



Universidade de Brasília

Pós-Graduação em Biologia Animal

**Caracterização química e biológica da secreção
cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*:
peptídeos antimicrobianos e anticarcinogênicos,
fosfolipases e peptidases**

Michelle da Silva Libério

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Co-orientador: Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

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

**Brasília
2008**

“Dois importantes fatos, nesta vida, saltam aos olhos; primeiro, que cada um de nós sofre inevitavelmente derrotas temporárias, de formas diferentes, nas ocasiões mais diversas. Segundo, que cada adversidade traz consigo a semente de um benefício equivalente. Ainda não encontrei homem algum bem-sucedido na vida que não houvesse antes sofrido derrotas temporárias. Toda vez que um homem supera os reveses, torna-se mental e espiritualmente mais forte... É assim que aprendemos o que devemos à grande lição da adversidade.” (Andrew Carnegie a Napoleon Hill).

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”
(São Francisco de Assis)

DEDICATÓRIA:

A Deus por toda misericórdia e socorro, principalmente nos momentos mais difíceis, me dando força para suportá-los e fé para acreditar que eles seriam temporários.

Aos meus pais por todo o incentivo, amor, compreensão e por acreditarem no meu potencial.
Por me apoiarem nos momentos mais difíceis, sendo exemplos de força, coragem, fé e dedicação, por muitas vezes abdicando de suas próprias vidas em prol da minha.
Por todo suporte e por terem sempre estendido a mão para me ajudar a levantar sempre que caí.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mariana de Souza Castro pela orientação, amizade e compreensão dos momentos nos quais tive que me afastar do laboratório, além de ter acreditado no meu trabalho me dando toda a liberdade necessária.

Ao Prof. Dr. Osmindo Rodrigues Pires Jr. pela co-orientação, amizade, paciência e pelas sugestões sempre úteis para o desenvolvimento dessa dissertação.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Dr. Wagner Fontes, Dr. Carlos André O. Ricart, MSc. Pedro José P. Zanotta, Dr. Marcelo Valle de Sousa Dra. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima e Dr. Ricardo Bastos Cunha, pela constante disposição em colaborar.

À Dra. Izabela Dourado, ao Prof. Dr. Jaime Santana, ao Dr. Sebastián Charneau, ao Tiago Sangas e a todos as pessoas que me acolheram no laboratório de Patologia Molecular e que me ajudaram a caracterizar a atividade proteolítica da secreção estudada.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Félix por estar sempre solícito para emprestar reagentes.

À Profa. Dra. Cynthia Kyaw por ceder a infra-estrutura para a realização dos ensaios antimicrobianos e à MSc. Elaine Aquino pelo auxílio nos ensaios antibacterianos.

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

Ao Dr. Natan Maciel pela ajuda nas análises filogenéticas.

À FUB/UnB (Fundação Universidade de Brasília) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) que possibilitaram a realização do presente trabalho.

Aos amigos Jimmy, Diana, Liudy, Gabriel, Fábio, Jayner, Camila, Elaine, Karine, Anne, Adriana, Carla, Rafael, Anna, Liz, “meninos do milho” Gabriel, Luciana e Tatiana, e outros não citados, mas igualmente importantes, do laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas por estarem sempre disponíveis pra auxiliarem no desenvolvimento desse trabalho, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e por alegrar os dias mais tristes.

Ao Prof. Dr. Ricardo Bentes Azevedo pela colaboração na realização dos ensaios antitumorais.

À minha amiga MSc. Graziella Joannite por todo o auxílio nos ensaios de atividade anticarcinogênica, mas principalmente pela paciência para ouvir meus desabafos e por me aconselhar nos momentos mais difíceis.

Ao amigo MSc. Carlos Enrique Uribes pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao amigo MSc. Sócrates Sornelas por ajudar a documentar os ensaios fluorogênicos em gel.

Ao amigo Félix por ajudar na leitura dos ensaios fluorogênicos.

Ao Nuno Domingues e Antônio Rufino pelo apoio operacional e a constante disposição em ajudar.

Aos colegas do laboratório de Toxinologia, mas principalmente ao Thompson por sempre me ajudar na extração do veneno dos animais estudados, mesmo quando estava ocupado.

Aos meus amigos que carregaram para mim toda a vida Yuri, Laura, Eri, Cantilis, Muri, Rafael, Lilze, Veronica, Jesine, Glaucia, Vanessa, Monaliza, Breno, Fernanda, Mafê e muitos outros por todos os momentos alegres, por terem dado apoio nos momentos em que mais precisei e por compreenderem o meu afastamento.

Aos meus amigos da dança por terem me ajudado a manter a sanidade mental.

Ao meu irmão pelo apoio e pelas conversas de madrugada.

Aos meus familiares por todo apoio e por confiarem no meu potencial.

À Nara e à Thais pelo carinho e atenção na resolução de todos os problemas na Secretaria da Pós-graduação em Biologia Animal

SUMÁRIO

	Página
Dedicatória _____	ii
Agradecimentos _____	iii
Lista de abreviaturas _____	viii
Lista de figuras _____	xi
Lista de tabelas _____	xiv
Resumo _____	xv
Abstract _____	xvi
1. Introdução _____	1
1.1. Peptídeos antimicrobianos (PAMs) _____	2
1.1.1. Aspectos Gerais _____	2
1.1.2. Mecanismos de seletividade e toxicidade específica _____	5
1.1.3. Mecanismos de ação _____	5
1.1.4. Aplicações _____	12
1.1.5. Mecanismos de resistência bacteriana aos PAMs _____	15
1.2. Peptídeos com atividade anticarcinogênica (PACs) _____	16
1.2.1. Mecanismos de ação dos PACs _____	19
1.2.2. A seletividade dos PACs pelas células tumorais _____	23
1.2.3. Estratégias para aumentar a eficiência dos PACs _____	24
1.3. Enzimas proteolíticas _____	26
1.3.1. Aspártico-peptidases _____	27
1.3.2. Metalo-peptidases _____	28
1.3.3. Glutâmico-peptidases _____	28
1.3.4. Serino-peptidases _____	29
1.3.5. Cisteíno-peptidases _____	29
1.3.6. Treonino-peptidases _____	29
1.4. Fosfolipases _____	30
1.4.1. Fosfolipases A ₂ _____	31
1.5. <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> (Spix, 1824) _____	33
2. Justificativa _____	35
3. Objetivos _____	38
3.1. Objetivos Gerais _____	38
3.2. Objetivos específicos _____	38
4. Materiais e Métodos _____	39
4.1. Reagentes químicos _____	39
4.2. Obtenção da secreção cutânea _____	39

4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência - fase reversa (RP-HPLC)	39
4.3.1. Fracionamento da secreção bruta	39
4.3.2. Purificação dos peptídeos	39
4.4. Espectrometria de massa	40
4.5. Determinação da presença de amidação C-terminal	40
4.6. Bioinformática	41
4.7. Ensaio hemolítico	41
4.7.1. Ensaio preliminar	42
4.7.2. Determinação da HC ₅₀	42
4.8. Ensaio antimicrobiano	42
4.8.1. Ensaio preliminar	42
4.8.2. Determinação de MIC	43
4.9. Síntese Química	43
4.10. Linhagens Celulares	44
4.11. Manutenção da cultura de células	44
4.12. Tratamento das células com os peptídeos de <i>Leptodactylus labyinthicus</i>	45
4.13. Análise de efeitos citostáticos	47
4.13.1. Ciclo Celular	47
4.14. Análise de efeitos citotóxicos	47
4.14.1. Viabilidade Celular (MTT)	47
4.14.2. Fragmentação de DNA	48
4.14.3. Potencial de Membrana Mitocondrial	49
4.14.4. Integridade da Membrana Plasmática	49
4.14.5. Morfologia Celular	50
4.15. Quantificação protéica	50
4.16. Eletroforese em Gel Desnaturante de Poliacrilamida 12% (SDS-PAGE)	50
4.17. Coloração com nitrato de prata	51
4.18. Atividade caseinolítica	51
4.19. Atividade gelatinolítica	52
4.20. Ensaio fluorogênico	53
4.20.1. Em placa	53
4.20.2. Influência da concentração protéica na atividade	55
4.20.3. Determinação do pH ótimo	55
4.20.4. Em gel SDS-PAGE 10%	55
4.20.5. Ensaio de inibição	56
4.21. Ensaio de atividade fosfolipásica	57
5. Resultados	59
5.1. Fracionamento da secreção cutânea e análise por espectrometria de massa	59
5.2. Ensaios preliminares hemolítico, antimicrobiano e análise por espectrometria de massa	61

5.3. Purificação dos peptídeos de interesse	61
5.4. Caracterização química dos peptídeos	64
5.5. Determinação de HC ₅₀ , MIC e IC ₅₀	69
5.6. Efeitos citostáticos e citotóxicos	74
5.7. Perfil protéico em SDS-PAGE	79
5.8. Atividade proteolítica	79
5.9. Atividade de PLA ₂	88
6. Discussão	89
6.1. Atividade antimicrobiana e hemolítica	89
6.2. Atividade anticarcinogênica	95
6.3. Atividade enzimática	102
7. Considerações finais	108
8. Perspectivas	110
9. Referências Bibliográficas	112
Anexos	125

LISTA DE ABREVIATURAS

- [M+H]⁺**. Massa molecular monoisotópica.
- <μH>**. Anfipaticidade.
- <H>**. Hidrofobicidade média.
- AA**. Ácido araquidônico.
- AMC**. 7-amino-4-metilcumarina.
- AS**. Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico.
- ATP**. Adenosina trifosfato.
- ATTC**. *American Type Culture Collection*.
- CE**. Célula endotelial.
- CFU**. Unidade formadora de colônia.
- CHAPS**. 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate.
- CL**. Cardioplipina.
- COX**. Ciclo-oxigenase.
- CTL**. Linfócito T citotóxico.
- DMEM**. *Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium*.
- DMSO**. Dimetilsulfóxido.
- DNA**. Ácido desoxoribonucléico.
- DST**. Doença sexualmente transmissível.
- DTT**. Ditioneitol.
- EDTA**. Ácido etilenodiaminotetraacético.
- EM**. Esfingomielina.
- FC**. Fosfatidilcolina.
- FE**. Fosfatidiletanolamina.
- FG**. Fosfatidilglicerol.
- FGF**. Fator de crescimento de fibroblasto.
- FS**. Fosfatidilserina.
- G-P-AMC**. *Gly-Pro-7-amide-4-methylcoumarin*.
- HC₅₀**. Concentração capaz de promover 50% de hemólise.
- HCCA**. Ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico.
- HEPES**. Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic.
- HETE**. Ácidos hidroxieicosatetraenóicos.

HIF-1 α . Fator induzido por hipóxia.

HIV. Vírus da imunodeficiência humana.

IAP. Proteínas inibidoras de apoptose.

IC₅₀. Concentração que inviabiliza 50% das células.

IDO. Idolamina 2,3 dioxigenase.

IL-10. Interleucina-10.

IUCN. *International Union for Conservation of Nature*.

L-Alanyl-L-Alanyl-L-F-A-AMC. L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC.

L-L-AMC. *L-Leu-7-amide-4-methylcoumarin hydrochloride*.

LOX. Lipo-oxigenase.

LPS. Lipopolisacarídeos.

LT. Leucotrieno.

MALDI-TOF. *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*.

MDP. Dipeptídeo de origem microbiana muramil.

MIC. Concentração inibitória mínima.

MES. *2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid*.

Mm. Marcador molecular.

MMP. Metalo-peptidase de matriz.

MS. *Mass spectrometry*.

MTT. 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

NK. Células *natural killers*.

nNOS. Isoforma neuronal da óxido nítrico sintase.

N-Suc-G-P-L-G-P-AMC. N-Succinyl-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC.

N-Suc-I-A-AMC. N-Succinyl-Ile-Ala-AMC.

PAC. Peptídeo anticarcinogênico.

PAGE. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

PAM. Peptídeo antimicrobiano

PBS. *Phosphate buffered saline*.

PG. Prostaglandina.

pI. Potencial isoelétrico.

PLA₂. Fosfolipase tipo 2.

PMSF. *Phenylmethanesulphonylfluoride*.

pRb. Proteína retinoblastoma.

PSA. Persulfato de Amônio.

PTH. Feniltioidantoína.

RMD. Resistência multi-drogas.

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

SD. Desvio padrão.

SDS. Dodecil sulfato de sódio.

Tampão AMT. Ácido acético, MES e Tris.

TCA. Ácido tricloroacético.

TEMED. N,N,N,N tetrametil enediamina.

TFA. Ácido trifluoroacético.

TFE. Trifluoroetanol.

TGF- β . Fator transformador do crescimento- β .

TLCK. *Tosyl lysyl chloromethyl ketone.*

TNF. Fator de necrose tumoral.

TPCK. *Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone.*

UF. Unidade de fluorescência.

u-PA. Ativador plasminogênico do tipo uroquinase.

UV. Ultravioleta.

VEGF. Fator de crescimento endotelial vascular.

