área. Importante salientar que os componentes da secreção da espécie em questão, *B. albopunctata*, foram pouco estudadas até o momento, abrindo espaço para o isolamento e a caracterização de peptídeos antimicrobianos inéditos utilizando técnicas de biologia molecular e bioquímica.

A caracterização de novos peptídeos com efeitos antimicrobianos e não citolíticos sobre as células do hospedeiro é de extrema importância pelo fato da crescente resistência dos microrganismos aos tratamentos atualmente disponíveis.

Nos últimos anos, o grupo de "Tecnologia de Peptídeos Biologicamente Ativos" da Universidade de Brasília vem se dedicando à purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos (PAMs) isolados da secreção cutânea de anuros, assim como, ao desenho racional e síntese química de análogos de PAMs com vistas à produção de compostos com aplicação terapêutica e o presente trabalho está inserido dentro desse contexto e pretende contribuir com a área com a identificação de novos PAMs, bem como a avaliação de suas propriedades antimicrobianas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente projeto teve por objetivo geral investigar os componentes da secreção cutânea do anuro *Boana albopunctata* empregando uma abordagem experimental combinando técnicas de biologia molecular e de química de peptídeos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Identificar, isolar e caracterizar estruturalmente peptídeos antimicrobianos inéditos presentes na secreção cutânea do anuro *B. albopunctata*;

3.2.2. Analisar comparativamente o novo peptídeo antimicrobiano de *B. albopunctata* isolado no presente estudo com outros PAMs já descritos na literatura;

3.2.3. Sintetizar quimicamente o peptídeo antimicrobiano de *B. albopunctata* isolado no presente estudo;

3.2.4. Determinar a composição de elementos de estrutura secundária do peptídeo antimicrobiano de *B. albopunctata* isolado no presente estudo e dos análogos do PAM Ctx-Ha (previamente produzidos pelo nosso grupo de pesquisa) com o emprego da técnica de dicroísmo circular;

3.2.5. Avaliar a atividade antimicrobiana do peptídeo antimicrobiano de *B. albopunctata* isolado no presente estudo e dos análogos do PAM Ctx-Ha (previamente produzidos pelo nosso grupo de pesquisa) sobre isolados clínicos obtidos de infecções veterinárias e sobre bactérias e fungos susceptíveis de interesse médico;

3.2.6. Identificar cDNAs para peptídeos antimicrobianos obtido a partir de RNAs isolados do tegumento do anuro *B. albopunctata*;

3.2.7. Analisar e caracterizar os cDNAs codificadores para peptídeos antimicrobianos do anuro *B. albopunctata*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Captura dos espécimes e obtenção da secreção cutânea de *B. albopunctata*

Espécimes adultos de *B. albopunctata* do sexo masculino foram coletados no Estado de Goiás. Os anfíbios foram capturados manualmente durante o período noturno, sendo localizados por meio dos sons emitidos durante sua vocalização. Todas as coletas foram realizadas sob licença do ICMBIO.

A secreção cutânea foi obtida por estimulação elétrica, com aplicação de corrente elétrica branda alternada na região dorsal dos animais. Esta estimulação se deu em três etapas com duração de 30 s de estímulo. O material foi coletado em água Milli-Q e colhido em tubos de 50 mL como um extrato solúvel. Este foi então mantido no gelo e liofilizado logo em seguida. A secreção cutânea utilizada foi armazenada no banco de secreções do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília a -20 °C até seu uso.

4.2. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de *B. albopunctata*

Alíquotas individualizadas das secreções liofilizadas foram dissolvidas em TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q, centrifugadas e fracionadas em colunas de RP-HPLC tipo C₁₈ analítica (Vydac 218TP54, 4.6 ID x 250 mm, 5 µ). A eluição foi realizada com aplicação de gradientes lineares de acetonitrila e detecção no ultravioleta em 216 nm. As condições de eluição empregadas foram as seguintes: gradiente de 0 a 25% de solvente B (TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila) em 5 min; de 25 a 45% de solvente B em 25 min; de 50 a 100% de solvente B em 10 min, seguido de lavagem final por 5 min com 100% de solvente B. As frações eluídas foram coletadas manualmente e secadas em concentrador a vácuo e armazenadas a 20 °C.

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

As frações cromatográficas que exibiram atividade antimicrobiana no ensaio de varredura realizado (como descrito no item 4.7) foram analisadas *off-line* em um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF modelo Autoflex II (Bruker, Alemanha) operado no modo positivo e com emprego do refletor. Nas análises foi avaliado o grau de homogeneidade e as massas moleculares dos componentes presentes nas amostras. As frações foram reconstituídas em acetonitrila 50% (v/v) contendo TFA 0,1% (v/v) e 1 µL de cada fração cromatográfica foi aplicada em uma placa de aço inoxidável juntamente com a matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, 10 µg/µL) ressuspensa em acetonitrila 50% (v/v) contendo TFA 0,1% (v/v). O equipamento foi previamente calibrado utilizando-se o padrão Peptide Calibration Standard II (Bruker, Alemanha), sendo analisada a faixa de m/z de 800 a 3500.

O software FlexAnalysis 3.4 foi empregado nas análises dos espectros de massa obtidos. Os peptídeos antimicrobianos identificados no banco de cDNAs também foram analisados empregando-se sequenciamento *de novo* por espectrometria de massa usando o mesmo equipamento modelo Autoflex II (Bruker, Alemanha) operado no modo positivo, com emprego do refletor.

4.4. Determinação da estrutura primária do peptídeo antimicrobiano de *B. albopunctata*

O peptídeo antimicrobiano isolado no presente estudo foi sequenciado empregando-se a técnica de sequenciamento químico N-terminal (degradação de Edman) em sequenciador automático PPSQ-31A/33A (Shimadzu Co., Japão). O equipamento foi previamente calibrado com uma mistura padrão de PTH-aminoácidos e foi operado de acordo com as orientações do fabricante.

4.5. Bioinformática

O algoritmo BLASTp (Altschul *et al.*, 1990; disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), o banco de dados APD3 (Wang *et al.*, 2016; disponível em <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) e diferentes referências bibliográficas sobre o tema foram utilizados para buscas de similaridade entre as sequências encontradas para os PAMs de *B. albopunctata* e outros peptídeos antimicrobianos já descritos na literatura; a ferramenta *Expasy pI/Mw tool* (http://web.expasy.org/compute_pi/) (Bjellqvist *et al.*, 1993) foi utilizada para o cálculo da massa teórica monoisotópica dos peptídeos; para o alinhamento de duas sequências foi empregado *EMBOSS Needle Pairwise Sequence Alignment* (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). Também foi empregado o programa NetWheels (disponível em <http://lbqp.unb.br/NetWheels/>) para a geração de projeções em roda helicoidal - representação de Schiffer–Edmundson (Schiffer e Edmundson, 1967).

4.6. Síntese química de peptídeos

O peptídeo antimicrobiano de *B. albopunctata* isolado no presente estudo e o PAM Ctx-Ha e seus análogos foram produzidos pela empresa especializada em síntese de peptídeos GenOne e empregados nos experimentos propostos

4.7. Quantificação de peptídeos

Os peptídeos sintéticos empregados no presente estudo foram quantificados em espectrofotômetro Bel Photonics UV/Vis M51 (Biovera, Brasil), por meio da leitura das

absorbâncias nos comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm (Aitken e Learmonth, 2002; <https://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/abs205.html>).

O cálculo que permitiu obter a concentração protéica em µg/mL a partir das medidas de absorbância está descrito abaixo:

$$\text{Concentração}_1 = \frac{\text{Abs}_{(205\text{nm})} \times 1000}{31} \qquad \text{Concentração}_2 = 144 \times [\text{Abs}_{(215\text{nm})} - \text{Abs}_{(225\text{nm})}]$$

$$\frac{\text{Concentração}_1 + \text{Concentração}_2}{2} = \text{Concentração da alíquota analisada}$$

O volume total do estoque de cada peptídeo foi aliqotado em microtubos de 1,5 mL que foram secos em concentrador a vácuo.

4.8. Análise dos componentes de estrutura secundária dos peptídeos sintéticos

Ensaio de dicroísmo circular (DC) foram realizados utilizando o espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, Tóquio, Japão) equipado com um controlador de temperatura do tipo *Peltier* (Jasco, Japão) e uma bomba de água. Espectros na região distante da UV visível (190-260 nm) dos peptídeos sintéticos a 50 µM foram obtidos em água destilada e em SDS 35 mM a 25 °C e foram adquiridos usando uma cubeta de quartzo de comprimento de 0,1 cm. Cinco medições consecutivas foram acumuladas e os espectros médios foram corrigidos para a contribuição da linha de base da água e do SDS. A elipticidade observada foi transformada em valores de elipticidade molar ([θ]) baseada na massa molecular por resíduo de 115 Da (Pace *et al.*, 1997). O conteúdo de α-helice foi estimado considerando os valores de [θ] 208 nm em diferentes temperaturas usando a seguinte equação (Greenfield e Fasman, 1969):

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

4.9. Avaliação da atividade dos peptídeos sobre bactérias patogênicas de interesse médico

Linhagens de bactérias, obtidas do Banco de Culturas do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília, foram cultivadas em 7 mL de meio Mueller-Hinton (MH), sob agitação, por 12 h a 37 °C. Em seguida, foram diluídas em meio MH até atingir o valor 1.0 de densidade ótica a 590 nm. Finalmente, cada suspensão bacteriana foi diluída em meio MuellerHinton fresco, nas proporções de 1:50 para bactérias Gram-negativas e 1:100 para Gram-positivas. As amostras foram solubilizadas em água Milli-Q estéril e incubadas com a suspensão bacteriana diluída, numa proporção de 1:1 (v/v), em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato).

Como controle representativo da ausência de crescimento bacteriano, foi realizada a incubação de formaldeído 0,4% (v/v) com a suspensão bacteriana. Como controle representativo da proliferação máxima, foi feita a incubação da suspensão bacteriana com água Milli-Q estéril. Após a incubação por um período de 20-24 h, a 37 °C, as placas foram analisadas a 595 nm em leitora de microplacas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, EUA).

O ensaio de varredura foi realizado com as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2883 (Gram-negativa), a fim de verificar quais frações cromatográficas apresentariam atividade inibitória sobre o crescimento bacteriano. Cada fração cromatográfica de uma corrida de RP-HPLC foi solubilizada em água Milli-Q e incubada com a suspensão bacteriana, de acordo com o método descrito.