VEGF. Fator de crescimento endotelial.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo da especificidade de peptídeos antimicrobianos pela membrana citoplasmática das bactérias. _____	7
Figura 2. Representação esquemática do modelo <i>barrel-stave</i> e do modelo poro toroidal. _____	9
Figura 3. Ilustração do modelo <i>carpet-like</i> . _____	10
Figura 4. Esquema do modelo <i>Shai-Matsuzaki-Huang</i> . _____	11
Figura 5. Esquema simplificativo do modo de ação intracelular de peptídeos antimicrobianos. _____	12
Figura 6. Alvos terapêuticos para regressão tumoral. _____	17
Figura 7. Representação simplificada das duas principais vias de sinalização para a morte celular programada. _____	20
Figura 8. Estágios do desenvolvimento do câncer que podem ser alvos de inibidores de proteases. _____	22
Figura 9. Etapas da angiogênese e metástase tumoral susceptíveis à inibição por peptídeos antiangiogênicos. _____	23
Figura 10. Sítios de clivagem das fosfolipases. _____	30
Figura 11. Efeitos farmacológicos das enzimas PLA ₂ isoladas da peçonha de serpentes. _____	32
Figura 12. Exemplar de <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> . _____	34
Figura 13. Princípio dos substratos marcados com o fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina (AMC). _____	53
Figura 14. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de <i>L. labyrinthicus</i> . _____	59
Figura 15. Composição peptídica/protéica da secreção cutânea de <i>L. labyrinthicus</i> representada em faixas de massas moleculares monoisotópicas obtidas pela análise por espectrometria de massa MALDI-TOF das frações oriundas de uma corrida de RP-HPLC. _____	60
Figura 16. Purificação dos peptídeos estudados. _____	62

Figura 17. Espectro de massa dos peptídeos (A) 1563 Da, (B) 2193 Da, (C) 2547 Da, (D) 2541 Da e (E) 1761 Da purificados por RP-HPLC em coluna analítica C ₁₈ .	63
Figura 18. Espectros de massa obtidos após a incubação dos peptídeos (A) <i>fallaxin</i> (2.547 Da) e (B) <i>pentadactylin</i> (2.541 Da) com o reagente HCl metanólico no experimento de Esterificação de Fisher.	65
Figura 19. Multi-alinhamento das seqüências de peptídeos isolados de leptodactilídeos.	66
Figura 20. Árvore <i>neighbor-joining</i> baseada no alinhamento entre os peptídeos de leptodactilídeos.	67
Figura 21. Comparação entre as projeções em hélice dos peptídeos antimicrobianos <i>fallaxin</i> , <i>pentadactylin</i> , <i>syphaxin</i> e <i>laticeptin</i> .	68
Figura 22. Porcentagem de células viáveis das linhagens celulares de câncer de colo uterino (HeLa), de mama (MCF-7), de pele (B16F10) e de fibroblasto normal (FHN) após a incubação por 24 h com diferentes concentrações de <i>fallaxin</i> .	73
Figura 23. Porcentagem de células viáveis das linhagens celulares de câncer de colo uterino (HeLa), de mama (MCF-7) e de fibroblasto normal (FHN) após a incubação por 24 h com diferentes concentrações de <i>pentadactylin</i> nativo ou sintético.	73
Figura 24. Concentração de <i>fallaxin</i> e <i>pentadactylin</i> que reduz em 50% a viabilidade celular das linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7), de pele (B16F10), de colo uterino (HeLa) e de fibroblastos normais (FHN) após 24 h de incubação a 37°C.	74
Figura 25. Microscopia de contraste de fase de células de câncer de colo do útero (HeLa) após 24 horas de incubação na ausência de peptídeo (A); com 128 µM dos peptídeos <i>pentadactylin</i> (B) e <i>fallaxin</i> (C).	76
Figura 26. Microscopia de contraste de fase de células de câncer de mama (MCF-7) após 24 horas de incubação na ausência de peptídeo (A); com 128 µM dos peptídeos <i>pentadactylin</i> (B) e <i>fallaxin</i> (C).	76
Figura 27. Microscopia de contraste de fase de células de câncer de pele murino (B16F10) após 24 horas de incubação na ausência de peptídeo (A); com 128 µM do peptídeo <i>fallaxin</i> (B).	77
Figura 28. Microscopia de contraste de fase de células de fibroblasto (FHN) após 24 horas de incubação na ausência de peptídeo (A); com 128 µM dos peptídeos <i>pentadactylin</i> (B) e <i>fallaxin</i> (C).	77
Figura 29. Microscopia de contraste de fase de células de câncer de mama (MCF-7) após 24 horas de tratamento na ausência do peptídeo	

(A) e na presença de <i>pentadactylin</i> sintético na concentração de 49 μ M (B). _____	78
Figura 30. Análise por citometria de fluxo de células da linhagem de câncer de mama MCF-7 tratadas por 24 h com 0 μ M (A) e 49 μ M (B) de <i>pentadactylin</i> sintético. _____	78
Figura 31. Resultados sobre o mecanismo de ação anticarcinogênico do peptídeo <i>pentadactylin</i> sobre células da linhagem celular de câncer de mama MCF-7. _____	79
Figura 32. Perfil protéico da secreção cutânea de <i>L. labyrinthicus</i> em SDS-PAGE 12%. _____	80
Figura 33. Localização dos prováveis pontos de clivagem (barras vermelhas) observados nos peptídeos <i>fallaxin</i> , <i>pentadactylin</i> , <i>syphaxin</i> e <i>ocellatins 1 a 5</i> . _____	81
Figura 34. Análise das condições ótimas da atividade caseinolítica utilizando-se 40 μ g de secreção cutânea de <i>L. labyrinthicus</i> . _____	82
Figura 35. Atividade gelatinolítica da secreção de <i>L. labyrinthicus</i> em SDS-PAGE 9%-gelatina 0,1%. _____	83
Figura 36. Atividade gelatinolítica da secreção de <i>L. labyrinthicus</i> (40 μ g) em SDS-PAGE 9%-gelatina 0,1% sob diferentes condições. _____	84
Figura 37. Monitoramento da atividade proteolítica da secreção cutânea de <i>L. labyrinthicus</i> (15,6 μ g de proteína) sobre os substratos Gly-Pro-AMC, L-Leu-AMC e L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC ao longo de 30 min. _____	85
Figura 38. Influência da concentração protéica da secreção cutânea de <i>L. labyrinthicus</i> na atividade proteolítica (mUF/min) sobre três peptídeos fluorogênicos: Gly-Pro-AMC, L-Leu-AMC e L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC. _____	85
Figura 39. Perfil da atividade proteolítica da secreção bruta de <i>L. labyrinthicus</i> (25,6 μ g de proteína) em diferentes pHs. _____	86
Figura 40. Atividade proteolítica de 15.2 μ g de secreção cutânea fresca de <i>L. labyrinthicus</i> em SDS-PAGE 10% incubado com três substratos fluorogênicos e fotodocumentados sob UV. _____	87
Figura 41. Atividade de PLA ₂ da secreção cutânea de <i>L. labyrinthicus</i> (40 μ g). _____	89

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Paralelismo entre os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos e os de resistência apresentados pelos microorganismos. _____	15
Tabela 2. Substratos fluorogênicos (Sigma-Aldrich Company) utilizados no experimento em placa de atividade proteolítica. _____	54
Tabela 3. Inibidores utilizados no ensaio fluorogênico. _____	56
Tabela 4. Comparação entre alguns dos peptídeos antimicrobianos e seus fragmentos de 22 e 16 resíduos de aminoácidos isolados de leptodactilídeos, incluindo: <i>fallaxin</i> , <i>pentadactylin</i> , <i>laticeptin</i> e <i>sypfaxin</i> . _____	69
Tabela 5. Atividade antimicrobiana e hemolítica dos peptídeos estudados. _____	70
Tabela 6. Comparação dos MICs e do HC ₅₀ de PAMS purificados da secreção cutânea de leptodactilídeos. _____	70
Tabela 7. Comparação das características químicas e biológicas de vários PAMs isolados da secreção cutânea de anfíbios e que também apresentam atividade antitumoral. _____	72
Tabela 8. Possíveis fragmentos dos peptídeos <i>fallaxin</i> e <i>pentadactylin</i> detectados por MALDI-TOF MS. _____	81
Tabela 9. Efeitos de diferentes inibidores sobre a atividade proteolítica da secreção cutânea de <i>L. labyrinthicus</i> (25,6 µg de proteínas) na hidrólise dos substratos fluorogênicos Gly-Pro-AMC, L-Leu-AMC e L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC. _____	88

RESUMO

Atualmente, o surgimento de resistência às drogas disponíveis no mercado pelos microorganismos e pelas células de câncer tornou o desenvolvimento de novas formas terapêuticas imprescindível. A secreção cutânea dos anfíbios é uma rica fonte natural de peptídeos com atividades anticarcinogênica (PAC) e antimicrobiana (PAM). Entretanto, o veneno desses animais também é constituído de outras macromoléculas, por exemplo, enzimas, as quais têm sido pouco investigadas. O presente estudo teve como objetivo caracterizar, de forma geral, a secreção glandular da rã-pimenta *Leptodactylus labyrinthicus*. Especificamente, buscou-se identificar e caracterizar química e biologicamente alguns dos peptídeos presentes, além de investigar a presença de atividades enzimáticas. O estudo revelou a ocorrência de inúmeros peptídeos e proteínas, demonstrando a riqueza e o potencial biológico desse veneno. Os dois peptídeos antimicrobianos purificados foram *fallaxin* e *pentadactylin*, os quais já haviam sido isolados de outras espécies do gênero *Leptodactylus*. Ambos apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; e *fallaxin* foi identificado como fracamente hemolítico. Como vários PAMs de amplo espectro de ação também são citotóxicos para células de câncer, os dois peptídeos isolados foram testados contra as linhagens celulares de câncer HeLa, MCF-7 e B16F10, demonstrando-se efetivos contra todas as linhagens. Observou-se também que os dois PACs são pouco seletivos, pois foram mais tóxicos para células normais de fibroblasto (FHN) do que para as células tumorais. Portanto, o uso terapêutico desses PACs deverá ser via estratégias que aumentem a especificidade dos mesmos. Os estudos de mecanismo de ação com *pentadactylin* não foram conclusivos, sugerindo a morte de células de MCF-7 via apoptose, podendo ser seguida pelo processo necrótico. Além desses, o fragmento Flx-16 de *fallaxin* e o peptídeo PGL-LI, rico em glicina e leucina, foram testados, contudo nenhuma atividade biológica foi detectada. A investigação da atividade enzimática da secreção revelou a presença de enzimas proteolíticas pertencentes aos clãs das metalo- e serino-peptidases e que atuam de maneira ótima em pH neutro a ligeiramente básico; e de fosfolipases do tipo A₂. O estudo e caracterização da composição da secreção cutânea de anfíbios são de extrema relevância, podendo ajudar a esclarecer questões taxonômicas, identificar drogas terapêuticas em potencial, além de auxiliar no entendimento da biologia dos anfíbios.

ABSTRACT

Nowadays, the emergence of resistance to the current available chemotherapeutic drugs by microorganisms and cancer cells make the development of new agents imperative. The skin secretion of amphibians is a natural rich source of antimicrobial (PAM) and anticancer peptides (PAC). Nevertheless, the venom of these animals is also composed by other macromolecules, such as enzymes, which have not been studied extensively yet. The aim of this study was to characterize the glandular secretion of the pepper-frog *Leptodactylus labyrinthicus*, targeting to identify and characterize chemically and biologically some of the peptides present, besides detecting enzymatic activities. The research has found a variety of peptides and proteins, showing the richness and the biological potential of this venom. Two PAMs were purified, fallaxin and pentadactylin, which have already been isolated from other species of the genus *Leptodactylus*. Both peptides were active against Gram-positive and Gram-negative bacterias; moreover, fallaxin showed a weak hemolytic activity. As some PAMs of broad spectrum of action are also toxic to cancer cells, the two peptides isolated were tested against the cancer cell lines HeLa, MCF-7 and B16F10, being effective against all of them. We noticed that both PACs aren't specific, since they have been more toxic to normal fibroblast cells (FHN) than to tumor cells. Therefore, it is mandatory that the therapeutic use of these PACs be accompanied by strategies that enhance their selectiveness. The studies of action mechanism with pentadactylin were not conclusive, suggesting that MCF-7 cells die by apoptosis; however it may be followed by necrosis. The peptide PGL-L1, rich in glycine and leucine, and the fragment Flx-16 from fallaxin were tested, though no biological activity was found. The research of enzyme activity of the secretion revealed the presence of proteolytic enzymes of the clans metallo- and serine-peptidases, and that they act optimally at neutral to slightly basic pH, and of phospholipases A₂. The study and characterization of the skin secretion of amphibians is of extreme relevance, helping to elucidate taxonomic issues, identifying putative therapeutic drugs, besides helping to understand the biology of amphibians.

1. Introdução

A classe Amphibia contém cerca de 4550 espécies vivas descritas divididas entre as ordens Ápoda (cecílias), Caudata (salamandras) e Anura (sapos e rãs). Devido às adaptações comportamentais, fisiológicas e morfológicas, esses animais conseguiram habitar, tanto o ambiente terrestre, como o aquático. A pele, uma de suas maiores adaptações, possui diversas funções, tais como: proteção contra abrasão, respiração cutânea, osmorregulação, termorregulação e, finalmente, secreção de substâncias protetoras (Barra & Simmaco, 1995; Nascimento *et al.*, 2003).

A pele dos anfíbios tem sido fonte de uma grande variedade de substâncias com atividade biológica, todavia menos de 1/3 dos gêneros conhecidos foram avaliados (Daly *et al.*, 2004). Dois tipos principais de glândulas são observadas nos anfíbios: as glândulas mucosas e as granulosas (serosa ou venenosa). A secreção envolvida na proteção contra predadores e patógenos é produzida pelas glândulas granulosas, localizadas principalmente no tegumento da região dorsal e tais glândulas são envolvidas por miócitos e inervadas por fibras simpáticas. A estimulação adrenérgica dos miócitos provoca a contração das células serosas e a liberação do seu conteúdo (Toledo & Jared, 1995; Conlon *et al.*, 2004). A ocorrência generalizada de glândulas granulosas nos anuros sugere que elas representam uma característica primitiva da ordem. É provável que estas glândulas, antes de produzirem toxinas, estivessem envolvidas com o armazenamento e a condensação de substâncias. A secreção das glândulas granulosas nos anfíbios geralmente exerce um efeito nocivo ou tóxico por meio do contato com a mucosa da boca ou com o fluxo sanguíneo de uma grande variedade de vertebrados (Toledo & Jared, 1995).

A secreção granulosa contém um grande número de compostos biologicamente ativos como amins biogênicas, esteróides, alcalóides, bufodienólídeos, peptídeos e proteínas. Estas substâncias apresentam diversas atividades biológicas como neurotóxica, vasoconstritora, alucinógena, anestésica, hipotensiva, antimicrobiana, cardiotoxica, hemotóxica, miotóxica e citotóxica. As glândulas mucosas também participam da proteção contra predadores com a produção de compostos tóxicos ou escorregadios, além de serem responsáveis pela manutenção da umidade, lubrificação da pele, interferirem na respiração cutânea, reprodução, adesão ao substrato e termorregulação pela produção de mucinas (Toledo & Jared, 1995; Nascimento *et al.*, 2003).

A composição da secreção evoluiu independentemente nos diferentes grupos de anfíbios de acordo com a sua interação com o meio ambiente. Peptídeos com atividade antimicrobiana apresentam um importante papel na imunidade inata que constitui a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, além de serem importantes para angiogênese, reparo tecidual, no processo inflamatório e na quimiotaxia (Izadpanah & Gallo, 2005). Muitos destes peptídeos prestam funções idênticas ou análogas às encontradas em peptídeos de tecidos extra-cutâneos, incluindo o sistema nervoso central e periférico e o trato gastrointestinal de todas as classes de vertebrados. Alguns exemplos destes peptídeos são *bradisinins*, *bombesins*, *dermofins* e *angiotensins*. Isto ocorre devido à origem embrionica-ectodermal comum da pele dos vertebrados e do cérebro. Assim, essas substâncias atuam como neurotransmissores, neuromoduladores, microbicidas ou neurohormônios. Portanto, estas moléculas possuem uma importância biológica comum, sendo estudadas farmacológica e clinicamente, podendo ser empregadas com fins terapêuticos (Erspamer, 1994; Barra & Simmaco, 1995).

As células sinciciais que revestem as glândulas granulosas de alguns anfíbios co-sintetizam, armazenam e co-secretam diferentes polipeptídeos, aminas e alcalóides com um amplo espectro de atividade (Erspamer, 1994 & Rollins-Smith *et al.*, 2005). Essas células funcionam como algumas células endócrinas de mamíferos (ex: células enterocromafins), as quais são conhecidas por conterem tanto aminas biogênicas quanto hormônios polipeptídicos. Funcionam como neurônios centrais e periféricos, nos quais mensageiros amínicos e peptídicos co-existem (Erspamer, 1994).

Até o momento, inúmeros peptídeos já foram isolados da secreção cutânea de anuros. Estas moléculas são agrupadas em diversas famílias com base na sua estrutura química, afinidade e espectro de atividade biológica (Erspamer, 1994). Esses polipeptídeos vêm sendo amplamente estudados devido ao aumento de bactérias resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado.

1.1. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

1.1.1. Aspectos Gerais

Devido à constante presença de microorganismos patogênicos, os organismos multicelulares apresentam um aparato de resistência denominado imunidade inata (Rinaldi, 2002). Como a resposta imune patógeno-específica ocorre lentamente, a imunidade inata age

como uma primeira linha de defesa, na qual há a produção de moléculas antimicrobianas pelas células epiteliais, atuando rapidamente e controlando o crescimento de um amplo espectro de microorganismos, além de auxiliarem em processos cicatrizatórios (Barra & Simmaco, 1995; Schröder, 1999). Esta atividade antimicrobiana ocorre por meio da alteração da membrana citoplasmática, seja por separação de fase, afinamento da membrana, formação de poros e de estruturas não-lamelares ou da quebra da camada fosfolipídica, podendo ser estes apenas passos para a desestabilização da membrana, processo que ocorre muito rapidamente (Nascimento *et al.*, 2003).

A superfície dos eucariotos superiores como as plantas, os invertebrados e os vertebrados, incluindo os humanos, é normalmente coberta por microorganismos, mas geralmente não ocorre infecção por eles. Este fato decorre, além da presença de uma barreira física, devido à produção de peptídeos antimicrobianos codificados geneticamente, sintetizados no ribossomo e detentores de 10-60 aminoácidos (Schröder, 1999; Rinaldi, 2002).

Os peptídeos bioativos são liberados por mecanismo holócrino, alguns são constitutivamente expressos, outros induzidos pela presença do microorganismo ou por citocinas endógenas pró-inflamatórias em situações de estresse ou injúria (Nicolas & Mor, 1995; Schröder, 1999; Mangoni *et al.*, 2001). Todos os peptídeos antimicrobianos derivam do processamento de um precursor que contém uma seqüência sinal e uma pró-região ácida bastante semelhantes, entretanto as suas seqüências são pouco homólogas. Isto sugere a conservação de um cassete secretor e uma provável convergência para agir de maneira ótima no ambiente no qual é produzido e contra uma ampla variedade de microorganismos locais a um reduzido custo metabólico. Esse fato reforça a hipótese que um exon codificador de peptídeo sinal de vários precursores não relacionados surgiu nos primórdios da evolução dos anfíbios. Além de que a conservação dessa seqüência sugere que a mesma deve possuir um papel adicional ainda não descoberto (Charpentier *et al.*, 1998; Hancock & Chapple, 1999). No caso dos anfíbios, a porção sinal do precursor direciona o peptídeo para um local apropriado na glândula. Quando o animal é estimulado, uma segunda protease remove a região ácida, liberando o peptídeo, o qual, após alguns minutos, é desativado por proteases, evitando a toxicidade para o animal. Modificações pós-traducionais ocorrem com freqüência e incluem a amidação C-terminal e, mais raramente, a isomerização de aminoácidos (Charpentier *et al.*, 1998; Rinaldi, 2002; Pukala *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que a amidação C-terminal provoca o aumento da atividade antimicrobiana, este fato pode estar

relacionado a mudanças no momento dipolar e à redução da susceptibilidade à degradação por carboxipeptidases (Nascimento *et al.*, 2003).

A pele de sapo tem sido utilizada com propósitos medicinais por séculos e ainda hoje é usada em países da América do Sul, incluindo o Brasil (Hancock & Chapple, 1999). O uso de veneno de *Phyllobates bicolor* para a caça e na guerra é feito na Colômbia pelos índios do Chocó. Essa substância, conhecida localmente como kokoi, é extremamente tóxica e utilizada na ponta de flechas de zarabatanas (Marki & Witkop, 1963; Myers & Daly, 1983).

O primeiro peptídeo antimicrobiano (*bombinin*) foi isolado há quase quarenta anos da secreção cutânea de *Bombina variegata* (Csordas & Michl, 1970), todavia o estudo dessas moléculas só se intensificou e consolidou no final da década de 80 com o isolamento das *magainins* de *Xenopus laevis* por Zasloff (1987), detentoras de uma ampla atividade contra fungos, bactérias e protozoários (Barra & Simmaco, 1995; Rinaldi, 2002; Nascimento *et al.*, 2003).

Os peptídeos antimicrobianos provenientes do veneno de anuros possuem algumas características em comum, tais como: 10–50 resíduos de aminoácidos, um grande número de resíduos hidrofóbicos, usualmente possuem uma carga total positiva, conformação em α -hélice anfipática, momento hidrofóbico alto e uma ampla face apolar em contraste com uma pequena face polar (Hancock & Chapple, 1999; Brogden, 2005). A maioria dos peptídeos antimicrobianos é composta por L-aminoácidos, todavia, estudos demonstram que D-isômeros mantêm a sua atividade antimicrobiana, sugerindo assim que esta atividade independe da interação com um receptor ou com outro centro quiral, além de reduzir a atividade hemolítica e citolítica (Conlon *et al.*, 2005; Conlon *et al.*, 2007a). Pequenos peptídeos antibióticos como os *bombinins* H 3-5 possuem L- e D-aminoácidos. Esta coexistência resulta em uma estrutura única com propriedades completamente diferentes dos peptídeos formados exclusivamente por L-aminoácidos (Shai, 1999; Mangoni *et al.*, 2006).

Estruturalmente, os peptídeos antimicrobianos são divididos em três grupos: (1) peptídeos lineares com conformação em α -hélice anfipática sem cisteínas (ex: *magainins* e *dermaseptins*), (2) peptídeos com uma ponte dissulfeto formando um *loop* C-terminal (ex: *brevinins* e *esculetins*) e (3) peptídeos de 10-13 resíduos de aminoácidos (*temporins*), primeiramente isolados da *Rana temporaria*. Todavia, a cada ano são descobertos novos peptídeos com características estruturais únicas que acabam por constituir novas famílias, por exemplo, *tigerins*, *pseudins*, *maximins*, *japonicins*, *nigrocins* e *distinctins*. Os *tigerins* têm 11 ou 12 resíduos, estrutura em folha β , além de uma ponte dissulfeto formando um anel

nonapeptídico (e não com sete) (Sai *et al.*, 2001). O *japonicin-2* possui um anel com octapeptídeo (Isaacson *et al.*, 2002). O *temporin-1Od* e o *temporin-1Ja* isolados da *Rana ornativentris* e da *Rana japonica*, respectivamente, não possuem resíduo básico na sua seqüência, possuindo apenas a carga positiva associada ao grupo α -amino (Kim, *et al.*, 2001; Isaacson *et al.*, 2002). Um surpreendente peptídeo antimicrobiano heterodimérico foi isolado da *Phyllomedusa distincta*, *distinctin*, o qual possui duas cadeias diferentes conectadas por uma ponte dissulfeto. Em água, este peptídeo possui a conformação de folha β anti-paralela, entretanto quando em um ambiente similar ao de uma membrana, ocorre um decréscimo da conformação em folha β e um forte aumento da estrutura em hélice (Batista *et al.*, 2001).

1.1.2. Mecanismos de seletividade e toxicidade específica

Estruturas ou funções inerentes de microorganismos contribuem para a seletividade dos PAMs por esses. Primeiramente, a composição, a hidrofobicidade e a carga da membrana de microorganismos difere da dos eucariotos. A membrana dos eucariotos é constituída principalmente de fosfatidilcolina (FC), esfingomielina (EM), fosfatidiletanolamina (FE) e esteróis que são moléculas neutras. Em contrapartida, a membrana dos microorganismos é carregada de moléculas negativas, tais como fosfatidilglicerol (FG), cardiolipina (CL) e fosfatidilserina (FS) que atraem os peptídeos catiônicos. Outras características como a distribuição, composição e saturação de fofolípídios, a carga, a anfipaticidade e o potencial mais negativo das membranas interna e externa também são responsáveis pela preferência dos PAMs. Já a toxicidade dos PAMs pode ser reduzida pela localização e expressão estratégica que minimizam a interação dos mesmos com tecidos vulneráveis do hospedeiro, por exemplo, a secreção dos PAMs em superfícies epiteliais relativamente inertes como a pele dos anfíbios (Yeaman & Yount, 2003).

1.1.3. Mecanismos de ação

Análises microscópicas mostraram que diferentes PAMs apresentam distintos efeitos em microorganismos díspares, o que indica que diferentes peptídeos atuam em alvos diferentes ou possuem mecanismo de ação diferenciado (Brogden, 2005). O mecanismo de ação dos PAMs ainda é alvo de controvérsia, entretanto todos concordam que ocorre uma disruptura seletiva da membrana celular, que a atividade citolítica não é mediada por um receptor específico e que a estrutura anfipática dos peptídeos possui um papel fundamental neste mecanismo (Reddy *et al.*, 2004). Um fator importante para a atividade antimicrobiana é

o estado agregacional do peptídeo em solução, pois se verificou que peptídeos agregados usualmente não são ativos contra bactérias Gram-negativas, mas sim contra as Gram-positivas. Possivelmente isto é decorrente da presença de uma membrana externa nas primeiras que impede a rápida agregação na membrana interna para lisar a célula (Nascimento *et al.*, 2003).

As propriedades antimicrobianas e citolíticas dos peptídeos são determinadas por uma interação complexa entre **cationicidade, hidrofobicidade, α -helicidade, anfipaticidade e ângulo polar** (Powers & Hancock, 2003). A estrutura em hélice anfipática possui cadeias polares alinhadas ao longo de um lado e resíduos hidrofóbicos dispostos no lado oposto da hélice, favorecendo a interação entre os peptídeos e a estrutura anfifílica das membranas biológicas (Dathe & Wieprecht, 1999). Atualmente, sabe-se que um elevado grau de **helicidade** e/ou **anfipaticidade** (momento hidrofóbico) está correlacionado ao aumento da toxicidade contra células compostas por fosfolipídios neutros (Yeaman & Yount, 2003). Assim, o **momento hidrofóbico** possui um pequeno papel na permeabilização de membranas lipídicas altamente carregadas, no entanto, influencia substancialmente os efeitos dos PAMs em membranas lipídicas neutras (Dathe & Wieprecht, 1999). Estudos com difração circular mostraram que a conformação em hélice é atingida apenas no contato com vesículas fosfolipídicas ou com um solvente mimetizador de membrana, o que altera o momento hidrofóbico e o ângulo polar, conseqüentemente previne a atividade citotóxica do PAM até que ele atinja o seu alvo (Conlon *et al.*, 2007a).

Já a **cationicidade** (grande número de aminoácidos básicos distribuídos ao longo da face hidrofílica da hélice, varia geralmente de +2 a +9) faz com que ocorra uma maior afinidade dos peptídeos pelos fosfolipídios ácidos, carregados negativamente, (ex: FG, FE e CL) situados nas membranas das bactérias, ao invés de interagirem com os fosfolipídios zwitteriônicos (ex: FC e EM) expostos nas células de mamíferos (Figura 1). Todavia, estudos demonstraram que o excesso de cationicidade pode aumentar a atividade hemolítica e reduzir a antimicrobiana dos peptídeos, por causa do aumento da repulsão intermolecular nos poros (Dathe & Wieprecht, 1999).

A importância da **hidrofobicidade**, porcentagem de resíduos hidrofóbicos, foi demonstrada por Wieprecht *et al.* (1997) com o aumento do momento hidrofóbico de análogos de *magainin*, onde ocorreu um aumento da ligação do peptídeo à membrana devido ao aumento das interações hidrofóbicas entre as cadeias acil dos lipídios e a porção hidrofóbica da hélice. O aumento dos níveis de hidrofobicidade, momento hidrofóbico e

helicidade estão fortemente relacionados ao aumento da citotoxicidade contra células de mamíferos e bactérias Gram-positivas, e perda de especificidade para bactérias Gram-negativas (Dathe *et al.*, 1997; Blondelle *et al.*, 1999; Dathe & Wieprecht, 1999).

O **ângulo polar** é uma medida da proporção relativa de facetas polares *versus* não-polares de um peptídeo em α -helice. Em inúmeros estudos, um pequeno ângulo polar (e então uma grande superfície hidrofóbica) foi associado à grande capacidade de permeabilizar membranas, e a uma maior estabilidade e meia-vida dos poros. (Yeaman & Yount, 2003).

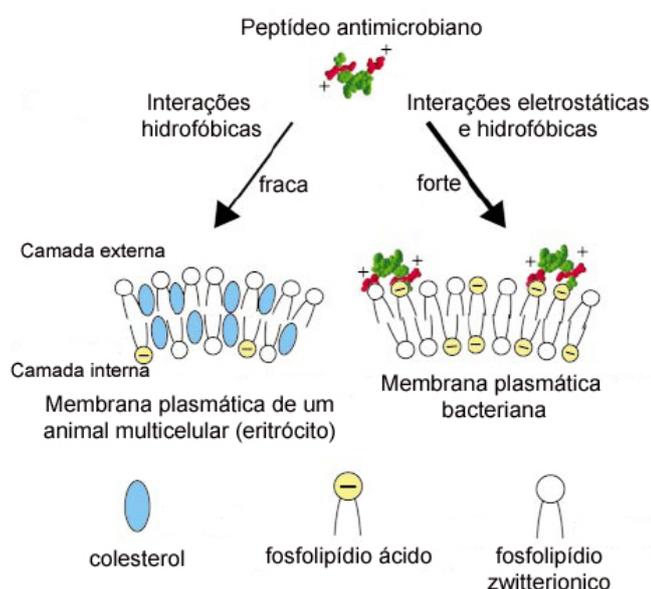


Figura 1. Mecanismo da especificidade de peptídeos antimicrobianos pela membrana citoplasmática das bactérias (Modificado de Zasloff, 2002).

Um grande número de peptídeos se liga a lipopolisacarídeos (LPS) da parede celular de bactérias Gram-negativas e a ácidos teicóicos em Gram-positivas, tornando a membrana externa destes microorganismos permeável aos peptídeos. Como os peptídeos catiônicos possuem uma afinidade pelo menos três vezes maior para estas moléculas do que os LPS pelos cátions divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} , eles desalojam competitivamente estes íons e desordenam a membrana externa por serem volumosos. A membrana externa sofre pequenas rachaduras que permitem a passagem de uma variedade de moléculas, inclusive do peptídeo. Os processos que se seguem ainda não são bem compreendidos. Entretanto, nem sempre existe uma correlação direta entre a ligação aos LPS e a atividade antimicrobiana. Outros peptídeos também podem se ligar às moléculas de ácido siálico presentes na superfície de

eritrócitos, mas a ligação e a penetração são menos eficientes (Hancock & Chapple, 1999; Shai, 1999; Nascimento *et al.*, 2003).

Estudos *ex vivo* indicaram que alguns peptídeos formam canais heterogêneos voltagem-dependente permeáveis a íons em membranas lipídicas planas. Estes canais possuem tamanhos e duração variada, sendo que a sua formação pode ser explicada pelo mecanismo *barrel-stave*.