De posse das versões sintéticas do PAM inédito isolado da secreção cutânea de *B. albopunctata* e também do PAM Ctx-Ha e seus análogos foram realizadas determinações da concentração mínima inibitória (CIM) para as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Enterobacter hormaechei* ATCC 700323 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Aliquotas de 50 µL de diluições seriadas de cada peptídeo puro, feitas a partir de uma solução-estoque de 256 µM esterilizada por filtração em filtros Millex GV 0,22 µm (Merck, Alemanha) foram incubadas com 50 µL de suspensão bacteriana, contendo de $2-7 \times 10^5$ UFCs. Após a incubação por um período de 20-24 h a 37 °C, as placas foram analisadas a 595 nm, em leitora de microplacas (Multiskan FC, ThermoScientific, EUA). Dois ensaios independentes foram realizados em triplicata onde a CIM foi assumida como sendo a menor concentração do composto na qual não houve crescimento espectrofotometricamente detectável.

4.10. Avaliação da atividade dos peptídeos sobre bactérias patogênicas de interesse veterinário

Linhagens resistentes de *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Escherichia coli* (Gram-negativa), ambas de isolados clínicos, o primeiro de mastite bovina e o segundo de urina de cães com cistite, foram gentilmente cedidas pelo Banco de Culturas do Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário de Brasília (HVET-UnB). Estas bactérias foram cultivadas em placas contendo meios de cultura apropriados para cada linhagem bacteriana pelo período de 24 h a 37 °C. As bactérias, em fase logarítmica de crescimento, foram diluídas no meio de cultura Mueller-Hinton caldo nas proporções 1:50 para a bactéria Gram-negativa e

1:100 para a Gram-positiva. Alíquotas de 50 µL de diluições seriadas de cada peptídeo puro, feitas a partir de uma solução-estoque de 256 µM esterilizada por filtração em filtros Millex GV 0,22 µm (Merck, Alemanha), foram incubadas com 50 µL de suspensão bacteriana, contendo de $2-7 \times 10^5$ UFCs. Após a incubação por um período de 20-24 h a 37 °C, as placas foram analisadas a 595 nm, em leitora de microplacas (Multiskan FC, ThermoScientific, EUA). Dois ensaios independentes foram realizados em triplicata onde a CIM foi assumida como sendo a menor concentração do composto na qual não houve crescimento espectrofotometricamente detectável.

4.11. Avaliação da atividade dos peptídeos sobre leveduras patogênicas

Linhagens de *Candida albicans* ATCC 14053 e *Cryptococcus neoformans* H99, obtidas do Banco de Culturas do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília, foram cultivadas em 7 mL de caldo de infusão cérebro-coração (BHI), sob agitação, por 12 h a 37 °C. Em seguida, foram diluídas em meio BHI até atingir o valor 1.0 de densidade ótica a 590 nm. As leveduras foram diluídas no mesmo meio de cultura na proporção 1:100. Uma alíquota de 50 µL desta suspensão de levedura a 1:100 (contendo aproximadamente 2×10^3 UFCs) foi incubada a 37 °C com 50 µL de cada peptídeo ressuscitado em água MilliQ estéril, em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato). A partir de uma solução de peptídeo a 256 µM foi realizada a diluição seriada. Alíquotas de 50 µL do inóculo contendo aproximadamente 2×10^3 UFCs, mais 50 µL da solução de peptídeo foram adicionados às microplacas, ficando cada poço com volume final de 100 µL. Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e água Milli-Q estéril, ambos incubados com as suspensões das leveduras. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 37 °C, com leitura de absorbância em 595 nm após 20-24 h de incubação em leitora de placas (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA).

4.12. Construção do banco de cDNAs de precursores de PAMs expressos no tegumento do anuro *B. albopunctata*

4.12.1. Dissecação da pele

Três anfíbios da espécie *B. albopunctata* foram eutanasiados com uma injeção intracraniana - via forâmen magnum - de lidocaína, de acordo com Sebben, 2007. Com a ajuda de pinça e tesoura, isolou-se o tecido cutâneo dorsal. Os tecidos foram dissecados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C para posterior isolamento de RNA.

4.12.2. Extração de RNA total e síntese de cDNAs

Os tecidos dorsais dissecados de três animais foram macerados em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo. Aproximadamente 10 mg de cada amostra foi pulverizada e então utilizada para a extração de RNA com Trizol (Invitrogen, USA), de acordo com as normas do fabricante.

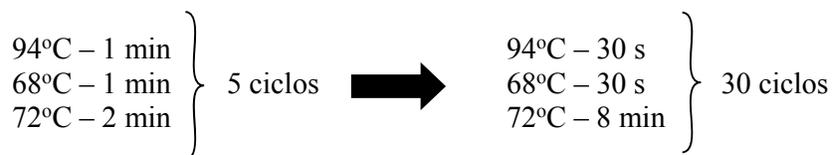
A fim de se checar a integridade do RNA extraído, a amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. O RNA total foi então quantificado em espectrofotômetro do tipo NanoDrop One (Thermo Scientific, USA) e armazenado a -80 °C.

A síntese de cDNA se deu utilizando-se 2 µL (equivalente a 0,28 µg/µL) do RNA com o emprego do kit SuperScript III (Invitrogen, Estados Unidos), segundo as normas do fabricante. O oligonucleotídeo NOT1T-15 foi utilizado nas reações de PCR para síntese de cDNAs. Os ciclos de temperatura empregados foram: 50 min a 50 °C; 5 min a 85 °C. A quantificação de cDNAs foi feita no NanoDrop One (Thermo Scientific, USA).

4.12.3. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e determinação das sequências dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos (PAMs) em *B. albopunctata*

Os cDNAs sintetizados foram usados como molde em reações com a enzima MyTaq DNA polimerase (Invitrogen, Estado Unidos), de acordo com as normas do fabricante.

Os ciclos de temperatura foram realizados em um termociclador modelo 2720 (Applied Biosystems, Estados Unidos). Após o pré-aquecimento das amostras a 94 °C por 2 min foram realizados os ciclos térmicos demonstrados a seguir:



Os oligonucleotídeos degenerados e específicos usados neste trabalho estão descritos nas Tabelas 1 e 2. Na Tabela 1 estão descritos os oligonucleotídeos que possuem como alvo a região 3' de RNAs e cDNAs. A Tabela 2 apresenta os oligonucleotídeos complementares à região codificadora dos peptídeos sinal de pré-pró-peptídeos antimicrobianos de anuros da família Hylidae. Alíquotas das reações de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para análise dos fragmentos amplificados.

O gel de agarose foi preparado com tampão TAE 1x em concentração igual a 1% (p/v). Brometo de etídeo foi adicionado em uma concentração igual a 0,5 µg/mL. As amostras

aplicadas no gel foram misturadas com o tampão para amostra 6x em uma concentração final igual a 1x e submetidas à eletroforese em tampão TAE 1x. O DNA foi visualizado com a utilização de um transiluminador de luz ultravioleta. O gel de agarose contendo os fragmentos de DNA a serem recuperados foi visualizado em um transiluminador de mão. A porção do gel contendo os fragmentos de interesse, de massa molecular entre 250 e 400 pares de base nitrogenadas (pb), foi recortada e transferida para um tubo com o auxílio de uma lâmina de bisturi nova. Os fragmentos foram então purificados com Wizard SV Gel and PCR CleanUpSystem (Promega, Estados Unidos), segundo as normas do fabricante.

Tabela 1. Oligonucleotídeos complementares à região 3' de RNAs e cDNAs.

Nome	Sequência (5'-3')	Aplicação
NOT-1-Primer	GACTAGTTCTAGATCGCGAGCGGCCGCC(T)15	Síntese de cDNA para uso em PCR convencional
NOT-1-Reverse	TCGCGAGCGGCCGCCCTTTTT	PCR

Tabela 2. Oligonucleotídeos complementares à região 5' de cDNAs que codificam peptídeos antimicrobianos em hilídeos.

Nome	Sequência
PPS1	ATG GCT TTC CTG AAR AAR TCB CTT TTY CTT GTA CTA TTC CTT GS
PPS1A	ATG GCT TTC CTG AAG AAA TCT CTT TTC CTT GTA CTA TTC CTC GG
PPS2	ATG GCT TTC CTG AAR AAR TCB CTT TTY CTT GTA TTA TTT CTC GG
PPS2A	ATG GCT TTC CTG AAG AAA TCT CTT TTC CTT GTA TTA TTT CTC GC

4.12.4. Ligação de fragmentos de DNA em vetor, transformação de bactérias e seleção das colônias de interesse

Após purificação das bandas de tamanho entre 250 e 400 pb, as amostras de DNA foram submetidas à reação de ligação em vetor utilizando pGEM-T Easy Vector System (Promega, Estados Unidos), em reações com concentração molar igual a 3:1 (inserto/vetor) e, então, inseridas em *E. coli* DH5 α por meio de choque térmico.

Uma alíquota de 50 μ L da célula competente (*E. coli* DH5 α) foi descongelada em banho de gelo e misturada com 10 μ L de DNA plasmideal. Os microtubos foram incubados em

banho-maria seco a 42 °C por 60 s e, em seguida, posicionados em gelo por pelo menos 1 minuto para que ocorresse o choque térmico e consequente inserção do plasmídeo nas bactérias. Estas foram então suspensas em 1 mL de meio SOC (Meio Super Ótimo com Repressão de Catabólitos). Em seguida, os microtubos foram incubados em banho maria seco a 37 °C, sob agitação, durante 60 min.

A seleção dos clones foi realizada em meio seletivo sólido (LB Ágar), contendo ampicilina, X-Gal e IPTG nas concentrações de 100 µg/mL, 40 µg/mL e 24 µg/mL, respectivamente, onde foram espalhados 100 µL da solução de cultura bacteriana. Após 18 h de incubação a 37°C, as colônias que apresentarem coloração branca foram selecionadas e inoculadas em placas de 96 poços contendo 900 µL de meio líquido LB com ampicilina (100 µg/mL). Os inóculos foram incubados a 37 °C com rotação horizontal igual a 300 rpm por, aproximadamente, 18 h.