Modelo *Barrel-stave*: Este mecanismo envolve a ligação paralela e inserção perpendicular de monômeros em α -hélice anfipática na membrana formando poros, de modo que sua superfície hidrofóbica interaja com o núcleo lipídico da membrana e a sua face hidrofílica revista o centro, formando um poro aquoso (Figura 2A). A orientação perpendicular dos peptídeos na membrana só ocorre após o aumento da proporção entre peptídeos/lipídios. Esse é o modelo mais aplicável para peptídeos citolíticos de células bacterianas e de mamíferos (Conlon *et al.*, 2007a). O tamanho do poro aumenta a partir do recrutamento de novos monômeros, levando ao vazamento do conteúdo celular e, conseqüentemente, à morte da célula. O recrutamento de monômeros é crucial para a inserção dos peptídeos, visto que não é energeticamente favorável a inserção de uma única α -hélice anfipática (Hancock & Chapple, 1999; Shai, 1999; Nascimento *et al.* 2003; Reddy *et al.*, 2004). Existe ainda um tipo particular deste modelo chamado de ***Poro Toroidal***. Um mecanismo que atende a peptídeos que interagem fortemente com grupos lipídicos, por exemplo, *magainin* de *X. laevis*. Neste modelo, os peptídeos em α -hélice se orientam paralelamente a membrana e após atingirem um limiar de concentração, se inserem perpendicularmente na camada lipídica, todavia a ligação entre o monômero e o lipídio não é quebrada durante a reorganização da camada lipídica, formando ao final um poro aquoso de meia vida curta, íon seletivo e com a parede formada por monômeros do peptídeo intercalados com lipídios da membrana biológica (Figura 2B) (Nascimento *et al.* 2003; Brogden, 2005).

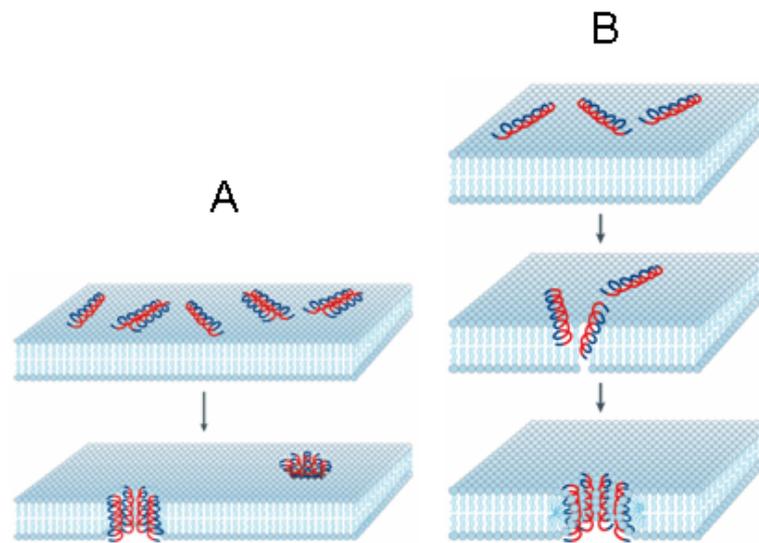


Figura 2. (A) Representação esquemática do modelo *barrel-stave*. 1) Os peptídeos se ligam à membrana plasmática tomando a conformação de α -hélice. 2) Ligação de mais peptídeos à membrana. 3) Inserção das hélices na bicamada lipídica. 4) Recrutamento de mais monômeros para aumento do poro. 5) Vazamento do material citoplasmático, seguida da morte celular. (B) Esquema do modelo poro toroidal onde os peptídeos se intercalam aos fosfolípidios para formar o poro. O azul das hélices (peptídeos) representa a face hidrofílica e o vermelho a hidrofóbica (Retirado de Brogden, 2005).

Entretanto a formação de canais pelo modelo acima nem sempre explica a quebra da integridade da membrana por certos peptídeos. Assim, mecanismos alternativos sugeriram, por exemplo, o modelo *carpet-like*.

Modelo Carpet-like: Este modelo foi descrito primeiramente para *dermaseptins*. Nele, as moléculas de peptídeo saturam a superfície da membrana se ligando preferencialmente às cabeças dos fosfolípidios. Após o alinhamento dos monômeros de modo que as suas superfícies hidrofílicas estejam em contato com as cabeças dos fosfolípidios ou com as moléculas de água, ocorre a reorientação dos resíduos hidrofílicos em direção ao centro hidrofóbico da membrana, sem, entretanto, perderem o contato com as cabeças dos fosfolípidios. Provocando a desagregação da membrana através da quebra da integridade da sua curvatura (Figura 3) (Shai, 1999; Nascimento *et al.* 2003; Yeaman & Yount, 2003; Reddy *et al.*, 2004).

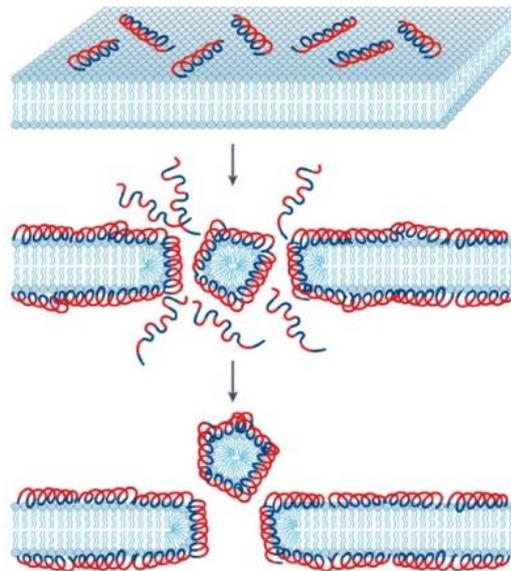


Figura 3. Ilustração do modelo *carpet-like*. 1) Ligação dos peptídeos aos fosfolipídios da membrana. 2) Alinhamento dos monômeros de peptídeo de modo que os resíduos hidrofóbicos fiquem em contato com as cabeças dos fosfolipídios. 3) Reorientação dos peptídeos para o centro hidrofóbico da membrana. 4) Desintegração da membrana devido a quebra da curvatura (Retirado de Brogden, 2005).

Modelo Shai-Matsuzaki-Huang: Envolve a formação de tapete e de poro pela adesão de moléculas de peptídeos à membrana externa dos microorganismos, causando o seu adelgaçamento. A bicamada é esticada e ocorre a formação de poros, os quais permitem a passagem dos peptídeos que podem difundir para o citoplasma celular, atingindo possíveis alvos intracelulares. Por último, a membrana tem a sua integridade perdida (Nascimento *et al.* 2003). Este modelo contempla pequenos peptídeos que não podem atravessar completamente a membrana, sendo assim impossível a formação do poro multimérico do modelo *barrel-stave*. Também leva em consideração a entrada do peptídeo dentro da célula, interferindo, por exemplo, nas funções metabólicas, como ocorre com a molécula *magainin 2* e uma *dermaseptin* em *Escherichia coli*. Estes achados indicam que os peptídeos antimicrobianos de anfíbios podem ter múltiplos alvos nas bactérias, ou seja, tanto a membrana citoplasmática como sítios intracelulares (Figura 4) (Zasloff, 2002; Nascimento *et al.* 2003; Reddy *et al.*, 2004).

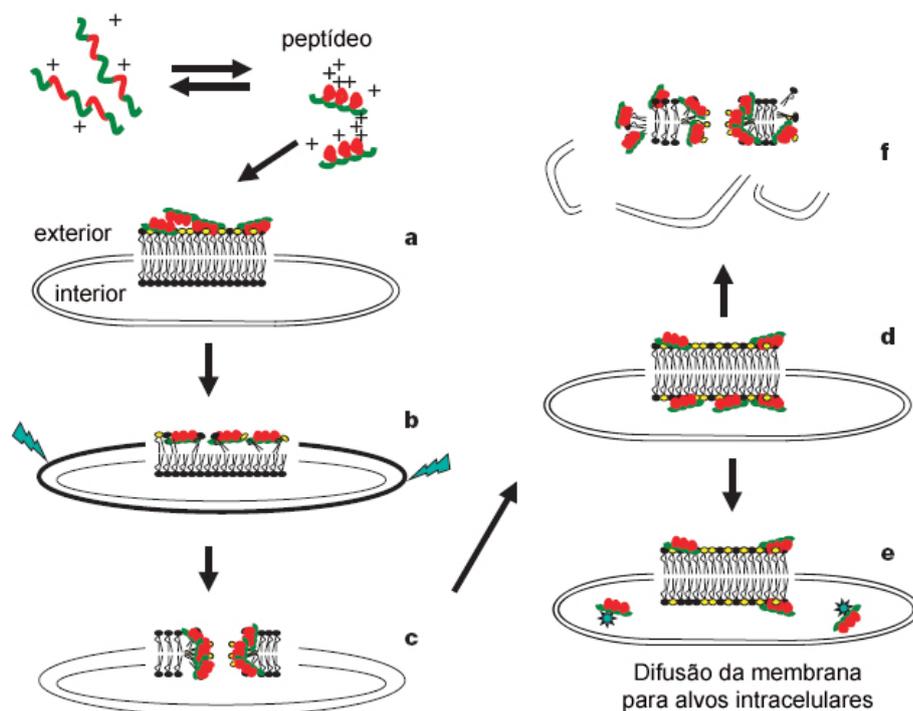


Figura 4. Esquema do modelo *Shai-Matsuzaki-Huang*. a) Formação de um carpete de peptídeos na camada externa da membrana. b) Integração do peptídeo à membrana e afinamento da camada externa. c) Formação de poros transitórios. d) Transporte de lipídios e peptídeos para a camada interna. e) Difusão dos peptídeos para alvos intracelulares (em alguns casos). f) Colapso da membrana em fragmentos. (Modificado de Zasloff, 2002).

Uma vez no citoplasma, os peptídeos translocados podem alterar a formação do *septum* da membrana citoplasmática, inibir a síntese da parede celular, inibir a atividade enzimática, alterar a renaturação de proteínas, promover perda de ATP, dentre outros mecanismos (Figura 5) (Brogden, 2005). Portanto, os PAMs podem matar a mesma espécie de patógeno por mais de um mecanismo de ação, dependendo de fatores individuais como fase de crescimento, localização tecidual, e a presença ou ausência de outros mecanismos imunes ou agentes antimicrobianos exógenos sinérgicos (Yeaman & Yount, 2003).

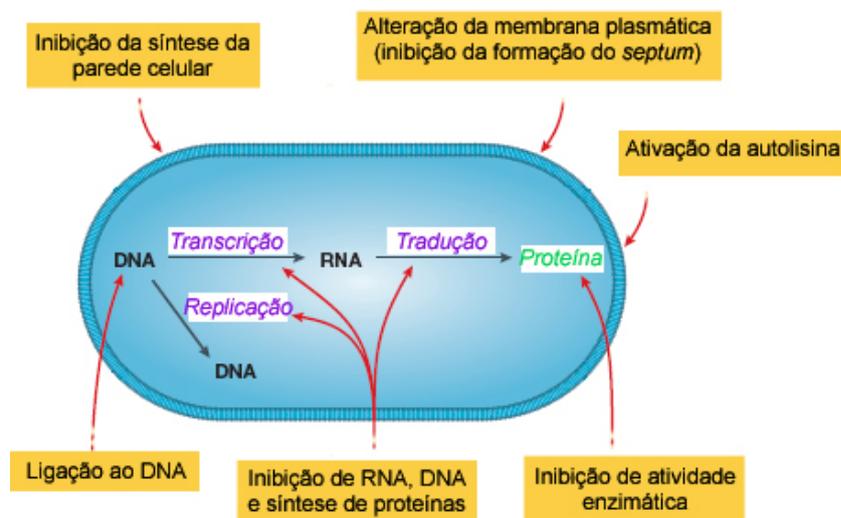


Figura 5. Esquema simplificado do modo de ação intracelular de peptídeos antimicrobianos. Modificado de Brogden (2005).

1.1.4. Aplicações

Um dos mais fascinantes aspectos oriundos de estudos de peptídeos ativos de anfíbios é que a maioria dos peptídeos das secreções apresenta múltiplas funções. Por exemplo, o neuropeptídeo *caerulein*, presente em *Leptodactylus labyrinthicus*, contrai e relaxa músculo liso, afeta a pressão sanguínea e é um potente analgésico (Pukala *et al.*, 2006).

Taxonomia e filogenia

Apesar da estrutura primária dos peptídeos antimicrobianos de várias famílias de anuros apresentarem uma baixa similaridade, a seqüência de aminoácidos do peptídeo sinal e da pró-região ácida é bastante conservada nos diferentes precursores. Esta observação leva à especulação de que estes peptídeos derivaram de um gene ancestral comum e que a atual diversidade dessas moléculas deve-se a múltiplas duplicações deste gene em cada espécie. Durante os processos evolutivos, a pró-região N-terminal foi conservada enquanto a região funcional C-terminal desenvolveu-se rapidamente em resposta à exposição aos diversos microorganismos, originando uma grande variedade de peptídeos com atividade antimicrobiana. Esta grande heterogeneidade molecular pode ser utilizada para a identificação de espécies e para um melhor entendimento das inter-relações filogenéticas entre as espécies (Conlon *et al.*, 2004).

Transgênicos

Alguns grupos de pesquisa estão utilizando peptídeos antimicrobianos na construção de plantas e animais transgênicos. Um destes trabalhos foi publicado por Ponti *et al.* (2003), no qual foi expresso o peptídeo *esculetin-1* de *Rana esculenta* na planta *Nicotiana tabacum*, provendo à planta uma maior resistência a fitopatógenos bacterianos e fúngicos, além de propriedades inseticidas.

Uso terapêutico

O potencial terapêutico dos peptídeos antimicrobianos é atribuído a sua capacidade de lisar membranas, matando rapidamente um amplo espectro de microorganismos, inclusive fungos, bactérias e vírus resistentes à múltiplas drogas (Reddy *et al.*, 2004). Devido ao seu mecanismo de ação relativamente não específico, o surgimento de resistência aos peptídeos pelos microorganismos ocorre a uma taxa bem menor que a dos antibióticos convencionais (Conlon *et al.*, 2004). Outro fator positivo é o sinergismo que ocorre com o uso concomitante destes peptídeos com antibióticos clássicos e com misturas de peptídeos (com estrutura e origem bastante diferente para evitar o aumento da toxicidade), bastante útil no combate às infecções por patógenos multi-resistentes (Barra & Simmaco, 1995; Nascimento *et al.*, 2003).

Entretanto, os maiores obstáculos para o uso dos peptídeos como agentes anti-infecciosos são a sua toxicidade, principalmente se forem administrados sistemicamente, e a pequena meia-vida na circulação. O uso de D-peptídeos tem sido sugerido como possível uso sistêmico, já que não são degradados pelas enzimas, mantêm a atividade antimicrobiana, além de perderem a atividade hemolítica (Papo & Shai, 2004; Mangoni *et al.*, 2006). Experimentos realizados por Conlon *et al.* (2007a) sugerem uma estratégia para produzir análogos mais eficazes: aumentar seletivamente a cationicidade e anfipaticidade e, ao mesmo tempo, reduzir a helicidade e a hidrofobicidade. Pequenas alterações estruturais provocam profundas mudanças conformacionais, por tanto, o desenho de análogos é um processo bastante delicado, que deve ser realizado com bastante cuidado.

Estudos mostraram que os peptídeos antimicrobianos também são nocivos para protozoários como, por exemplo, derivados de *dermaseptin S3* matam o parasita *Plasmodium falciparum* intraeritrociticamente sem lisar o eritrócito (Nascimento *et al.*, 2003). Outro achado é o peptídeo *dermaseptin DS-01* isolado de *Phylomedusa oreades* e *P. distincta*, o qual possui atividade contra *Trypanossoma cruzi* na sua forma tripomastigota, podendo ser usado na prevenção de infecções durante a transfusão de sangue (Leite *et al.*, 2005). Os

peptídeos *bombinins H2 e H4* foram recentemente descritos como detentores de atividade anti-*Leishmania* (Mangoni *et al.*, 2006).

Os peptídeos antimicrobianos isolados de anfíbios também demonstraram serem eficazes na luta contra o vírus HIV, visto que os peptídeos *caerin 1.1*, *caerin 1.9*, *maculatin 1.1* e *dermaseptin 4* inibiram a infecção das células T em concentrações não tóxicas às células-alvo, além de combaterem também algumas DSTs associadas ao aumento da transmissão do vírus HIV como, por exemplo, o vírus da herpes (Rinaldi, 2002; Reddy *et al.*, 2004; Lorin *et al.*, 2005; VanCompernelle *et al.*, 2005).

Poucos peptídeos foram testados para um potencial contraceptivo, mas estudos recentes demonstraram uma atividade espermicida de *magainin-A* (Reddy, Shahani & Meherji, 1996) e de *dermaseptin-4* (Zairi *et al.*, 2005).

Um uso em potencial para *dermaseptins* é como carreador de drogas terapêuticas. O peptídeo *dermaseptin K4-S4(1-13)a* se liga à membrana dos eritrócitos e é transportado pela corrente sanguínea até encontrar o microorganismo-alvo pelo qual possui uma maior afinidade, ligando-se à sua membrana e provocando a lise celular (Rinaldi, 2002 & Nascimento *et al.*, 2003).

Em estudos realizados por Doyle e sua equipe (2003) *citropin 1.1* demonstrou atividade antitumoral e função inibidora de nNOS (isoforma neuronal da óxido nítrico sintase).

Tratamento de infecção de peixes, preservadores de alimentos e flores, aerossol contra infecções pulmonares contra *Pseudomonas aeruginosa*, tratamento de candidíase oral em pacientes imunocomprometidos e de acne são alguns usos em potencial dos peptídeos de anfíbios (Nascimento *et al.*, 2003; Conlon *et al.*, 2007a).

A descoberta de novos peptídeos pode inspirar o desenho de análogos, sintetizados quimicamente em fase sólida, por síntese recombinante, pelo sistema de expressão em baculovírus ou em fungos ou por transgenia em plantas ou animais (Schröder, 1999; Rinaldi, 2002). Atualmente, vários peptídeos antimicrobianos de anfíbios estão passando por testes laboratoriais, entretanto poucos chegaram aos testes clínicos como o *pexiganan* (fase III), derivado de *magainin*, previsto para o tratamento de ulcerações infecciosas nos pés de diabéticos (Reddy, *et al.*, 2004).

1.1.5. Mecanismos de resistência bacteriana aos PAMs

Apesar da atividade dos PAMs contra as bactérias não ser via receptor, as bactérias apresentam inúmeros mecanismos para resistirem à ação dessas moléculas. Os mecanismos de resistência atuam em contrapartida ao mecanismo de ação dos PAMs (Tabela 1). Existem dois tipos fundamentais de resistência adotados pelos patógenos resistentes: resistência constitutiva e resistência induzida.

Os mecanismos de resistência constitutiva são propriedades inerentes ao organismo e são normalmente expressas. Esses mecanismos incluem alteração da energia da membrana (ex: redução do potencial transmembrana), apresentação de glicocálices (carregados negativamente) na membrana e escolha de nichos específicos.

Já a resistência adaptativa envolve respostas coordenadas ao estresse causado pelos PAMs. Essas estratégias de resistência envolvem a regulação da expressão gênica. Por exemplo, ocorre a expressão de peptidases, modificações sintéticas e enzimáticas de estruturas da superfície de membrana, produção de sistemas de efluxo dos PAMs dependentes de energia, além da modificação de alvos intracelulares (Yeaman & Yount, 2003; Brogden, 2005).

Tabela 1. Paralelismo entre os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos e os de resistência apresentados pelos microorganismos. Adaptado de Yeaman & Yount (2003).

Local	Mecanismo de ação	Mecanismo de resistência
Tecido do hospedeiro	Imunidade contexto específica/	Fuga do sistema imune
	Sinergismo	nicho-específica
	Oponização	Alteração da cápsula aniônica
	Estrutura resistente a protease	Proteases
Membrana externa	Componentes negativos como alvo	Amidação dos constituintes de lipídio A
Parede celular	Interferência na integridade da parede celular	Modificação das vias da parede celular ou precursores
Membrana citoplasmática	Fosfolipídios eletronegativos como alvo	Modificação de fosfolipídios de membrana

	Exploração do potencial transmembrana	Redução do potencial transmembrana
	Transição de conformação/ multimerização	Prevenção da transição de fase/ multimerização
Citoplasma	Acesso intracelular	Efluxo peptídico
	Atuação em ligantes intracelulares específicos	Modificação de alvos intracelulares específicos
	Estrutura resistente às proteases	Proteases
	Atuação em organelas intracelulares	Modificação de organelas intracelulares
Ácido nucléico	Atuação em motivos específicos de ácido nucléico	Mutação da seqüência de pares de base
	Sinergismo de efeitos	Adaptação coordenada

1.2. Peptídeos com atividade anticarcinogênica (PACs)

Apesar dos recentes avanços na terapêutica do câncer, ele continua sendo a maior fonte de morbidade e mortalidade no mundo. O termo câncer se refere a diferentes tipos de doenças, afetando diferentes tecidos e tipos de células. Entretanto, todas as formas de câncer são caracterizadas pelo crescimento celular anormal, resultante de mutações genéticas induzidas pelo ambiente ou herdadas (Hoskin & Ramamoorthy, 2008). Os tumores são caracterizados por comportamentos específicos como ilimitado potencial replicativo, auto-suficientes a sinais de crescimento, ou seja, produzem seus próprios fatores de crescimento, insensíveis a fatores inibidores do crescimento, conseguem escapar da morte celular, apresentam angiogênese intensa e são evasivos ao sistema imunológico, sendo essas características também os principais alvos para o desenvolvimento de novas drogas (Figura 6) (Bhutia & Maiti, 2008).

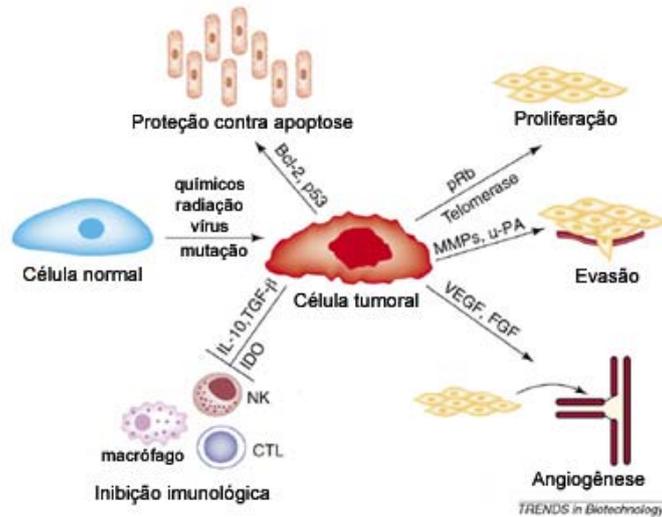


Figura 6. Alvos terapêuticos para regressão tumoral. Abreviações: CTL, linfócito T citotóxico; FGF, fator de crescimento de fibroblasto; IDO, idolamina 2,3 dioxigenase; IL-10, interleucina-10; MMP, metaloprotease de matriz; NK, células *natural killers*; pRb, proteína retinoblastoma; TGF- β , fator transformador do crescimento- β ; u-PA, ativador plasminogênico do tipo uroquinase; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular. Modificado de Bhutia & Maiti (2008).

Embora cânceres localizados possam ser tratados por cirurgia ou radioterapia, a quimioterapia continua sendo o tratamento de escolha para os casos mais graves. Todavia, os agentes quimioterápicos convencionais, os quais exibem atividade contra células em proliferação pela inibição da síntese de ácido nucléico, causam indesejáveis efeitos colaterais. Além disso, células cancerígenas quiescentes ou que se proliferam lentamente são refratárias a esse tipo de tratamento. O tratamento é ainda complicado pela resistência adquirida pelos tumores aos quimioterápicos, por exemplo, expressão de enzimas desintoxicadoras e transportadores de drogas (ex: P-glicoproteína), habilidade em reparar o DNA danificado, alteração da interação entre a droga e o seu alvo e defeitos na maquinaria que leva à apoptose (Dennison *et al.*, 2006; Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

A resistência é então um dos maiores problemas enfrentados no tratamento do câncer, sendo assim de extrema importância a descoberta de novas drogas que ajam especificamente em células tumorais e que não sejam propensas aos efeitos da resistência multi-drogas (RMD). Recentemente, o desenvolvimento de terapias baseadas em peptídeos antimicrobianos tem surgido como uma nova estratégia no tratamento do câncer. Esses tratamentos são vantajosos pelos peptídeos serem altamente específicos para os seus alvos,

apresentarem baixa toxicidade, boa penetrabilidade nos tecidos devido aos seus reduzidos tamanhos, atuarem rapidamente, não estimularem o aparecimento de resistência pelas células, apresentarem sinergismo com quimioterápicos clássicos, possuírem um amplo espectro de atividade e serem capazes de destruir tumores primários, além de prevenir metástase (Shadidi & Sioud, 2003; Bhutia & Maiti, 2008; Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

Na última década, estudos revelaram que muitos peptídeos antimicrobianos apresentavam atividade anticarcinogênica (PAC). Esses peptídeos possuem importante papel na imunidade inata de diversos organismos, além do recente surgimento de evidências que eles também modulam a imunidade, afetando infecções e inflamações. Atualmente, sugere-se que a atividade antitumoral desses peptídeos deriva primariamente da interação com a membrana plasmática das células ou com a membrana mitocondrial (Dennison *et al.*, 2006). De acordo com o espectro de atividade, os PAMs são divididos em dois grupos. O primeiro grupo inclui peptídeos que são extremamente potentes contra bactérias e células de câncer, mas que não afetam células normais de mamíferos (ex: *magainins*). O outro grupo é formado por peptídeos tóxicos para bactérias, células tumorais e normais de mamíferos (ex: *melittin*). Todavia, nem todos os PAMs apresentam atividade antitumoral (Papo & Shai, 2005).

Um diverso espectro de organismos produz PACs, entretanto, a maior fonte desses peptídeos é a pele dos anfíbios (ex: *aurein 1.2*, *citropin 1.1*, *gaegurins*, *magainins*). Muitos anfíbios possuem secreções glandulares que contêm pelo menos um peptídeo antibiótico de amplo espectro, juntamente com outros que apresentam um espectro limitado de atividade contra uma ou poucas bactérias. Muitos desses peptídeos antibióticos de amplo espectro de ação apresentam a porção C-terminal amidada e também exibem atividade anticâncer. Essa dupla função sugere que o mecanismo de ação de ambas as atividades é similar (Pukala *et al.*, 2006).

Magainins são os PACs isolados de anfíbios mais estudados. O peptídeo *magainin 2* e seus análogos sintéticos causam uma rápida lise de linhagens celulares hematopoiéticas e de tumores sólidos a concentrações 5–10 vezes menores que a concentração causadora de lise em neutrófilos e linfócitos humanos normais. Lehmann *et al.* (2006) também revelaram que *magainin 2* é ativo contra células de câncer de bexiga, apresentando um IC₅₀ de aproximadamente 200 µM. Experimentos indicaram que as macromoléculas *magainins* lisam as células tumorais pela formação de canais iônicos na membrana celular, contudo, outros estudos evidenciam a desestabilização da membrana pelo modelo *carpet-like*. Recentemente, demonstrou-se que esses peptídeos entram na célula por um mecanismo independente de

energia e receptor, podendo levar a célula à apoptose por meio da formação de poros nas mitocôndrias. Portanto, ainda não está claro se os PAMs *magainins* matam células tumorais humanas primariamente por lise da membrana e/ou apoptose (Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

1.2.1. Mecanismos de ação dos PACs

Atividade necrótica

A maioria dos peptídeos atuantes em membranas se liga rapidamente à membrana plasmática das células tumorais desestabilizando-a e levando à necrose. A membrana citoplasmática das células cancerígenas hiper-expressam FS carregada negativamente e mucinas O-glicosiladas, o que torna a membrana dessas células mais negativa que a das células eucarióticas normais. Esses peptídeos, frequentemente pequenos, catiônicos e anfipáticos, causam desestabilização da membrana tanto pelo modelo *carpet-like* como pelo *barrel-stave*, levando à morte necrótica das células tumorais, sendo que os peptídeos que atuam como no último modelo também lisam células normais. Os peptídeos necróticos possuem uma alta especificidade para células tumorais, atuam independentemente do estado proliferativo das células e são ativos contra células de câncer RMD por não atuarem em receptores. Experimentos demonstraram que o potencial de membrana é fundamental para a atividade desses peptídeos (Papo & Shai, 2005; Bhutia & Maiti, 2008). Durante a última década, membros desse grupo foram isolados de *Litoria* sp. e apresentam atividade contra todas as classes de cânceres humanos testados (Apponyi *et al.*, 2004).

Atividade apoptótica

As células tumorais são resilientes ao processo apoptótico devido à desregulação de proteínas pró e anti-apoptóticas como Bax e Bcl-2, o que torna de grande relevância o desenvolvimento de drogas detentoras de atividade apoptótica. A maioria das drogas indutoras de apoptose não age diretamente na maquinaria apoptótica, induzindo apoptose indiretamente, atingindo sinais responsáveis pela sobrevivência e proliferação celular (Alam, 2003).

Os alvos apoptóticos que estão atualmente sendo explorados para o tratamento de câncer incluem o fator de necrose tumoral (TNF) relacionado a receptores induzidos por

ligantes relacionados à apoptose (TRAIL), proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, proteínas inibidoras da apoptose (IAP) e MDM2 (Figura 7) (Fesik, 2005).

Vários peptídeos catiônicos como *magainin 2* e derivados de *gaegurin 6* são capazes de induzir apoptose. Os resultados do estudo com *magainin* sugerem perturbação da membrana mitocondrial, a qual é carregada negativamente, levando à liberação do citocromo c que promove o processo apoptótico (Kim *et al.*, 2003; Papo & Shai, 2005; Bhutia & Maiti, 2008).