4.12.5. Isolamento de DNA plasmideal

O isolamento dos plasmídeos foi realizado de acordo com o protocolo que se segue:

1. As placas, contendo as bactérias, foram retiradas do agitador, conferidas quanto à uniformidade do crescimento e submetidas à centrifugação a 4.550 g por 6 min;

2. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 240 µL de Solução I (composta por 50 mM glucose; 25 mM Tris HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0. Autoclavada por 15 minutos e mantida a 4 °C até sua utilização) em cada poço da placa. A placa foi selada com adesivo, levada ao agitador para solubilizar as células e submetida à centrifugação a 4550 g por 6 minutos;

3. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 80 µL de Solução I em cada poço. A placa foi selada com adesivo e levada ao agitador;

4. Alíquotas de 60 µL da suspensão de células foram transferidas para uma placa com fundo em U contendo 2,5 µL de RNase (10 mg/mL) em cada poço, nos quais foram adicionados 60 µL da Solução II (composta por NaOH 0,2 N e SDS 1% p/v);

5. A placa foi selada, agitada gentilmente e deixada à temperatura ambiente por 7 minutos;

6. Foram adicionados 60 µL de Solução III (composta por 60 mL de acetato de potássio 5 M; 11,5 mL de ácido acético glacial e 28,5 mL de água. Estocar a 4 °C) em cada poço da placa a qual foi selada, agitada gentilmente e deixada à temperatura ambiente por 7 minutos;

7. A placa foi submetida à centrifugação por 6 min e, após a remoção do adesivo,

colocada em uma estufa a 90 °C por 30 min;

8. Após retirar a placa da estufa, esta foi resfriada em gelo por 10 min, selada com adesivo e submetida à centrifugação por 4 minutos a 4.550 g a 20 °C;

9. A solução presente na placa foi transferida para uma placa filtro de fundo V a qual foi submetida à centrifugação por 5,5 min a 4.550 g a 20 °C.

10. A placa filtro foi removida e foram adicionados 90 µL de isopropanol 100% em cada poço da placa;

11. A placa foi selada, agitada gentilmente e submetida à centrifugação por 45 min a 4.550 g a 20 °C;

12. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 µL de etanol 70%. A placa foi então, submetida à centrifugação por 5 min a 4.550 g a 20 °C;

13. O sobrenadante foi descartado e a placa, invertida sobre papel toalha, foi submetida à centrifugação por 3 min a 300 g a 20 °C;

14. A placa foi colocada em estufa a 37 °C por 15 min;

15. O precipitado foi solubilizado em 40 µL de água Milli-Q.

4.12.6. Sequenciamento automático de nucleotídeos

Amostras de DNA plasmideal foram sequenciadas pela empresa Myleus Biotechnology (Brasil) através do método Sanger utilizando o primer Forward M13, cuja sequência é TGT AAA ACG ACG GCC AGT (5' – 3').

4.12.7. Análises das sequências nucleotídicas e peptídicas

As análises das sequências de nucleotídeos obtidas foram realizadas utilizando os programas EditSeq e SeqMan (DNASTAR, Estados Unidos). Os alinhamentos das sequências obtidas foram feitos utilizando o programa Clustal W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). A busca por similaridades foi realizada usando o programa FASTA 3 no ExPASy Molecular Server (<http://ca.expasy.org/>).

5. RESULTADOS

5.1. Fracionamento da secreção bruta de *B. albopunctata* por cromatografia líquida de alta eficiência e purificação de um PAM inédito

A secreção bruta liofilizada de *B. albopunctata* foi fracionada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), utilizando-se uma coluna C₁₈ (Vydac 218TP54, 4.6 ID x 250 mm, 5 μ), empregando-se gradiente linear de acetonitrila e detecção ao ultravioleta em 216 nm. Uma corrida cromatográfica típica do fracionamento da secreção bruta de *B. albopunctata* resultou na eluição e coletada de 28 frações cromatográficas (Figura 8).

As frações cromatográficas foram submetidas a ensaio de varredura (*screening*) para detecção das frações capazes de inibir o crescimento das bactérias Gram-positivas *S. aureus* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. As frações com atividade inibitória, indicadas em vermelho na Figura 8, foram submetidas a análises por espectrometria de massas do tipo MALDI TOF/MS (Autoflex II, Bruker, Alemanha).

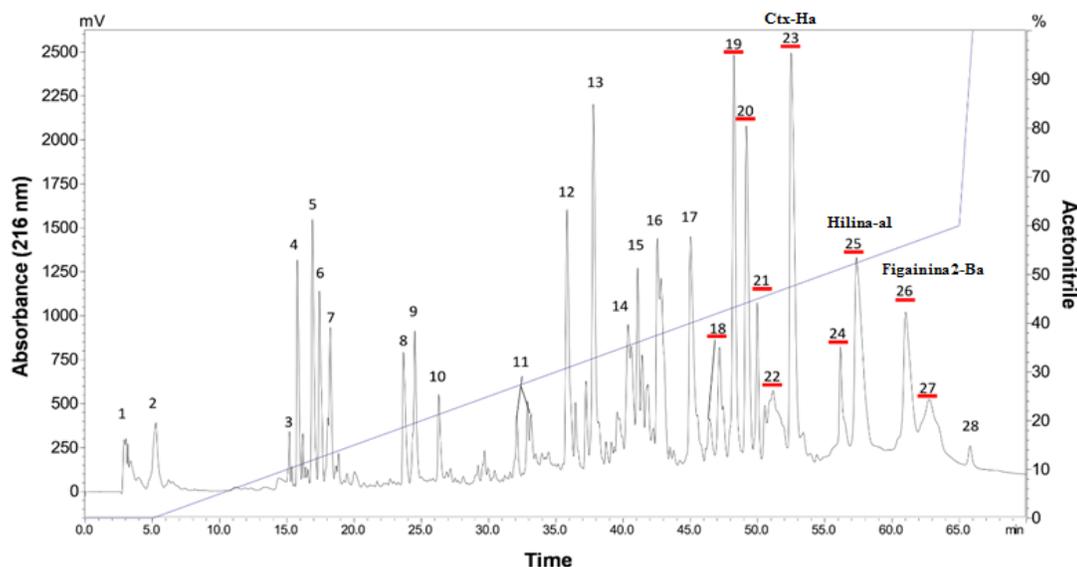


Figura 8. Perfil cromatográfico típico resultante do fracionamento da secreção cutânea de *B. albopunctata* em coluna C₁₈ (Vydac 218TP54, 4.6 ID x 250 mm, 5 μ) em sistema HPLC com fluxo de 1 mL/min e detecção ao ultravioleta em 216 nm. As frações que apresentaram atividade antibacteriana estão indicadas em vermelho.

A análise da fração 23 por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF (Figura 9) revelou a presença de um peptídeo com massa molecular monoisotópica igual a 2287,8 Da. O peptídeo previamente isolado de *B. albopunctata* que apresenta essa mesma massa molecular

corresponde ao PAM Ctx-Ha (Cespedes *et al.*, 2012). O PAM Ctx-Ha tem uma estrutura primária semelhante (75% de similaridade) ao do peptídeo antimicrobiano Ceratotoxina B isolado da mosca *Ceratitis capitata*. Além disso, seu modo de ação também se baseia na formação de poros em membranas de microrganismos (Cespedes *et al.*, 2012).

A fração 25 (Figura 10) corresponde a um peptídeo antimicrobiano também isolado da pele do anuro *B. albopunctata* chamado Hilina-a1, com massa de 1862,7 Da. Este PAM foi o primeiro peptídeo citolítico a ser isolado desta espécie de anuro, apresentando 18 resíduos de aminoácidos. Sua atividade antimicrobiana é de amplo espectro, atingindo bactérias Grampositivas, Gram-negativas e fungos, mas apresenta atividade hemolítica relevante sobre eritrócitos humanos (Castro *et al.*, 2009).

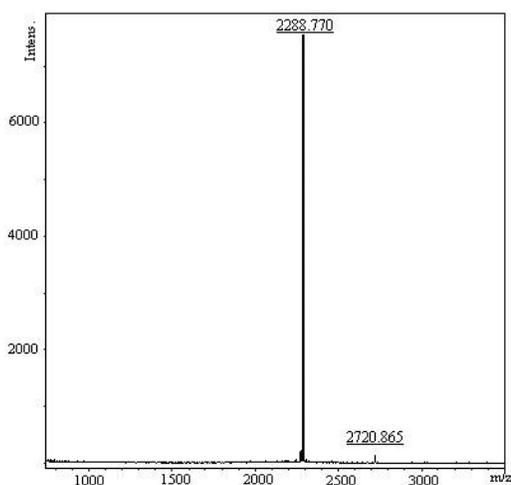


Figura 9. Espectro de massas da fração 23 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). Esse peptídeo corresponde ao PAM Ctx-Ha.

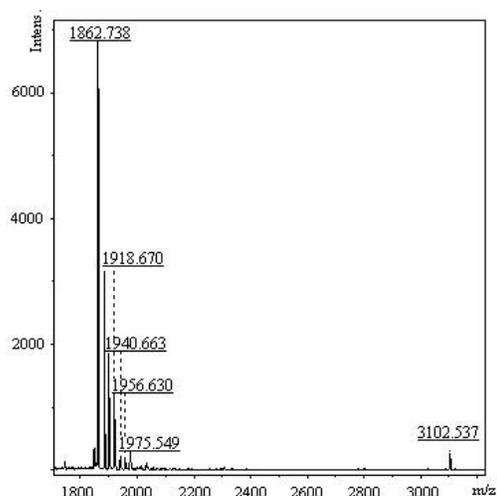


Figura 10. Espectro de massas da fração 25 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). Esse peptídeo corresponde ao PAM Hilina-a1.

Um peptídeo antimicrobiano inédito foi isolado a partir da fração 26. Tal peptídeo apresenta massa molecular monoisotópica igual a 2981,8 Da (Figura 11) e eluiu no tempo de retenção de 62,9 min (Figura 8). A estrutura primária deste peptídeo foi determinada por degradação de Edman e apresenta uma cadeia polipeptídica composta por 28 resíduos de aminoácidos: $^1\text{FLGAILRIGQALAKTVIPLVTNALHPKQ}^{28}$. A projeção em α -hélice para esse peptídeo está apresentada na Figura 12 evidenciando o caráter anfipático dessa molécula.

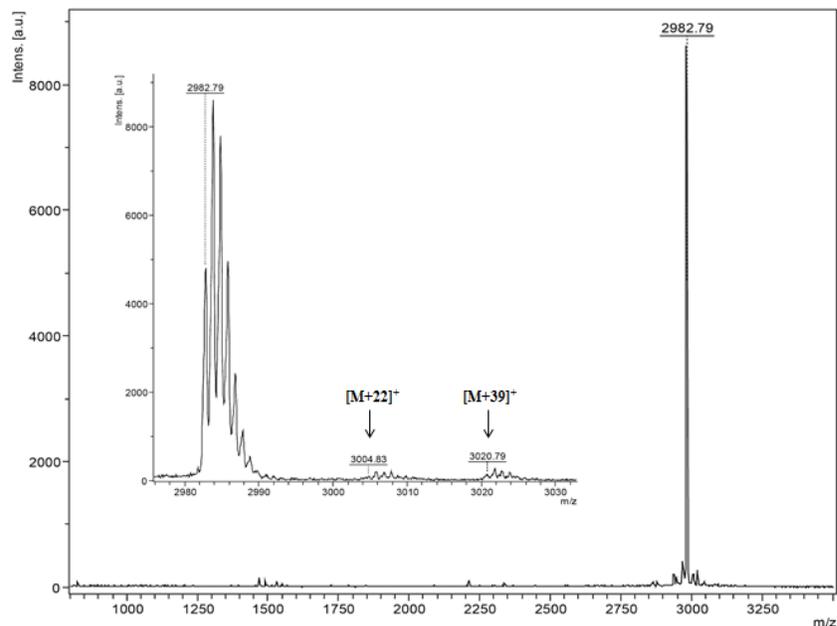


Figura 11. Espectro de massas da fração 26 obtido em modo positivo (com emprego de refletor) com uso de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). O inserto mostra a presença de adutos com os íons sódio e potássio.