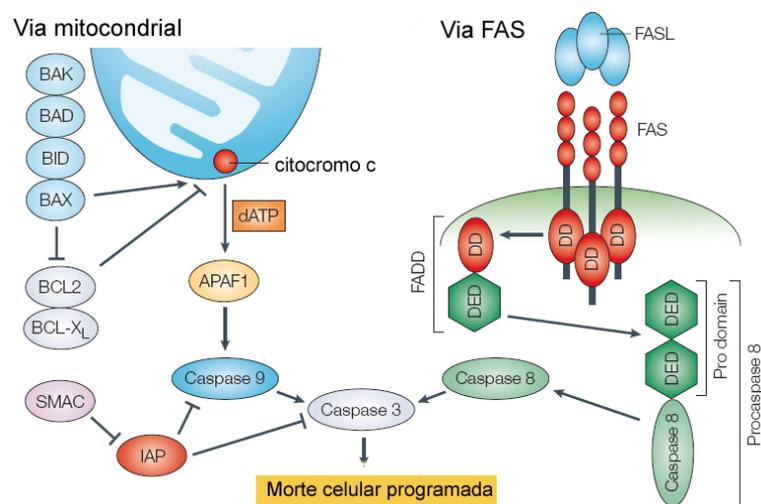


Figura 7. Representação simplificada das duas principais vias de sinalização para a morte celular programada. Modificado de Fesik (2005).

Peptídeos que interagem com receptores

Pequenos peptídeos que atuam em receptores, principalmente nos hormonais, têm sido alvo de grandes estudos. Isso porque análogos de receptores hormonais exibem uma potente atividade anticâncer (Leuschner & Hansel, 2005). Por exemplo, peptídeos antagonistas da bradicinina foram desenvolvidos para atuarem contra três aspectos do desenvolvimento tumoral, crescimento, migração e invasão, oferecendo uma terapia combinatória em uma única droga. Outros alvos como os receptores dos fatores que promovem a angiogênese também vêm sendo estudados (Bhutia & Maiti, 2008).

Peptídeos que atuam em genes

Observou-se que o peptídeo *melittin* atua seletivamente em células de mamífero que hiper-expressam o oncogene *ras*. Esse peptídeo estimula a produção de fosfolipase A₂ (PLA₂) pelo oncogene das células transformadas, levando à destruição seletiva (Sharma, 1992).

Peptídeos que se ligam às proteínas de adesão celular

Inibidores da adesão celular alteram as propriedades das proteínas da matriz extracelular, as quais possuem um papel central na invasão tumoral e angiogênese (Shadidi & Sioud, 2003).

Inibidores das proteínas cinases

As proteínas cinase C fazem parte da família das serino/treonina cinases, as quais estão envolvidas na transdução de sinais para a proliferação celular, diferenciação, apoptose e angiogênese. A desregulação dessas proteínas provoca tumorigenicidade e resistência a drogas. As proteínas cinases são comumente ativas nas células de câncer, o que as torna um alvo atrativo para a terapia anticâncer. Pequenos peptídeos como o *P15* estão sendo testados para inibirem a interação das cinases com o seu substrato sem efeitos colaterais, todavia, essa é uma tarefa difícil pelos múltiplos papéis desempenhados por essas proteínas (Mackay & Twelves, 2007).

Inibidores de proteases

Tumores expressam várias proteases responsáveis pela invasão e metástase. As principais classes de proteases atuantes nesses eventos são as catepsinas, uroquinases e metalopeptidases (MMP), tornando-se, portanto, os principais alvos para a terapêutica. Inibidores de proteases podem atuar inibindo estágios da progressão do câncer (Figura 8). Para ilustrar, peptídeos cíclicos contendo a sequência His-Trp-Gly-Phe inibem seletivamente as MMP-2 e MMP-9, suprimindo a angiogênese, migração e invasão de tumores (Yip *et al.*, 1999; Bhutia & Maiti, 2008). Entretanto, estudos recentes demonstraram um grande número de proteases com atividade antitumoral (López-Otín & Matrisian, 2007).

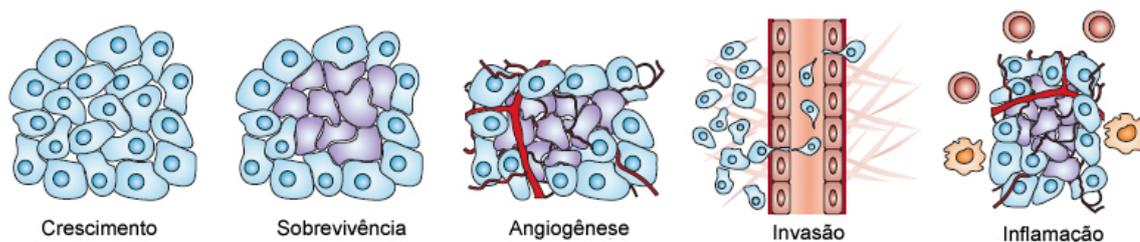


Figura 8. Estágios do desenvolvimento do câncer que podem ser alvos de inibidores de proteases. Modificado de López-Otín & Matrisian (2007).

Atividade antiangiogênica e antivascular

Inibidores da angiogênese podem interferir em qualquer passo da formação de um novo vaso sanguíneo, dentre eles a degradação da membrana basal do endotélio, proliferação e migração das células endoteliais, inibindo assim o crescimento e a metástase do tumor (Figura 9) (Fan *et al.*, 2006). A expressão diferenciada de marcadores na superfície do endotélio de vasos sanguíneos de tumores é um ótimo alvo para a terapia do câncer. Uma grande vantagem em utilizar esses alvos é que as células vasculares tumorais são geneticamente estáveis e, portanto, menos propensas a se tornarem resistentes a drogas (Shadidi & Sioud, 2003).

A maioria dos inibidores endógenos da angiogênese é formada por fragmentos complexos muito grandes para penetrarem na célula, fácil de serem eliminados pelo organismo e muito caros para serem comercializados como drogas. Assim, inúmeros estudos buscam o desenvolvimento de peptídeos que imitem os efeitos dessas moléculas, mas sem as suas desvantagens (Brannon-Peppas & Blanchette, 2004; Bhutia & Maiti, 2008).

Agentes antivasculares atuam destruindo rapidamente e seletivamente vasos já existentes, levando à morte das células do tumor. Peptídeos que se ligam seletivamente a vasos sanguíneos de tumores e induzem a coagulação e/ou a morte celular estão sendo desenvolvidos. O peptídeo *exherin*, inibidor de *N-cadherin*, envolvido na integridade estrutural dos vasos sanguíneos, causa hemorragia em tumores de células animais e se encontra na fase I dos testes clínicos (Tozer, Kanthou & Baguley, 2005).

Atividade imunoestimulatória

Em cânceres, a resposta imune do paciente é geralmente fraca ou suprimida. A produção de moléculas imuno-supressoras pelas células tumorais faz com que as mesmas driblem o sistema imunológico. Portanto, é importante a estimulação do sistema imunológico

do paciente em tratamento. Por exemplo, o dipeptídeo de origem microbiana muramil (MDP) atua como adjuvante de vacina e demonstra potencial para o combate ao câncer (Bhutia & Maiti, 2008).

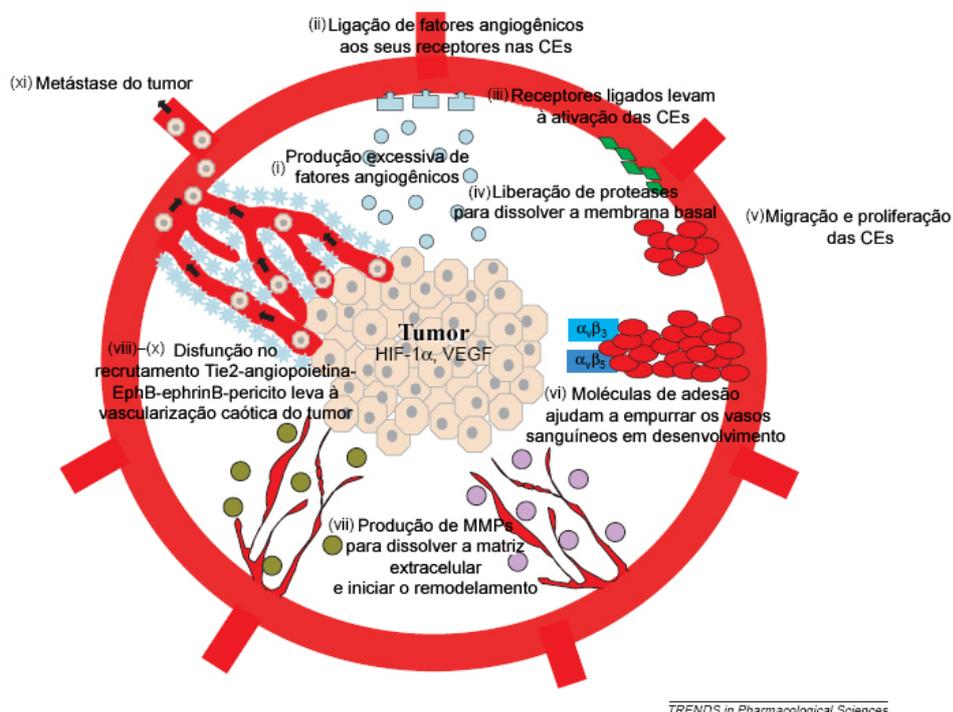


Figura 9. Etapas da angiogênese e metástase tumoral susceptíveis à inibição por peptídeos antiangiogênicos. CEs- células endoteliais; MMPs- metaloproteinasas; VEGF- fator de crescimento endotelial; HIF-1 α - fator induzido por hipóxia. Modificado de Fan *et al.* (2006).

1.2.2. A seletividade dos PACs pelas células tumorais

Mudanças na membrana de uma célula são de extrema importância para o desenvolvimento do câncer. Para ilustrar, a expressão de certos constituintes na membrana promove a habilidade de crescer na ausência de sinais estimulatórios, de atacar e responder diferentemente às células vizinhas, afetar a mobilidade das células cancerígenas, facilitando a invasão e a metástase.

Diferenças entre a membrana das células tumorais e normais são responsáveis pela especificidade de certos PACs (outrora referidos como PAMs) contra células de câncer. As interações eletrostáticas entre os PACs catiônicos e os componentes aniônicos da membrana celular são as maiores responsáveis pela especificidade desses peptídeos.

As membranas das células cancerígenas são carregadas negativamente devido à presença de moléculas aniônicas tais como a FS, as mucinas O-glicosiladas e ácido siálico. Além disso, o potencial de membrana mais negativo dessas células anormais também pode contribuir para a seletividade dos PACs. Outros fatores como a maior fluidez da membrana (por causa da reduzida quantidade de colesterol) que facilita a sua desestabilização e a maior área superficial devido à presença de inúmeras microvilosidades, as quais permitem a ligação de uma maior quantidade de peptídeos, também são responsáveis pela eficácia dos PACs contra as células tumorais (Dennison *et al.*, 2006; Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

Entretanto, existem PACs que são tóxicos para todos os tipos de células. Além disso, existe grande variabilidade na especificidade e na eficiência para diferentes células-alvo. Vários estudos sugerem que a seletividade também pode depender de características físico-químicas e estruturais do peptídeo, juntamente com a organização e a composição da membrana-alvo e de camadas associadas (Dennison *et al.*, 2006).

1.2.3. Estratégias para aumentar a eficiência dos PACs

Apesar do grande potencial terapêutico, o uso de peptídeos naturais tem sido inviabilizado por inúmeros fatores como meia-vida curta no sangue, baixa biodisponibilidade em tecidos e órgãos, depuração renal e potencial ativação do sistema imune (Shadidi & Sioud, 2003). O desenvolvimento de terapias baseadas em peptídeos deve possuir forte atividade tumoricida e baixa toxicidade (Kim *et al.*, 2003).

Assim, uma série de táticas tem sido adotada para melhorar a eficácia dos PACs. As mais simples são a substituição de aminoácidos e o uso de D-aminoácidos (Kim *et al.*, 2003). No último caso, experimentos revelaram uma perda da atividade citotóxica contra células normais, todavia, a atividade antitumoral foi mantida, além da redução da inativação pelo soro e degradação enzimática *in vivo* (Bessalle *et al.*, 1990; Papo & Shai, 2003; Papo & Shai, 2004; Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

Os peptídeomiméticos são outra importante abordagem, originando peptídeos altamente específicos com características farmacodinâmicas e farmacocinéticas otimizadas. A engenharia de peptídeos, onde dois peptídeos são reunidos originando um híbrido mais potente, também está sendo utilizada. É o caso da união da região NH₂-terminal de *cecropin A* (α -hélice positivamente carregada) com a região NH₂-terminal (α -hélice hidrofóbica) de *melittin* ou de *magainin 2*, exibindo atividade citolítica contra linhagens de câncer de pulmão e apresentando pouca ou nenhuma atividade hemolítica (Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

Em uma estratégia similar, um domínio responsável pela rápida entrada do peptídeo na célula é acoplado a outro que causa perturbação de membrana mitocondrial, levando à apoptose. Todavia, esse tipo de híbrido precisa ser direcionado para células tumorais, evitando a toxicidade sistêmica (Shadidi & Sioud, 2003).

Peptídeos chamados de *hunter-killers* foram desenhados para atingir e então destruir apenas vasos sanguíneos de tumores, os quais apresentam endotélio e estroma diferenciados. Eles são compostos por dois domínios, um que direciona o peptídeo para o vaso e outro que induz apoptose, servindo como uma alternativa menos tóxica para a terapia de câncer (Zhu & Witte, 1999; Neri & Bicknell, 2005). Outra estratégia que representa um importante passo no uso de peptídeos líticos na terapia do câncer é o uso da entrega de genes codificadores de peptídeos líticos nas células tumorais por vetores (Winder *et al.*, 1998; Brannon-Peppas & Blanchette, 2004).

Como alguns PACs são exógenos ao organismo humano, podem ser neutralizados por anticorpos ou provocarem respostas alérgicas. Uma medida para evitar que esses eventos ocorram é usar peptídeos de origem humana ou co-administrar PACs exógenos com drogas imunossupressoras. Alternativamente, peptídeos imunogênicos poderiam ser encapsulados em lipossomas construídos para entregar o conteúdo no local dos tumores, reduzindo a probabilidade do desenvolvimento de uma resposta imunológica (Shadidi & Sioud, 2003; Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

Outra alternativa é a funcionalização dos PACs, isto é, a utilização desses peptídeos com quimioterápicos convencionais ou moléculas radio-marcadas. Por exemplo, o uso de peptídeos antagonistas de receptores conjugados às drogas tradicionais utilizadas no tratamento de câncer. Essas pró-drogas são desenhadas pela fusão de quimioterápicos a peptídeos que se ligam especificamente a células tumorais com um sítio de clivagem que é reconhecido pelas proteases associadas ao tumor (Shadidi & Sioud, 2003). Finalmente, o potencial desses peptídeos pode ser aumentado por meio de sistemas de entrega. Carreadores de drogas e associação com soro albumina estão sendo usados para aumentar a longevidade, estabilidade, permeabilidade e retenção no corpo dessas moléculas (Zhu & Witte, 1999; Brannon-Peppas & Blanchette, 2004; Papo & Shai, 2005).