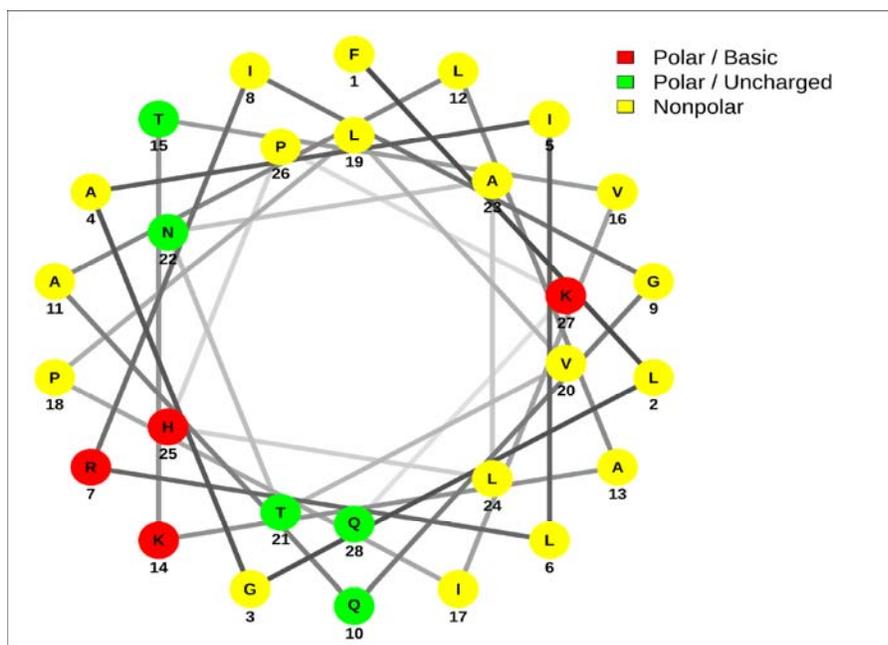


Figura 12. Projeção em roda helicoidal do peptídeo isolado a partir da fração 26.

O peptídeo isolado da fração 26 apresentou grande similaridade estrutural com o peptídeo Figainina 2, identificado a partir da secreção de um anuro do mesmo gênero,

Boana raniceps (Barbosa, 2010), a Figainina 2. Sendo assim, o novo peptídeo isolado foi denominado Figainina 2-Ba (Figura 13). A Figainina 2-Ba exibiu índices de similaridade e de identidade de 85% e 79%, respectivamente, com a Figainina 2 de *B. raniceps*.

```

Figainina 2-Ba      1 FLGAILRIGQALAKTVIPLVTNALHPKQ      28
                    |||||:| |||||:|:| |||
Figainina 2       1 FLGAILKIGHALAKTVLPMVTNAFKPKQ      28

```

Figura 13. Alinhamento das sequências do peptídeo presente na fração 26 (denominado Figainina 2-Ba) de *B. albopunctata* com a do peptídeo Figainina 2 isolado de *B. raniceps*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10.0; Extend penalty: 0.5.

Quando comparado ao peptídeo Hilina-a1, a similaridade é bem menor (Castro *et al.*, 2009) (Figura 14).

```

Figainina 2-Ba      1 FLGAILRIGQALAKTVIPLVTNALHPKQ      28
                    ||| | : | : |
Hilina-a1         1 IFGAILPLALGALKNLIK-----      18

```

Figura 14. Alinhamento das sequências do peptídeo presente na fração 26 (denominado Figainina 2-Ba) de *B. albopunctata* com a do peptídeo Hilina-a1 também isolado de *B. albopunctata*. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10.0; Extend penalty: 0.5.

5.2. Caracterização da atividade antimicrobiana dos peptídeos

Foram realizados ensaios de microdiluição seriada em meio líquido para avaliação dos efeitos antimicrobianos do PAM Figainina 2-Ba, isolado no presente estudo a partir da secreção cutânea de *B. albopunctata* e de 5 análogos do PAM Ctx-Ha, previamente isolado dessa mesma secreção biológica. As sequências dos análogos do PAM Ctx-Ha não serão divulgadas por questões de proteção da propriedade intelectual.

O PAM Figainina 2-Ba foi testado contra linhagens resistentes de *S. aureus* e *E. coli*, ambas isolados clínicos veterinários, e apresentou valores de CIM de 8 µM, para ambas as bactérias (Tabela 3). Quando testado contra as bactérias susceptíveis *Enterococcus hormaechei* ATCC 700323, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922 os valores de CIM foram iguais a 32, 32, 16 e 8 µM, respectivamente (Tabela 4).

O análogo Ctx-Ha-A3 apresentou uma atividade considerável contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas empregadas, com valores de CIM entre <1 e 8 µM (Tabelas 3 e 4). Ainda assim, o peptídeo antimicrobiano selvagem Ctx-Ha obteve valores menores do que 1 µM contra a maioria das bactérias testadas, o que já era esperado devido ao seu grande poder citolítico (Cespedes *et al.*, 2012).

Os peptídeos Figainina 2-Ba, Ctx-Ha e Ctx-Ha-A1, -A2 e -A3 apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. neoformans*, com valores de CIM entre 16 e 4 µM (Tabela 5).

Tabela 3. Avaliação dos efeitos antimicrobianos (CIM, µM) dos peptídeos antimicrobianos Figainina 2-Ba e Ctx-Ha e de seus análogos sobre as bactérias resistentes Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa *Escherichia coli* de isolados clínicos de interesse veterinário.

Peptídeo	<i>S. aureus</i> 004# Isolado	<i>E. coli</i> 11# Isolado
Figainna 2-Ba	8	8
Ctx-Ha	2	2
Ctx-Ha-A1	S.A.	128
Ctx-Ha-A2	S.A.	64
Ctx-Ha-A3	2	2
Ctx-Ha-A4	S.A.	S.A.
Ctx-Ha-A5	S.A	S.A

Isolados clínicos.

S.A. – sem atividade detectável mesmo na maior concentração empregada (128 µM).

Tabela 4. Avaliação dos efeitos antimicrobianos (CIM, μM) dos peptídeos antimicrobianos Figainina 2-Ba e Ctx-Ha e de seus análogos sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas susceptíveis de interesse médico.

Peptídeo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	ATCC 25923	ATCC 25922	ATCC 29212	ATCC 27853	ATCC 700323	ATCC 12228	ATCC 13883
Figainina 2-Ba	16	8	-	-	32	32	-
Ctx-Ha	<1	<1	<1	<1	4	2	4
Ctx-Ha-A1	64	8	S.A.	64	32	64	64
Ctx-Ha-A2	64	4	S.A.	64	16	8	8
Ctx-Ha-A3	4	2	8	2	<1	<1	2
Ctx-Ha-A4	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.
Ctx-Ha-A5	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.

S.A. – sem atividade detectável mesmo na maior concentração empregada (128 μM).

Tabela 5. Avaliação dos efeitos antimicrobianos (CIM, μM) dos peptídeos antimicrobianos Figainina 2-Ba e Ctx-Ha e de seus análogos sobre as leveduras de interesse médico *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

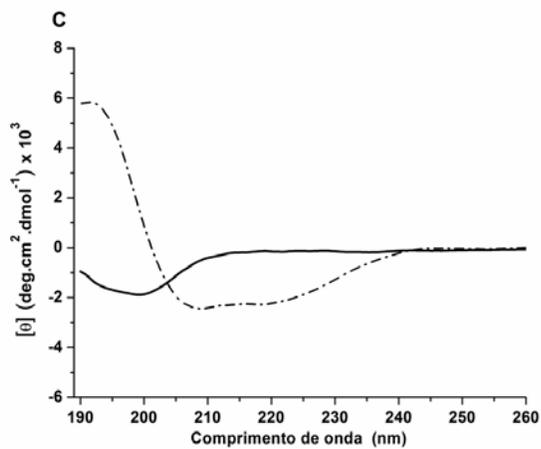
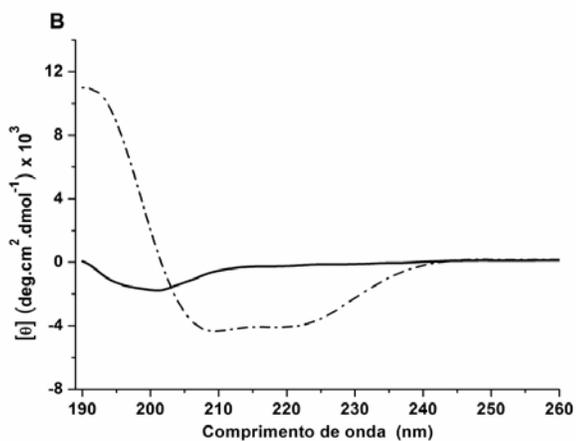
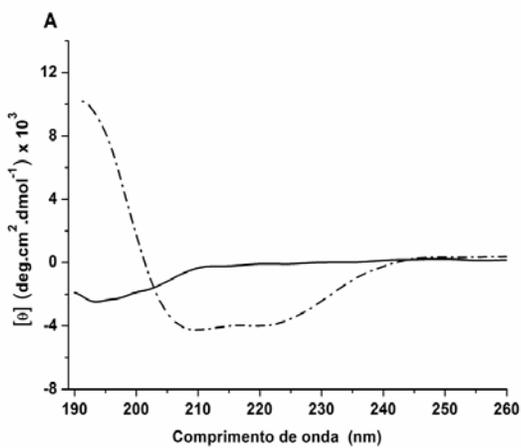
Peptídeo	<i>C. albicans</i> ATCC 14053	<i>Cryptococcus. neoformans</i> H99
Figainina 2-Ba	16	8
Ctx-Ha	16	4
Ctx-Ha-A1	32	S.A.
Ctx-Ha-A2	16	16
Ctx-Ha-A3	8	8
Ctx-Ha-A4	S.A.	S.A.
Ctx-Ha-A5	S.A.	S.A.

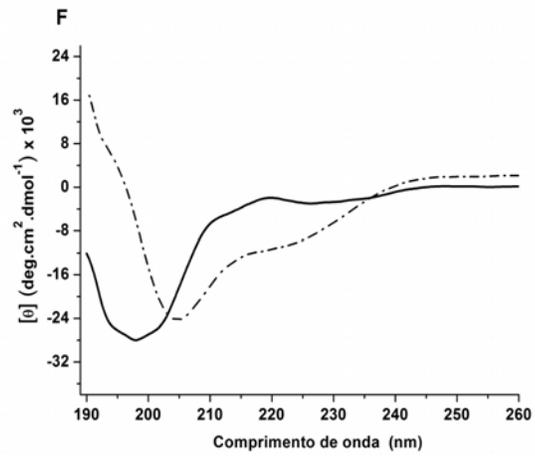
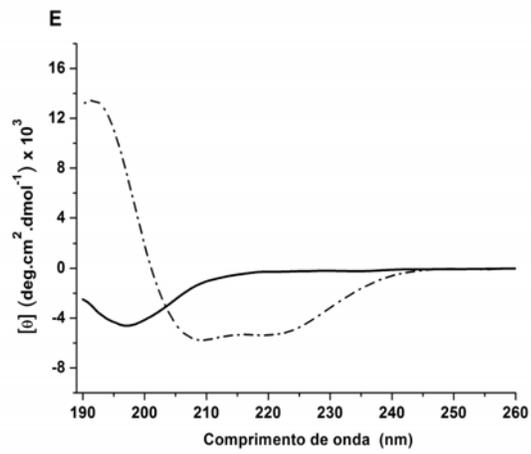
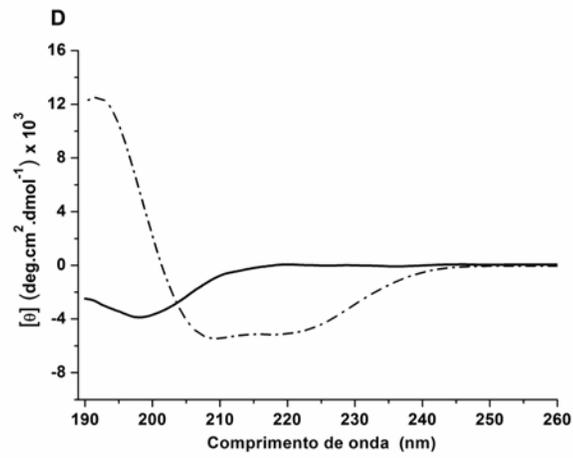
S.A. – sem atividade detectável mesmo na maior concentração empregada (128 μM).

5.3. Caracterização estrutural dos peptídeos por dicroísmo circular (DC)

Os espectros dicroicos obtidos em água a 25°C mostram as características típicas de peptídeos com estrutura desordenada para todos os peptídeos avaliados (Figura 15A-G). Na presença de água, essas moléculas normalmente se apresentam com forma randômica. Entretanto, quando submetidos à presença de surfactantes como SDS, os peptídeos tendem a apresentar mudanças conformacionais, assumindo diferentes conteúdos de estrutura secundária (Krittanai e Johnson, 2000). Os resultados obtidos na presença de SDS mostram deslocamento da banda de 200 nm, formando uma banda negativa dicroica com sinal em 208 e 222 nm. Esta banda dicroica foi formada para todos os peptídeos estudados, exceto para o análogo 4 do

PAM Ctx-Ha (Figura 15F), que apresentou uma banda centrada somente em 208 nm. O percentual de α -hélice foi determinado e está apresentado na tabela 6.





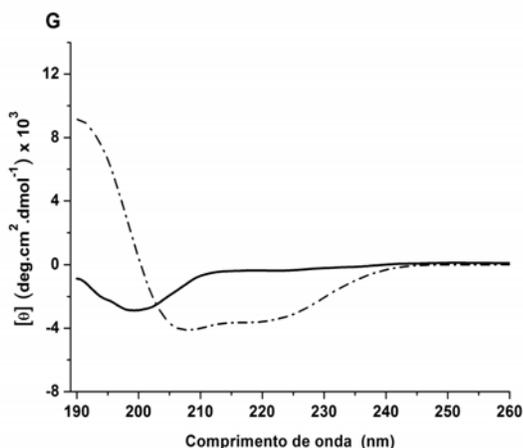


Figura 15. Espectros dicróicos na região do ultravioleta distante dos peptídeos em água (linha sólida) e SDS (35 mM) (linha tracejada). (A) Figainina 2-Ba; (B) Ctx-Ha; (C) Ctx-Ha-A1; (D) Ctx-Ha-A2; (E) Ctx-Ha-A3; (F) Ctx-Ha-A4 e (G) Ctx-Ha-A5.

A helicidade dos peptídeos foi calculada considerando o valor obtido de elipticidade molar a 208 nm em água e na presença de SDS (35 mM) (Tabela 6).

Tabela 6. Estimativa do conteúdo em α -hélice (%) dos peptídeos em água e em SDS 35 mM.

Amostra	α -hélice (%)	
	Água	SDS
Figainina 2-Ba	12,48	22,05
Ctx- Ha	12,93	22,32
Ctx-Ha-A1	12,50	17,36
Ctx-Ha-A2	14,35	25,25
Ctx-Ha-A3	14,85	26,16
Ctx-Ha-A4	13,55	16,51
Ctx-Ha-A5	13,86	21,91

5.4. Determinação da integridade de RNAs e construção de banco de cDNAs que codificam peptídeos antimicrobianos

Aproximadamente 10 mg dos tecidos pulverizados foram submetidos ao isolamento de RNA total, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), cuja integridade foi analisada utilizando um gel de agarose a 1% (Figura 16).

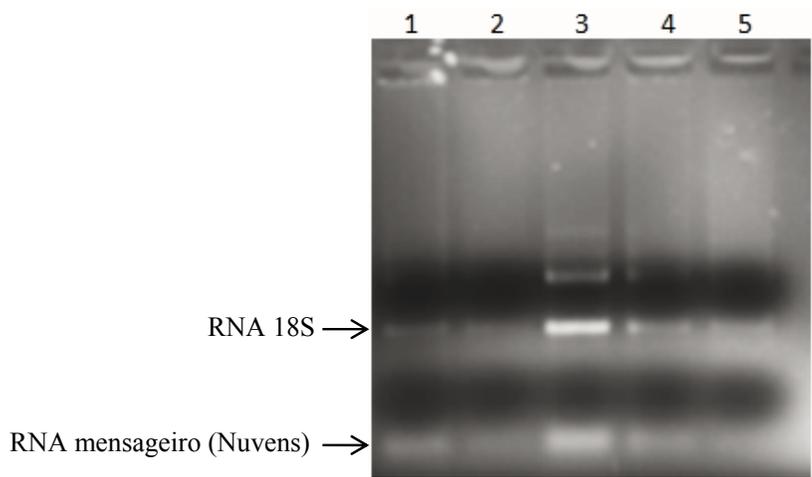


Figura 16. Gel de agarose a 1% para verificação da integridade do RNA total isolado a partir dos tecidos cutâneos de *B. albopunctata* em poços 1, 2, 3, 4 e 5.

Após a síntese de cDNAs, realizada a partir do RNA total extraído, os quatro conjuntos de *primers*, sintetizados com base na sequência de aminoácidos que compõe a região de peptídeo sinal de RNAs que codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios, foram utilizados em reações de PCR. A partir de análises dos produtos da PCR, feitas em gel de agarose a 1% (Figura 17), os fragmentos amplificados que apresentaram entre 250 e 400 pb (pares de base) foram isolados e purificados para clonagem em vetor pGEM-Teasy (Figura 18).

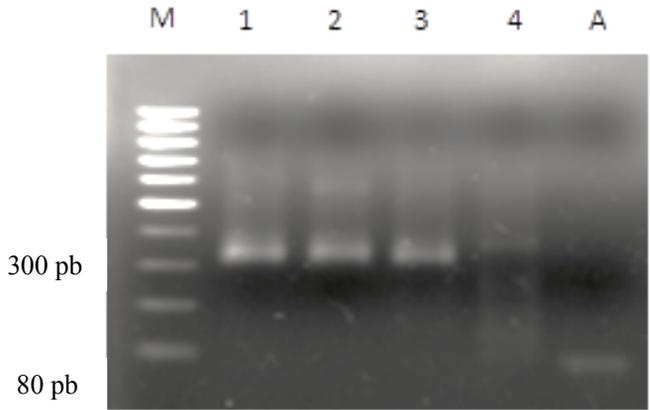


Figura 17. Análise em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR obtidos a partir do cDNA de *B. albopunctata* utilizando os oligonucleotídeos (1) PPS-1, (2) PPS-1A, (3) PPS-2 e (4) PPS-2A. (M) Marcador de massa molecular 100bp, (A) Actina específica para Hilídeos.

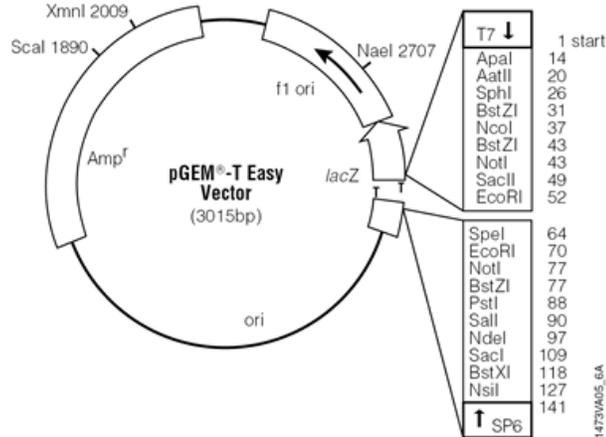


Figura 18. Vetor pGEM-T-Easy e visualização dos sítios das enzimas de restrição (PROMEGA, 2018).

5.5. Sequências peptídicas derivadas de cDNAs isolados da pele de *B. albopunctata*

A tradução *in silico* dos nucleotídeos dos 60 clones sequenciados permitiu a determinação da sequência peptídica de catorze precursores distintos (Tabela 7). Os outros clones não demonstraram estruturas peptídicas de interesse. Um dos 60 clones sequenciados corresponde ao peptídeo já identificado nesta espécie: Hilina-a1. A Figura 19 apresenta uma das sequências caracterizadas, com as três regiões comuns aos pré-pró-peptídeos antimicrobianos de anfíbios assinalados (peptídeo sinal, região acídica e peptídeo funcional).