Infelizmente, os custos para isolar e sintetizar PACs de origem natural ainda são muito elevados. Investimentos das indústrias farmacêuticas levarão, em um futuro próximo, ao desenvolvimento de novas técnicas que viabilizarão a comercialização dessas moléculas, as quais serão uma alternativa real aos quimioterápicos atuais (Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

1.3. Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas são importantes enzimas que hidrolisam ligações peptídicas e estão presentes em todos os organismos. Atualmente, as enzimas proteolíticas são chamadas de peptidases (proteases), estando classificadas em endopeptidases (proteínase) e em exopeptidase (Barrett & McDonald, 1986). As endopeptidases clivam ligações internas, já as exopeptidases hidrolisam as ligações peptídicas da porção N- ou C-terminal. Todavia, algumas peptidases apresentam tanto atividade de endo quanto de exopeptidase, e por este motivo, não podem ser inseridas dentro desta classificação (Barret, 2001).

As peptidases são essenciais para a sobrevivência de qualquer organismo e são codificadas por aproximadamente 2% do total de genes (Rawlings *et al.*, 2004). Antigamente, eram reconhecidas apenas pela sua propriedade de digerir proteínas. Todavia, a visão atual é outra, além de promoverem a hidrólise não específica de proteínas, as proteases também atuam como enzimas processadoras, as quais clivam substratos específicos de forma altamente seletiva, limitada e eficiente, influenciando vários processos biológicos. As peptidases apresentam várias funções de processamentos pós-traducionais, por exemplo, remoção de sinais alvos (peptídeos sinais) e ativação de zimogênios; e desativam proteínas como os peptídeos hormonais. Os eventos de processamento proteolítico são fundamentais em processos como a ovulação, desenvolvimento embrionário, regulação do ciclo celular, inflamação, apoptose, entre outros (Puente, 2003; Rawlings & Morton, 2008). As peptidases são importantes alvos de drogas, pois patógenos utilizam-se dessas enzimas para invasão tecidual e a proteólise descontrolada pode levar a graves doenças como a artrite. Assim, a sua atividade precisa ser mantida sob controle por meio de vários mecanismos distintos (Rawlings, Tolle & Barrett, 2004).

O processamento proteolítico pode ser limitado pela especificidade da peptidase, acessibilidade à ligação peptídica do substrato, a ativação obrigatória de um precursor enzimático, a ação de inibidores de protease, ou pela combinação desses fatores. Em termos de especificidade, algumas peptidases possuem uma única proteína como substrato, já outras são extremamente inespecíficas. Essas enzimas também utilizam estratégias distintas para definir a sua localização espacial (intra ou extracelular) e, em muitos casos, atuam em uma rede complexa com outras proteases, substratos, inibidores, receptores e ligantes. Todas as peptidases específicas são reguladas por inibidores específicos. Todavia, alguns precursores de protease podem se auto-regular (ex: tripsinogênio), enquanto outros não necessitam da

clivagem da ligação peptídica para a sua ativação (ex: plasminogênio) (Neurath, 1999; Puente, 2003).

Existem dois tipos de classificação para as enzimas proteolíticas, o sistema EC da IUBMB e o *MEROPS*. O sistema EC não leva em conta os grupos estruturais das peptidases, os quais refletem as relações evolutivas, agrupando enzimas muito diferentes. O banco de dados *MEROPS* resolveu esse problema, organizado em 51 clãs, representam diferentes estruturas terciárias e origens evolutivas. A relação entre o tipo catalítico e o clã não é direta, já que o clã pode conter peptidases de diferentes tipos catalíticos. Os resíduos do sítio ativo das peptidases estão entre os resíduos mais conservados de uma família, entretanto, substituições ocorrem, levando à perda de atividade. Portanto, podem existir peptidases homólogas onde uma não possui atividade enzimática. O número desses resíduos é geralmente o mesmo para todos os membros de uma família (Rawlings & Morton, 2008).

A classificação das peptidases é baseada nas relações estruturais e evolutivas (Rawlings & Barrett, 1993). Com base na natureza química do sítio catalítico, as peptidases são classificadas em: aspártico-, metalo-, glutâmico-, cisteíno-, serino- e treonino-peptidases. As enzimas proteolíticas das três primeiras classes usam uma molécula de água ativada como nucleófilo para atacar a ligação peptídica do substrato. Já nas outras classes, o nucleófilo é um resíduo de aminoácido catalítico (Cys, Ser ou Thr, respectivamente) localizado no sítio ativo. As diferentes classes são divididas em famílias de acordo com a seqüência de aminoácidos, sendo que todas as peptidases dentro de uma família estão relacionadas evolutivamente. As famílias são agrupadas em clãs com base na similaridade da conformação tridimensional (Barret, 2001; Puente, 2003). Algumas peptidases não são agrupadas em clãs por apresentarem o mecanismo catalítico desconhecido e outras são classificadas em um clã que agrupa peptidases de diferentes sítios catalíticos (Rawlings *et al.*, 2008).

1.3.1. Aspártico-peptidases

Formado por endopeptidases, sendo algumas de ativação auto-catalítica. Os componentes desse grupo apresentam atividade ótima em pH ácido (ex: pepsina), levando-se a acreditar que grupamentos carboxil estão envolvidos no aparato catalítico, constituído de duas cadeias laterais de ácido aspártico. Acredita-se que esse grupo é capaz de catalisar a clivagem de ligações peptídicas sem o ataque nucleofílico de um grupo funcional da enzima, assim não há formação de um intermediário entre a enzima e o fragmento de substrato. A enzima nativa contém uma molécula de água onde os hidrogênios estão

fortemente ligados aos dois sítios ativos de ácido aspártico. As aspártico-peptidases atuam sobre ligações peptídicas flanqueadas por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e são inibidas especificamente pela pepstatina A ou por compostos diazoacetil (Dunn, 2001; Rawlings *et al.*, 2008).

1.3.2. Metalopeptidases

Possuem como característica principal a presença de um cátion divalente, normalmente o zinco, no sítio ativo. Quando o cátion é o cálcio, hipotetiza-se que este teria o papel de estabilizar o sítio catalítico durante a reação enzimática. Como as aspártico-peptidases, as metalopeptidases não formam um intermediário covalente, elas apresentam uma solução mais direta para o efeito catalítico no grupo carbonil da ligação a ser clivada. Ao invés de se basear na ligação de hidrogênio via um “papel oxianion”, a metalopeptidase utiliza a coordenação de um íon metálico, geralmente o zinco, para exercer este efeito. O íon metálico funciona como uma forte fonte eletrolítica para ajudar o ataque pela molécula de água (Dunn, 2001). O clã mais estudado é o das termolisinas (isoladas de *Bacillus thermoproteolyticus*). Os tipos de atividade incluem as aminopeptidases, carboxipeptidases, peptidil-dipeptidase, oligopeptidase e endopeptidase, podendo ser inibidas por agentes quelantes de íons metálicos como o EDTA, a fenantrolina e o fosforamidon. As metalopeptidases de matriz (MMP) e as de peçonhas de serpente têm sido objeto de intensivos estudos. Algumas peptidases são sintetizadas na forma de pró-enzimas, ativadas pela remoção do pró-peptídeo N-terminal (Rawlings *et al.*, 2008).

1.3.3. Glutâmico-peptidases

Representado por endopeptidases glutâmicas, é o clã mais novo. As estruturas terciárias determinadas para essas peptidases mostram que são compostas por duas folhas betas em sanduíche. Atuam otimamente em pH ácido. Enzimas da família das xilanases e glucanases apresentam um dobramento parecido ao dessa família. O mecanismo de catálise sugerido é o ataque nucleofílico por uma molécula de água ativada pela cadeia lateral do resíduo Glu136, assistido eletrofilicamente e estabilizado pela cadeia lateral do Gln53 (Rawlings *et al.*, 2008).

1.3.4. Serino-peptidases

A classe das serino-peptidases é a mais estudada na enzimologia. Agrupada em 13 clãs, é composta tanto de endo quanto de exopeptidases, apresentando o aminoácido Ser como nucleófilo. Apresentam uma tríade catalítica, na qual o ácido aspártico e a histidina cooperam com a serina, podendo o complexo ser inibido por diisopropilfluorofosfato. A transferência intermediária da porção acil do substrato para formar uma ligação covalente com o grupo funcional da enzima, liberando como primeiro produto uma porção amino do substrato, é uma característica deste grupo. Essas enzimas apresentam múltiplas origens evolucionárias. A atividade ótima ocorre em pH ligeiramente alcalino. Normalmente pertencem à família da quimotripsina, da subtilisina ou da prolil oligopeptidase (Barrett & Rawlings, 1995; Dunn, 2001).

1.3.5. Cisteíno-peptidases

Com mais de cinquenta famílias incluídas neste grupo, essas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo que em eucariotos o clã da papaína é predominante. Geralmente localizam-se no citossol e em lisossomos, podendo ser encontradas em compartimentos extracelulares durante condições patológicas. Muitos membros desse grupo são sintetizados como pró-enzimas inativas. As cisteíno-peptidases possuem grande similaridade catalítica com as serino-proteases, em ambas ocorre a formação de um intermediário covalente. Nesse caso, o nucleófilo é um átomo de enxofre da cadeia lateral da cisteína 25 (numeração da papaína) e a cadeia lateral da histidina 159 está envolvida no papel de acceptor/translocador de hidrogênio. A atividade proteolítica das cisteíno-peptidases pode ser inibida pelo inibidor E-64 (Dunn, 2001). Outra família importante é a das calpaínas, endopeptidases altamente distribuídas em animais e dependentes de pH neutro, condições redutoras e íons de cálcio. Estas enzimas estão envolvidas em variados processos fisiológicos como reorganização do citoesqueleto e a apoptose, além de estarem relacionadas a eventos como derrame e infarto do miocárdio (Rawlings *et al.*, 2008).

1.3.6. Treonino-peptidases

Composta de apenas uma família (T5) é representada pela enzima auto-processadora precursora da ornitina acetiltransferase (*Saccharomyces cerevisiae*). Apenas o precursor da ornitina acetiltransferase apresenta atividade proteolítica. O produto da maturação do precursor é um heterodímero de 57 kDa que catalisa a troca reversível de um grupo acetil

entre N-acetilornitina e glutamato. A mutação da treonina catalítica leva à perda da atividade catalítica da peptidase (Rawlings *et al.*, 2008).

1.4. Fosfolipases

As fosfolipases são enzimas que catalisam a clivagem de moléculas de fosfolípido pela adição de uma água, produzindo ácidos graxos e outras substâncias lipofílicas. Existem quatro grandes classes (A, B, C e D), distinguidas pelo sítio de clivagem em que agem (Figura 10).

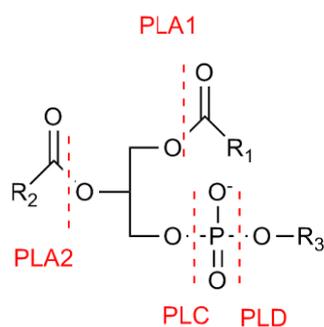


Figura 10. Sítios de clivagem das fosfolipases. A enzima que possui os sítios de clivagem de PLA_1 e PLA_2 é chamada de fosfolipase B.

As fosfolipases A são classificadas em dois grupos, fosfolipase A_1 e fosfolipase A_2 , sendo que a primeira catalisa a hidrólise do sítio sn-1 da cadeia acil e a outra do sítio sn-2. As fosfolipases B, também conhecidas como lisofosfolipases, agem em ambas as ligações sn-1 e sn-2. As fosfolipases do tipo C catalizam a clivagem depois do fosfato, liberando diacilglicerol e um fosfato contendo um grupo cabeça. As fosfolipases C possuem um importante papel na transdução de sinal, liberando o segundo mensageiro inositol trifosfato (Manzoli *et al.*, 2005). Finalmente, as fosfolipases do tipo D atuam na ligação di-éster terminal dos glicerofosfolípídios de membrana, resultando na formação de ácido fosfatídico e de uma base relacionada (Gómez-Cambronero & Keire, 1998). As fosfolipases C e D são consideradas fosfodiesterases.

1.4.1. Fosfolipases A₂

Características gerais

Como dito anteriormente, as fosfolipases A₂ (PLA₂) catalisam a hidrólise das ligações éster sn-2 dos fosfolipídios, produzindo ácidos graxos livres e lisofosfolipídios. A família das enzimas PLA₂ é composta pelas formas citosólicas (cPLA₂), secretadas (sPLA₂) e as independentes de cálcio (iPLA₂) (Diaz & Arm, 2003). Possuem diferentes papéis em vários processos celulares, sendo de extrema importância em cada um deles, assim que são as mais estudadas das fosfolipases. O estudo da atividade destas moléculas iniciou-se no começo do século 20, utilizando-se como fonte dessas enzimas o suco pancreático e a peçonha de serpentes. A princípio, essas enzimas extracelulares foram divididas em três grandes grupos e vários subgrupos (de acordo com a seqüência de aminoácidos), todavia o surgimento de fosfolipases que não se encaixavam nesta classificação tornou necessária a reformulação dos grupos. Ao longo dos anos, pesquisas revelaram que a maioria destas pequenas moléculas secretadas era dependente de cálcio, possuía várias ligações dissulfeto e resíduos catalíticos de histidina e aspartato (Dennis, 1994; Six & Dennis, 2000).

As PLA₂ são as únicas enzimas hidrolíticas que hidrolisam substratos fosfolipídicos insolúveis na água. Elas hidrolisam os fosfolipídios arranjados monomericamente, na forma de micela ou de membrana lipídica, exibindo um grande e abrupto aumento de atividade quando atuam em micelas. O sítio de reconhecimento, independente do catalítico, é responsável pela rara propriedade de se ligar a interface entre a fase polar aquosa e os fosfolipídios não polares, e a ativação interfacial. Apesar das enzimas PLA₂ exibirem afinidade diferenciada pelos grupos da cabeça dos fosfolipídios, a eficiência catalítica é determinada pelas propriedades físicas do agregado, tais como: densidade do empacotamento, temperatura da fase de transição, cristalinidade do líquido e a presença de outras moléculas. Baseada nas diferenças dos passos de ligação interfacial, a hidrólise das vesículas compostas de duas camadas pode ocorrer de duas maneiras distintas. No modo *hopping*, a ligação e a dissociação ocorrem a cada ciclo de catálise. No modo *scooting*, a enzima permanece ligada à interface enquanto hidrolisa moléculas de substrato fosfolipídico (Dennis, 1994; Kini, 2003).

Efeitos farmacológicos

As enzimas PLA₂ de mamíferos possuem diversos papéis importantes, tais como: na fertilização, proliferação celular, contração da musculatura lisa, hipersensibilização e nas

doenças inflamatórias crônicas. São também importantes em funções celulares como transdução de sinal via biosíntese de prostaglandinas e leucotrienos, defesa, homeostase de membrana, incluindo a manutenção de fosfolipídios celulares e reparo de membrana através de reações envolvendo o grupo acil.