Tabela 7. Sequências peptídicas codificadas pelos cDNAs isolados da pele do anuro *B. albopunctata*. Em negrito e sublinhado, a sequência do peptídeo maduro. Cada sequência foi identificada como B.albo_cX, onde X se refere à sua ordem de apresentação na tabela.

Ordem	Sequência peptídica	Massa molecular monoisotópica*	Similaridade (%)
1	<u>IFGAILPLALGALKNLIK</u>	1864,2146	Hilina-a1 (94%)
2	<u>IFGAILPLALGALKNLTKG</u>	1853,1622	Hilina-a1 (88.89%)
3	<u>LFGAVLPLALGALKNLLKG</u>	1851,1830	Hilina-a1 (82.35%)
4	<u>IFGAVLPLALGTLKNLLKG</u>	1881,1935	Hilina-a1 (77,78%)
5	<u>IFGAVRPLALGALKNLLKG</u>	1894,2000	Hilina-a1 (83.3%)
6	<u>QIGKVAGRVALGVAQDYLNPKQ</u>	2325,3037	Raniseptina (75%)
7	<u>IIGPLLHTITGLLGRFLVVLGVDKM</u>	2676,6122	-
8	<u>IIGPLLHTTTGLLGSVLGGLGR</u>	2146,2832	-
9	<u>IIGPLLHTITGLLGSVLGGLGR</u>	2158,3196	-
10	<u>EAEODLSELLNIFHHQA</u>	2108,0532	-
11	<u>EAEEDLSELLNIFHHQA</u>	2109,0373	-
12	<u>EAEODLFEFFNIFPHQV</u>	2258,0678	-
13	<u>EAEODLFEIFNIFHHQG</u>	2130,0290	-
14	<u>EAEEDLSELLNIFHHQA</u>	2109,0373	-

*A massa molecular teórica monoisotópica foi calculada para os peptídeos maduros usando Compass Isotope Pattern.

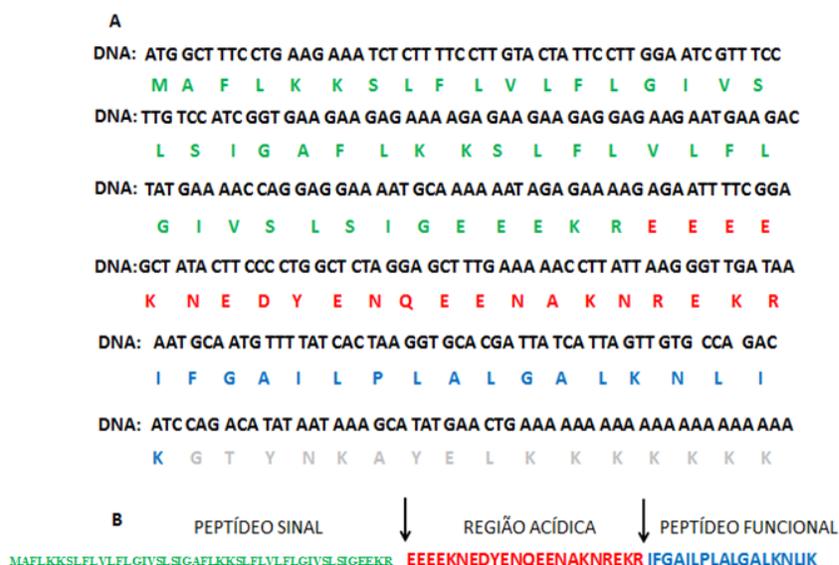


Figura 19. Sequência nucleotídica de um cDNA que codifica um pré-pró-peptídeo antimicrobiano obtido a partir do tecido cutâneo de *B. albopunctata*. (A) Tradução *in silico* e (B) oligopeptídeo traduzido. As setas indicam os sítios de clivagem para processamento do peptídeo.

As sequências nucleotídicas que codificam os pré-pró-peptídeos identificados foram submetidas a uma busca por similaridade, realizada no banco de dados NCBI Blast, o que permitiu concluir serem sequências inéditas.

Os pré-pró-peptídeos antimicrobianos caracterizados foram clivados *in silico* com o objetivo de determinar a estrutura primária dos peptídeos maduros. Estes são armazenados nas glândulas granulosas após o processamento pós-traducional. Assim, foram determinadas as sequências primárias e calculadas as massas monoisotópicas teóricas dos peptídeos maduros (Tabela 7)

Com relação aos cDNAs identificados a partir dos RNAs isolados do tegumento de *B. albopunctata*, a sequência do peptídeo antimicrobiano Hilina-a1 alinhou-se completamente com a sequência referente ao cDNA B.albo_c1 (Tabela 7). Já na comparação entre a fração do novo peptídeo identificado, Figainina 2-Ba, com as sequências isoladas de cDNA não foram observadas similaridades relevantes. A maior similaridade foi com a sequência proveniente do cDNA B.albo_c6 (Figura 20).

O precursor equivalente ao peptídeo antimicrobiano Ctx-Ha não foi encontrado no banco de cDNAs obtido.

Figainina 2-Ba	1	FLGAILRIGQALAKTVIPLVTNALHPKQ	28
		: : : : : : :	
B.albo_c6	1	-----QIGKVAGRVALGVAQDYLNPKQ	22

Figura 20. Alinhamento das sequências do peptídeo presente na fração 26 (denominado Figainina 2-Ba) de *B. albopunctata* com a do peptídeo derivado do clone B.albo_c6. Os símbolos: (|) indica resíduos idênticos e (:) indica substituições conservativas. Pairwise Sequence Alignment: EMBOSS Needle; Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10.0; Extend penalty: 0.5.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi possível o isolamento e a caracterização de um peptídeo antimicrobiano inédito presente na secreção cutânea de *B. albopunctata*. Esse novo PAM mostrou-se semelhante ao PAM Figainina 2 identificado na pele de outro anuro, *B. raniceps*, a partir de um banco de cDNA produzido para essa espécie (Barbosa, 2010). Esse novo PAM foi nomeado Figainina 2-Ba.

Em uma segunda etapa, foi feita a caracterização das propriedades antimicrobianas do PAM Figainina 2-Ba. Aliada à caracterização biológica desse novo PAM de *B. albopunctata*, também foi feita a avaliação dos efeitos inibitórios do PAM Ceratoxina-Ha (Ctx-Ha), previamente isolada dessa mesma secreção (Cespedes *et al.*, 2012) e de cinco análogos derivados desse PAM.

Sete bactérias de interesse médico, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. hormaechei*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli*, e duas leveduras, *C. albicans* e *C. neoformans* foram empregados no presente estudo, além de 2 isolados clínicos de interesse veterinário. Os resultados demonstram que o novo peptídeo Figainina 2-Ba, o PAM Ctx-Ha e seus análogos Ctx-Ha-A1, Ctx-Ha-A2 e Ctx-Ha-A3 possuem atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento das bactérias e leveduras testadas. Os dados citados corroboram com os dados obtidos por Cespedes e colaboradores (2012), os quais demonstram que o peptídeo Ctx-Ha, oriundo de *B. albopunctata*, apresentou notáveis atividades antimicrobiana e antifúngica.

Os análogos Ctx-Ha-A4 e Ctx-Ha-A5 não apresentaram atividade antimicrobiana. Peptídeos são orientados até a membrana citoplasmática devido à sua elevada hidrofobicidade. Esta característica, juntamente com a formação de α -hélices, é determinante na modulação da atividade antimicrobiana (Brand *et al.* 2018; Cespedes, *et al.*, 2012). Este dado explicaria o fato dos análogos Ctx-Ha-A4 e Ctx-Ha-A5 não terem apresentado atividade antimicrobiana, uma vez que o percentual de hidrofobicidade destas moléculas é menor que 50%, para ambas.

Quando testados contra as duas bactérias de interesse médico veterinário, *S. aureus* isolado de mastite bovina e *E. coli* isolada de trato urinário de cães com cistite, tanto o novo peptídeo caracterizado quanto o PAM Ctx-Ha e seu análogo Ctx-Ha-A3 tiveram ação com valores de CIM $\leq 8 \mu\text{M}$. Mohamed e colaboradores (2016) demonstraram a capacidade de dois peptídeos antimicrobianos, WR12 e D-IK8, em erradicar infecções persistentes causadas por *S. aureus* resistente à metilina e também eliminar este patógeno intracelularmente em queratinócitos. Barreras-Serrano e colaboradores (2016) também publicaram resultados

promissores com o peptídeo antimicrobiano K9CATH, o qual demonstrou capacidade em diminuir a infecção por *S. aureus* em glândulas mamárias de murinos com mastite. Isso confirma o potencial farmacológico de PAMs na medicina veterinária, principalmente em tratamentos refratários como a mastite bovina e doenças do trato urinário em cães.

A recorrência de doenças de trato urinário em cães e gatos é bastante comum na rotina clínica, uma vez que cultura bacteriana e testes de susceptibilidade dificilmente são realizados para uma melhor escolha de tratamento. O cloranfenicol é um antibiótico de largo espectro utilizado em infecções urinárias multirresistentes. Este medicamento, quando usado em longo prazo, pode causar mielosupressão em cães e gatos (Weese *et al.*, 2011). Dentre as classes de antimicrobianos, os betalactâmicos são utilizados frequentemente no tratamento das infecções estafilocócicas em bovinos, sendo as penicilinas a classe mais utilizada na Medicina Veterinária (Moritz e Moritz, 2016). Andrade (2012) observou um índice de resistência à penicilina superior a 70% nas cepas de *S. aureus* isoladas de mastite subclínica bovina no Distrito Federal e entorno. Estes dados ressaltam a importância de um manejo correto associado à escolha adequada de um antimicrobiano eficaz para o tratamento de mastite, evitando a possibilidade de resistência microbiana no rebanho, o qual pode se tornar um risco a saúde humana e animal (Moritz e Moritz, 2016).

Apesar das diversas vantagens dos peptídeos antimicrobianos, como a não indução de resistência bacteriana, ainda há limitações em seu uso terapêutico, principalmente em relação à sua citotoxicidade. Para que um peptídeo seja de interesse farmacêutico, este deve ter alto poder antimicrobiano e baixa atividade hemolítica. Uma das estratégias para conseguir essas características é sintetizar análogos dessa moléculas (Dathe e Wieprecht, 1999). Neste sentido, o peptídeo Ctx-Ha-A3 se mostrou um forte candidato devido aos baixos valores de CIM contra bactérias derivadas de patologias veterinárias. Esses dados estimulam a continuação deste estudo a fim de consolidar mecanismo de ação deste PAM e seu uso na clínica.

A metodologia de clonagem de cDNAs utilizada neste trabalho mostrou-se efetiva com o sequenciamento de 14 transcritos que codificam pré-pró-peptídeos antimicrobianos em *B. albopunctata*. Estes foram segregados de acordo com a similaridade entre eles, após a tradução *in silico* (Tabela 7).

A expressão de peptídeos antimicrobianos pode ser regulada de maneira distinta entre indivíduos a depender de sexo, presença de patologias ou o seu microambiente. A análise de RNAm (RNA mensageiro) por intermédio da secreção ou da pele de anfíbios complementa a

proteômica e permite a identificação de novos peptídeos antimicrobianos. Além disso, pode ajudar a entender a regulação transcricional de PAMs e como o ambiente pode afetar essa expressão (Robertson *et al.*, 2013).

Trabalhos demonstram que existe a possibilidade de clonar cDNAs a partir da secreção ao invés de retirar a pele do animal, uma metodologia que evitaria o sacrifício do indivíduo estudado (Chen *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2013). Porém, não se sabe ao certo o quão representativo é o conjunto de RNAs que está presente na secreção. Este RNAm se origina nas células das glândulas granulosas do animal e o momento exato em que essas células se rompem a fim de liberar seu conteúdo para um futuro estoque na glândula ainda não foi definido. Dessa forma, não é possível saber se houve ou não alguma repressão de expressão gênica neste momento, o que mudaria a representação de RNAs na secreção. Devido a essa incerteza, a utilização da pele do animal continua sendo a melhor fonte para entender a expressão gênica da secreção de anfíbios.

As sequências dos peptídeos apresentaram alta similaridade nas regiões sinal e acídica, enquanto que a região do peptídeo maduro apresentou variabilidade, demonstrando uma grande diversidade na expressão gênica. Apesar das sequências nucleotídicas referentes aos peptídeos Ctx-Ha e Figainina 2-Ba não terem sido isoladas, isso não significa que o precursor destes PAMs não se encontram na pele do anuro estudado. Modificações pós-traducionais, erros durante o sequenciamento ou, até mesmo, a não clonagem deste cDNAs durante o experimento poderia explicar tal fenômeno.

7. CONCLUSÕES

- ✓ O presente estudo possibilitou um maior conhecimento a respeito da diversidade de PAMs provenientes do anfíbio *Boana albopunctata*.
- ✓ O novo peptídeo isolado, Figainina 2-Ba, exibiu atividade antimicrobiana de largo espectro, inclusive sobre microrganismos isolados de patologias veterinárias.
- ✓ O análogo Ctx-Ha-A3 demonstrou boas atividades antimicrobianas e antifúngicas, inclusive contra *S. aureus* isolado de mastite bovina.
- ✓ A construção de um banco de cDNAs a partir do tegumento do anuro *B. albopunctata* permitiu a identificação de 14 precursores de PAMs, incluindo a do PAM Hilina-a1, previamente isolado dessa secreção cutânea.

8. PERSPECTIVAS

A fim de caracterizar os transcritos identificados neste trabalho, recomenda-se a síntese química dos respectivos peptídeos e a realização de ensaios biológicos, de modo a determinar suas propriedades.

Novos ensaios contra bactérias e fungos devem ser feitos para determinar a ação do novo peptídeo Figainina 2-Ba.

Os resultados expostos neste trabalho sugerem que o peptídeo Ctx-Ha-A3 é um forte candidato para o desenvolvimento de medicação intramamária no tratamento de mastite bovina. A fim de alcançar esse objetivo, novos ensaios *in vitro* são necessários para determinar seu modo de ação e sua atividade sobre células epiteliais mamárias (MAC-T) e queratinócitos e posteriormente *in vivo*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, ESF, Junior, EC, Cilli, EM, Castro, MS, Fontes, W, De Magalhães, *et al.* Micelle bound structure and model membrane interaction studies of the peptide hylin a 1 from the arboreal south american frog *Hypsiboas albopunctatus*. Protein and Peptide Letters, 2015; 22:719-726.

Andrade, HH. Genotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites subclínicas bovina no Distrito Federal e entorno. 2012. 60 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Universidade de Brasília.

Anunthawan, T, Fuente-Núñez, CDL, Hancock, REW, Klaynonsruang, S. Cationic amphipatic peptides KT2 and RT2 are taken up into bacterial cells and kill planktonic and biofilm bacteria. Biochimica et Biophysica Acta, 2015; 1848:1352-1358.

Argudín, MA, Deplano, A, Meghraoui, A, Dodémont, M, Heinrichs, A, Denis, O, *et al.* Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. Antibiotics, 2017; 6(12):1-38.

Azevedo, CL, Silva, AA, Ciancaglini, P, Stábeli, RG. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. Amino Acids, 2011; 40(1):29-49.

Bachem pioneering partner for peptides. Veterinary peptides. Global Marketing, 2016; 1-28.

Bahar, AA, Ren, D. Antimicrobial peptides. Pharmaceuticals (Basel). 2013; 6(12):1543-1575.

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

Bardiau, M, Caplin, J, Detilleux, J, Graber, H, Moroni, P, Taminau, B, *et al.* Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and *agr*-typing. Veterinary Microbiology, 2016; 1-21.

Barra, D, Simmaco, M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. Trends in Biotechnology, 1995; 13(6):205-209.

Barreras, S, Tamayo, S, Villar, P, Castellanos, F, López, V, Tinoco, G, *et al.* Evaluation of antimicrobial peptide K9CATH in a murine model of mastitis. *Thai J Vet Med.* 2017; 47(2):279-284.

Barriere, LS. Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2015; 16(2):151-153.

Bechinger, B, Gorr, SU. *Critical reviews in oral biology and medicine.* 2017; 96 (3):254-260.

Bevins, CL, Zasloff, M. Peptides from frog skin. *Rev. Biochem*, 1990; 59:395-414.

Brand, GD, Ramada, MHS, Genaro, MTC, Bloc, JRC. Towards an experimental classification system for membrane active peptides. *Scientific Reports.* 2018; 8:1194:1-10.

Brandão, RA, & Araújo, AFB. 2001. A herpetofauna associada às matas de galeria no Distrito Federal. pp. 561–604 in Ribeiro, J. F., Fonseca, C. E. L., Sousa-Silva, J. C. (eds.), *Cerrado: Caracterização e Recuperação de Matas de Galeria.* Planaltina. Embrapa Cerrados.

Brogden, KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 2005; 3:238-250.

Cao, J, Zhang, Y, Shan, Y, Wang, J, Liu, F, Liu, H, *et al.* A pH-dependent antibacterial peptide release nano-system blocks tumor growth *in vivo* without toxicity. *Scientific Reports*, 2017; 7:11242:1-13.

Carvalho, AC, Márquez, CA, Azevedo, RB, Joanitti, GA, Pires, ORJ, Fontes, W. Cytotoxic activity and antiproliferative effects of crude skin secretion from *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) on *in vitro* melanoma cells. *Toxins*, 2015; 7(10):3989-4005.

Carvalho, VM, Spinola, T, Tavorari, F, Irino, K, Oliveira, RM, Raos, MCC. Infecções do trato urinário (ITU) de cães e gatos: etiologia e resistência aos antimicrobianos. *Peq. Vet. Bras.*, 2014; 34(1):62-70.

Casciaro, B, Cappiello, F, Cacciafiesta, M, Mangoni, ML. Promising approaches to optimize the biological properties of the antimicrobial peptide esculentin-1a(1-21)NH₂: amino acids substitution and conjugation to nanoparticles. *Frontiers in Chemistry*, 2017; 5.

Castro, MS, Ferreira, TCG, Cilli, EM, JR, EC, Mendes, MJSG, Sebben, A, *et al.* Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* (“spotted tree frog”). *Peptides*, 2009; 30(2):291-296.

Cespedes, GF, Lorenzon, EN, Vicente, EF, Mendes, MJSG, Fontes, W, Castro, MS, *et*

al. Mechanism of action and relationship between structure and biological activity of Ctx-Ha: a new ceratotoxin-like peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *Protein and Peptide*, 2012; 19(6):596-603.

Chen, T, Zhou, M, Chen, W, Lorimer, J, Rao, P, Walker, B, *et al.* Cloning from tissue surrogates: antimicrobial peptide (esculentin) cDNAs from the defensive skin secretions of Chinese ranid frogs. *Genomics*, 2006; 87:638-644.

Clarke, BT. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1997; 72(3):365-379.

Clemente, CA. Bioacústica e morfometria de *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) (Anura: Hylidae). 2008. 158. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Conlon, JM. The potential of frog skin antimicrobial peptides for development into therapeutically valuable anti-infective agents. *ACS Symp. Ser.* 2012; 1095:4760.

Crofts, TS, Gasparrini, AJ, Dantas, G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nature Reviews – Microbiology*, 2017; 15:422-434.

Crowe, JRJE. Treating flu with skin frog. immunity, 2017; 46.

Da Costa, ALP, Júnior, ACSS. Resistência bacteriana aos antibióticos e saúde pública: uma breve revisão de literatura. *Periódicos UniFap*, 2017; 7(2):45-57.

Da Costa, EO. A importância da mastite na produção leiteira do país. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP São Paulo*, 1998; 1(1):003-009.

Dathe, M, Wieprecht, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999; 1462:71-87.

De Oliveira, AC, Damasceno, QS. Superfícies do ambiente hospitalar como possíveis reservatórios de bactérias resistentes: uma revisão. *Ver. Esc. Enferm. USP*, 2010; 44(4):1118-1123.

De Souza, GHB, Miranda, RR, Inácio, LDJ, Amparo, TR, Vaz, LBA, Fernandes, MAS, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* em hospital da microrregião de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. *Infarma Ciências Farmacêuticas*. 2016; 28(4):234-240.

De Souza, KSS, Oliveira, YCDM, Duarte, AFV, De Oliveira, TC, Veloso, ALDC, Oliveira, PMC, *et al.* Resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de vacas leiteiras com mastite subclínica. *Cad. Ciênc. Agrá.*, 2016; 8(2):83-89.

Fosgerau, K, Hoffmann, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, 2015; 20 (1).

Frost, DR. 2019. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. Acessível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA. Acesso em 07/11/2016.

Fuente-Núñez, CDL, Cardoso, MH, Cândido, EDS, Franco, OL, Hancock, REW. Synthetic antibiofilm peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016; 1858:1061-1069.

Galdiero, S, Falanga, A, Berisio, R, Grieco, P, Morelli, G, Galdiero, M. Antimicrobial peptides as an opportunity against bacterial diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 2015; 22:1665-1677.

Garzoni, C, Kelley, WL. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol*, 2009; 17(2):59-65.

Geetha, R, Sathian, CT, Prasad, V, Gleeja, VL. Efficacy of purified antimicrobial peptides from lactic acid bacteria against bovine mastitis pathogens. *Asian J. Dairy & Food Res*, 2015; 34(4):259-264.

Giuliani, A, Pirri, G, Bozzi, AD, Aschi, M, Rinaldi, AC. Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 2008; 65:2450-2460.

Gomes, F, Henriques, M. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Curr. Microbiol*, 2016.

Gould, IM, Bal, AM. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence*, 2013; 4(2):185-191.

Greenfield, NJ, Fasman, GD. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 1969; V8:4108-16.

Guimarães AB, Costa FJ, Pires OR, Fontes W, Castro MS. The amazing world of peptide engineering: the example of antimicrobial peptides from frogs and their analogues. *Protein Pept Lett*, 2016; 23(8):722-737.

Hale, JDF, Hancock, REW. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev. Anti Infect*, 2007; 5 (6):951-959.

Hamid, S, Bhat, MA, Mir, IA, Taku, A, Badroo, GA, Nazki, S, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Vet World*, 2017; 10(3):363–367.

Hill, C, Pan, M, Barbrak, L, Danelishvili, L, De Morais, H, Bermudez, LE. Presence of virulence-associated genes and ability to form biofilm among clinical isolates of *Escherichia coli* causing urinary infection in domestic animals. *Advances in Microbiology*, 2015; 5:573-579.

Holthausen, DJ, Lee, SH, Kumar, VTV, Bouvier, NM, Krammer, F, Ellebedy, AH, *et al.* An amphibian host defense peptide is virucidal for human h1 hemagglutinin-bearing influenza viruses. *Immunity*, 2017; 46:587–595.

Holt, KE, Wertheim, H, Zadoks, RN, Baker, S, Whitehouse, CA, Dance, D, *et al.* Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *PNAS*, 2015; 3574-3581.

Huang, Y, Feng, Q, Yan, Q, Hao, X, Chen, Y. Alpha-helical cationic anticancer peptides: a promising candidate for novel anticancer drugs. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2015; 15:73-81.

Jechalke, S, Heuer, H, Siemens, J, Amelung, W, Smalla, K. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*, 2014; 22(9):536-545.

Jenssen, H, Hamill, P, Hancock, REW. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006; 19:491-511.

Juarez, J, Bradstock, KF, Gottlieb, DJ, Bendall, LJ. Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblastic leukemia cells in vitro. *Leukemia*, 2003; 17:1294-1300.

Kaur, H. The need of time: development of new antimicrobials (editorial). *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2018; 18(1).

Kern, ZT, Jacob, ME, Gilbertie, JM, Vaden, SL, Lyle, SK. Characteristics of dogs with biofilm-forming *Escherichia coli* urinary tract infections. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2018; 1-7.

Krittanaï, C, Johnson, WC. Relative order of helical propensity of amino acids changes with solvent environment. *Proteins*, 2000; v39:132-141.

Kumar, P, Kizhakkedathu, JN, Straus, SK. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. *Biomolecules*, 2018; 8(1), pii:E4.

Ladram, A, Nicolas, P. Antimicrobial peptides from frog skin: biodiversity and therapeutic promises. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2016; 21:1341-71.

Lee, AS, Lencastre, HD, Garau, J, Kluytmans, J, Kumar, SM, Peschel, A, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nature reviews disease primers, 2018; 4(18033):1-27.

Lowy, FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*, 2003; 111(9):1265-1273.

Mangoni, ML, Papo, N, Saugar, JM, Barra, D, Shai, Y, Simmaco, M, Rivas, L. Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins. *H. Biochemistry*, 2006; 45:4266–4276.

MAPA - <http://www.agricultura.gov.br> acessado em: 28 Setembro 2018.

Marr, AK, Cen, S, Hancock, REW, McMaster, WR. Identification of synthetic and natural host defense peptides with leishmanicidal activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016; 60(4):2484-2491.

Matos, IES. Antibióticos beta-lactâmicos e as “superbactérias”. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde.

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

Medeiros, SE, Mota, RA, Santos, MV, Freitas, MFL, Pinheiro, JWJ, Teles, JAA. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesq. Vet. Bras*, 2009; 29(7):569-574.

Meek, RW, Vyas, H, Piddock, LJV. Nonmedical uses of antibiotics: time to restrict their use. *Plos Biology*, 2015; 13(10):1-11.

Mendes, A, Palmer, SJ. Antibiotic resistance crisis and the urgent need for effective prescribing. *Nurse Prescribing*, 2018; 16(1).

Mishra, AK, Choi, J, Moon, E, Baek, KH. Tryptophan-rich and proline-rich antimicrobial peptides. *Molecules*, 2018; (23)815:1-23.

Mohamed, Abdelkhalek, & Seleem. Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports*, 2016; 6:29707:1-14.

Mojsoska, B, Jensen, H. Peptides and peptidomimetics for antimicrobial drug design. *Pharmaceuticals*, 2015; 8:366-415.

Morens, DM, Fauci, AS. Emerging infectious diseases: threats to human health and global stability. *Plos Pathogens*, 2013; 9(7):1-3.

Moritz, F, Moritz, CMF. Resistance to antimicrobials in *Staphylococcus spp.* associated in bovine mastitis. *Rev. Ciên. Vet. Saú Públ*, 2016; 2:131-136.

Nascimento, ACC, Fontes, W, Sebben, A, Castro, MS. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein Pept. Lett.*, 2003; 10(3):227-238.

Ochoa-Zarzosa, Fernández, Cano-Camacho, López-Meza. Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes. *Microbial Pathogenesis*, 2009; 47:1–7.

Pace, CN, Shirley, BA, Thomson, JA. Measuring conformational stability of a protein. In *Protein structure: A practical approach* (ed. T.E. Creighton). Oxford University Press, Oxford, UK. 1989.

Pacheco, E, Ferreira, V, Carvalho, RM. Diet of *Boana albopunctata* (Anura: Hylidae) in an Atlantic Forest fragment of southeastern Brazil *Phyllomedusa*: *Journal of Herpetology*, 2017; 16(1):57-62.

Pál, T, Sonnevend A, Galadari S, Conlon JM. Design of potent, non-toxic antimicrobial agents based upon the structure of the frog skin peptide, pseudin-2. *Regul Pept*, 2005; 129(1-3):85-91.

Park, CB, Yi, KS, Matzuzaki, K, Kim, MS, Kim, SC. Structure-activity of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *PNAS*, 2000; 97(15):8245-8250.

Pereira, MN, Scussel, VM. Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: fonte de contaminação, impactos e controle. *Revista de Ciências Agro veterinárias*, 2017; 16 (2):170-182.

PNCRC - Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes disponível em <http://www.agricultura.gov.br/> acessado em: 21 Junho 2018

Popov, C. Expressão de peptídeos bioativos na derme de *Phyllomedusa distincta* em dois estágios de desenvolvimento. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia), Universidade Católica de Brasília.

Prates, MV, Júnior, CB. Peptídeos antimicrobianos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 2001; 30-36.

Pukala, TL, Bowie, JH, Maselli, VM, Musgrave, IF, Tyler, MJ. Host-defense peptides

from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. *Nat. Prod. Rep.*, 2006; 23:368–393.

Puyvelde, SV, Deborggraeve, S, Jacobs, J. Why the antibiotic resistance crisis requires a One Health approach. *Lancet Infect Dis*, 2017.

Raaymakers, C, Verbrugghe, E, Hernot, S, Hellebuyck, T, Betti, C, Peleman, C, *et al.* Antimicrobial peptides in frog poisons constitute a molecular toxin delivery system against predators. *Nature Communications*, 2017; 8:1495.

Robertson, LS, Fellers, GM, Marranca, JM, Kleeman, PM. Expression analysis and identification of antimicrobial peptide transcripts from six north american frog species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013; 104:225-236.

Rosenfield, DA, Nichi, M, Pizzutto, CS. C-Peptides for diagnostics and therapy: a veterinary medicine point of view. *Pesq. Vet. Bras*, 2017; 37(1):36-40.

Schiffer, M, Edmundson, AB. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys J*, 1967; 7(2):121-135.

Sebben, A. Microdissecação fisiológica a fresco: uma nova visão sobre a anatomia de anfíbios e répteis. In: Nascimento, L. B & Oliveira, M. E. (eds.). (Org.). *Herpetologia no Brasil II*. 1ed. Belo Horizonte - MG: Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2007, 1, 311-325.

Siqueira, AK, Ribeiro, MG, Salerno, T, Takahira, RK, Lopes, MD, Prestes, NC, *et al.* Perfil de sensibilidade e multirresistência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, de piometra e de fezes de cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 2008; 60(5):1263-1266.

Stojanović-Radić, Z, Dimitrijević, M, Stanković, N, Aleksić, A, Pejčić, M. Frequency of isolation and antibiotic resistance patterns of bacterial isolates from wound infections. *Biologica Nyssana*, 2016; 7(2):151-158.

Tasho, RP, Cho, JY. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: a review. *Science of the total environment*, 2016; 366-376.

Trabulsi, LR, Teixeira, LM, Bueris, V. *Staphylococcus aureus*. In: Trabulsi, LE Alterthum, F. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 2005; 175-182.

Vanhoye, D, Bruston, F, Nicolas, P, Amiche, M. Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *Eur. J. Biochem.*, 2003; 270(9):2068-2081.

Ventola, C. L. The antibiotic resistance crisis. part 1: causes and threats. *P&T*, 2015;

40(4):277-283.

Wang, G, Li, X, Wang, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 2015; 44(D1):D1087–D1093.

Wang, Y, Zhang, Y, Lee, WH, Yang, X, Zhang, Y. Novel peptides from skin of amphibians showed broad-spectrum antimicrobial activities. *Chem. Bio. Drug. Des.*, 2016; 87:419-424.

Weese, JS, Blondeau, JM, Boothe, D, Breitschwerdt, EB, Guardabassi, L, Hillier, A, *et al.* Antimicrobial use guidelines for treatment of urinary tract disease in dogs and cats: antimicrobial guidelines working group of the international society for companion animal infectious diseases. *Veterinary Medicine international*, 2011; 1-9.

WHO - World health organization. 2015. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance 2015 Disponível em http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf.
acessado em: 21 Junho 2018

Woolhouse, M, Ward, M, Bunnik, BV, Farrar, J. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philosophical transactions B*, 2018; 370.

Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance – 2015 – <http://www.who.int/drugresistance/en/> acessado em: 21 Junho 2018.

Xu, X & Lai, R. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chem. Rev.*, 2015; 115:1760–1846

Yu, G, Baeder, DY, Regoes, RR, Rolff, J. Combination effects of antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016; 60(3):1717-1724.

Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002; 415.