Entretanto, as enzimas dos mamíferos são geralmente não tóxicas e não induzem efeitos farmacológicos potentes. Por outro lado, as enzimas PLA₂ encontradas na peçonha de serpentes, além de ajudarem a digerir a presa, provocam diversos efeitos farmacológicos que interferem nos processos fisiológicos normais (Figura 11) (Kini, 2003).



Figura 11. Efeitos farmacológicos das enzimas PLA₂ isoladas da peçonha de serpentes.

Através da liberação de lisofosfolipídios e ácidos graxos livres a partir da hidrólise de fosfolipídios de membranas celulares, as enzimas PLA₂ iniciam a produção de inúmeros metabólitos que medeiam várias condições patológicas, especialmente processos inflamatórios e alérgicos. O ácido araquidônico (AA), liberado da posição sn-2 dos fosfolipídios de membrana celular pela ação das PLA₂ é metabolizado principalmente pelas vias enzimáticas da ciclo-oxigenase (COX) e lipo-oxigenase (LOX) para produzir vários tipos de eicosanóides, inclusive prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LT), envolvidos em diversos processos fisiológicos e alguns patológicos, tais como: asma, inflamações, carcinogênese,

hemostase, parturição, manutenção da função renal, dor e febre. Outros produtos do AA incluem os ácidos hidroieicosatetraenóicos (HETE), lipoxinas, ácidos epoxieicosatriênicos e isoprostanos, os quais também podem modular respostas inflamatórias. Os AA também podem regular processos biológicos independentes de maiores modificações enzimáticas (Diaz & Arm, 2003; Yedgar *et al.*, 2006).

Como todas as enzimas PLA₂ hidrolisam fosfolipídios para produzir mediadores lipídicos inflamatórios, é aceito que diferentes isoformas de PLA₂, e especialmente cPLA₂ e sPLA₂, participam da indução de processos inflamatórios. Suas ações são geralmente aditivas ou sinérgicas. Todavia, estudos recentes sugerem que diferentes isoformas de PLA₂ podem agir independentemente de, e possivelmente antagonisticamente a, cada uma em diferentes condições inflamatórias (Dennis, 1994; Yedgar *et al.*, 2006).

1.5. *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824)

O gênero *Leptodactylus* pertence à família Leptodactitidae e contém 81 espécies espalhadas nas Américas do Norte e do Sul, e nas Índias Orientais (Frost, 2007), entretanto, apenas cinco espécies desse gênero foram examinadas para peptídeos com atividade biológica (Nascimento *et al.*, 2004; King *et al.*, 2005; Rollins-Smith *et al.*, 2005; Conlon *et al.*, 2006; Dourado *et al.*, 2007; Nascimento, 2007; Nascimento *et al.*, 2007).

O leptodactilídeo *Leptodactylus labyrinthicus* (Figura 12) é uma rã de grande porte, conhecida como rã-pimenta, é generalista quanto à utilização de habitat e adapta-se facilmente aos ambientes antropizados, sendo o seu status de conservação definido como de menor preocupação pela IUCN (Heyer *et al.*, 2004). Ocorre nos cerrados e caatingas do Brasil central e no sudeste, costa da Venezuela, leste do Paraguai, Bolívia e norte da Argentina. Sua pele e carne apresentam potencial econômico (Gordo & Campos, 2005; Frost, 2007). Apresenta uma dieta do tipo oportunista caracterizada principalmente por artrópodes, existindo relatos de prática batracofágica na espécie (Rodrigues & Ferreira, 2004; Shepard & Caldwell, 2005). A maioria dos adultos da espécie apresenta a barriga no padrão labirintina, semelhante ao desenho de um labirinto (Heyer, 2005).



Figura 12. Exemplar de *Leptodactylus labyrinthicus* (Foto de R. J. Sawaya).

A espécie *L. labyrinthicus* possui um longo período de acasalamento associado às chuvas. Os machos costumam vocalizar às margens de corpos de água permanentes ou temporários, iniciando ao entardecer. Os ovos dessa espécie são encontrados em ninhos de espuma às margens de poças temporárias protegidas pela vegetação. Uma média de 6,5% dos ovos presentes no ninho é fertilizada, sendo o restante possivelmente usado como alimento pelos girinos, caso a água das chuvas não os carregue para corpos de água maiores com alimentação (Zina & Haddad, 2005).

2. Justificativa

A pele dos anfíbios é fonte de uma grande quantidade de moléculas bioativas, produzidas pelas células sinciciais das paredes das glândulas serosas ou granulosas do tegumento (Erspamer, 1994). O tegumento dos anfíbios e o seu veneno vêm sendo utilizados desde longa data para o tratamento de doenças e em rituais místicos, principalmente pela população da região norte do Brasil. O veneno destes animais faz parte da sua imunidade inata, atuando como primeira linha de defesa contra microorganismos. Durante a evolução dos anfíbios, este mecanismo de defesa evoluiu independentemente em cada espécie, como resultado da interação com os seus respectivos ambientes (Toledo & Jared, 1995). Assim, a composição do veneno varia de acordo com a espécie, podendo ser utilizada na elucidação de questões taxonômicas (Zheng *et al.*, 2005).

Estudos ao longo dos anos revelaram diversas funções para os peptídeos encontrados na secreção cutânea destes animais, dentre elas estão: antimicrobiana, antitumoral, antiviral, contraceptiva e antiparasitária. Entretanto, os peptídeos que possuem atividade antimicrobiana (não excluindo as outras funções) são os mais procurados devido à crescente resistência aos antibióticos convencionais e a necessidade de novos antibióticos para a terapia humana (Zasloff, 2002). Potenciais peptídeos antimicrobianos devem apresentar uma toxicidade seletiva, rápida ação, amplo espectro antimicrobiano e não selecionar mecanismos de resistência nos microorganismos (Matsuzaki, 1999). E é exatamente o que acontece com os peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea de anuros, eles são bastante diferentes dos antibióticos usados na terapêutica atual, tanto na sua estrutura quanto no mecanismo de ação (Schröder, 1999).

Um dos mais fascinantes aspectos dos peptídeos bioativos de anfíbios é que a maioria deles possui mais de uma atividade biológica. Por exemplo, muitos peptídeos antibióticos de amplo espectro também exibem atividade anticâncer, o que sugere o mesmo mecanismo de ação contra bactérias e células tumorais (Pukala *et al.*, 2006). O uso de peptídeos no tratamento do câncer está ganhando cada vez mais força, principalmente, devido aos efeitos colaterais provocados pelos quimioterápicos tradicionais e pelo surgimento de resistência a drogas pelas diversas linhagens celulares de câncer. A estratégia de usar peptídeos para combater o câncer apresenta inúmeras vantagens, tais como, elevada especificidade, baixa toxicidade, boa penetrabilidade nos tecidos, ação rápida, ausência de surgimento de resistência pelas células, sinergismo com quimioterápicos clássicos, amplo

espectro de atividade e destruição de tumores primários, além de prevenção de metástase (Bhutia & Maiti, 2008; Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

A maioria dos esforços farmacêuticos é para o desenvolvimento de agentes tópicos, por exemplo, o *pexiganan*, análogo de *magainin*, principalmente devido à segurança do uso tópico e da falta de conhecimento sobre os efeitos toxicológicos do uso sistêmico prolongado (Zasloff, 2002). Entretanto, outros problemas dificultam o uso terapêutico dos peptídeos, por exemplo, a instabilidade no soro e a produção em larga escala. O primeiro problema tem sido contornado usando inibidores de proteases juntamente com os peptídeos ou modificando a seqüência de aminoácidos, impedindo a identificação pelas proteases. Já a produção em larga escala está sendo solucionada pela tecnologia da síntese recombinante (Reddy *et al.*, 2004). Inúmeras outras estratégias estão sendo desenvolvidas para otimizar a ação desses peptídeos (Shadidi & Sioud, 2003).

As secreções cutâneas de leptodactilídeos têm sido alvo de intensos estudos realizados pelo grupo da Profa. Mariana S. Castro e, em particular, da secreção de *L. labyrinthicus* já foram isolados e caracterizados quimicamente quatro peptídeos com prováveis efeitos citolíticos. A presente dissertação de mestrado deu continuidade aos estudos envolvendo tais peptídeos avançando na caracterização biológica de tais moléculas.

Em contrapartida aos inúmeros estudos acerca de peptídeos bioativos, poucos estudos sobre o processamento de tais peptídeos na secreção cutânea dos anfíbios foram realizados. Sabe-se que os peptídeos da secreção cutânea são sintetizados na forma de pró-peptídeos que são ativados pela clivagem de enzimas proteolíticas, todavia, praticamente nada se sabe sobre essas e outras enzimas presentes no veneno de anfíbios (Conceição *et al.*, 2007).

Além das peptidases, outro grupo enzimático presente na secreção cutânea de anuros é o das fosfolipases tipo 2 (PLA₂). As PLA₂ da peçonha de serpentes e de mamíferos são bastante estudadas, contudo, apenas em 2000 foi publicado o primeiro trabalho de uma PLA₂ isolada do veneno de um anfíbio (*Rana rugosa*), a qual possui atividade inibitória contra os receptores de adenosina A1, adenosina A2 e muscarínicos (Baek *et al.*, 2000).

As PLA₂ e as peptidases participam de uma variada gama de processos celulares, atuando tanto beneficentemente para a homeostase do indivíduo, quanto em processos patológicos. O conhecimento de todas as vias de participação destas enzimas ainda está longe de ser atingido, porém é de suma importância, pois podem ser alvos de manipulação no

tratamento terapêutico. O estudo dessas enzimas presentes na secreção cutânea dos anfíbios pode ajudar a atingir essa meta.

O Brasil possui uma extensa fauna de anfíbios, mas poucas espécies foram estudadas. Estudos como estes também são importantes por agregarem valor à espécie, auxiliando na conservação desse grupo taxonômico, o qual se encontra em vertiginoso declínio populacional (Blaustein & Johnson, 2003; Rachowicz *et al.*, 2005). Felizmente, graças ao advento de novos métodos e tecnologias, atualmente, uma pequena quantidade de material é suficiente para a caracterização química e farmacológica, evitando assim que populações inteiras sejam dizimadas, levando finalmente a descoberta de novos agentes que terão um grande impacto na biomedicina e na elucidação do papel desses compostos nas interações biológicas no nosso planeta (Daly, 2003; Schwartz *et al.*, 2007).

3. Objetivos

3.1. Objetivos Gerais

Identificar a composição peptídica/protéica da secreção cutânea de *L. labyrinthicus*, buscando verificar a presença de diferentes atividades biológicas e caracterizando as macromoléculas responsáveis por tais funções.

3.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar o proteoma da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* via RP-HPLC, espectrometria de massa e perfil protéico em SDS-PAGE unidimensional;
2. Avaliar as atividades antimicrobiana, hemolítica, antitumoral e enzimáticas da secreção cutânea de *L. labyrinthicus*;
3. Obter as concentrações determinantes de MIC para as bactérias testadas, HC₅₀ e o IC₅₀ para distintas linhagens celulares de câncer e de células normais;
4. Sugerir possíveis mecanismos de ação do peptídeo anticâncer testado contra células da linhagem MCF-7;
5. Determinar as melhores condições de atividade das enzimas proteolíticas;
6. Sugerir em que grupos de peptidases essas enzimas estão inseridas.

4. Materiais e Métodos

4.1. Reagentes químicos

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

4.2. Obtenção da secreção cutânea

Adultos de ambos os sexos da rã-pimenta *Leptodactylus labyrinthicus* foram coletados em agosto de 2006 na região de Luziânia-GO e mantidos em cativeiro no Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília. A secreção cutânea foi obtida por estimulação elétrica moderada de corrente contínua de até 150 V e de baixa amperagem. Os animais foram lavados com água Milli-Q, sendo o material obtido coletado em um béquer, congelado e imediatamente liofilizado. A amostra seca foi alíquotada em frações de 5 mg e armazenada a -20°C até o seu uso. Nenhum animal foi sacrificado durante os experimentos, reassumindo seu comportamento normal após a estimulação.

4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência - fase reversa (RP-HPLC)

4.3.1. Fracionamento da secreção bruta

Alíquotas (5 mg) da secreção bruta de *L. labyrinthicus* liofilizada foram ressuspendidas em 230 μL de 0,1% (v/v) de TFA/água e centrifugadas por 10 min a 15.887 g. O sobrenadante obtido foi aplicado em uma coluna analítica C_{18} de fase reversa (Vydac 218TP54, 4,6 x 250 mm) e a eluição foi realizada empregando-se fluxo de 1 mL/min. Primeiramente, a coluna foi equilibrada com 0,1% (v/v) de TFA/água (solvente A) e, em seguida, foi aplicado gradiente linear de 0–60% por 60 min e de 60–100% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA (solvente B) por 5 min, seguido de uma lavagem de 5 min com 100% de solvente B. A absorvância foi monitorada a 216 nm e as frações foram manualmente coletadas, secadas a vácuo e armazenadas a -20°C .

4.3.2. Purificação dos peptídeos

Os peptídeos de interesse foram recromatografados e acumulados por meio de RP-HPLC em coluna C_{18} Vydac (218TP54, 4,6 x 250 mm) ou de sílica monolítica Onyx (CHO-7643, 4,6 x 100 mm). Ambas as colunas foram equilibradas com solvente A. O

gradiente utilizado variou de acordo com o tempo de retenção da amostra. A eluição realizou-se com fluxo de 1 mL/min e detecção UV a 216 nm. Os peptídeos purificados foram coletados, secados a vácuo e utilizados nos experimentos subseqüentes.

4.4. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa (MS) determina as massas moleculares de compostos químicos por meio da separação dos íons moleculares de acordo com sua relação massa-carga (m/z) (Cunha *et al.*, 2007).

Neste trabalho, todas as frações peptídicas foram caracterizadas com relação a sua composição peptídica/protéica por meio da determinação das massas moleculares experimentais das frações cromatográficas em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

As frações foram dissolvidas em 0,1% (v/v) de TFA/água e 1 μ L de cada fração aplicado em placa de aço inoxidável juntamente com 1 μ L da matriz reconstituída de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 20 μ g/ μ L) ou ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico (ácido sinapínico - AS 20 μ g/ μ L) ressuspendidas em 50% (v/v) acetonitrila/0,1% (v/v) TFA. Dois tipos de análises foram realizadas com cada fração cromatográfica plaqueada: modo refletor de íons positivos e linear. O procedimento realizado no modo refletor utilizou a solução *Peptide Mix* (Bruker Daltonics) para a calibração e matriz HCCA, sendo a faixa m/z analisada de 500 a 4000 Da. Já os espectros de massa de 4 kDa a 20 kDa foram calibrados com citocromo C e a matriz usada foi o AS.

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

4.5. Determinação da presença de amidação C-terminal

A amidação da porção C-terminal dos peptídeos estudados foi confirmada por meio de análise em espectrômetro de massa dos peptídeos nativos e metilados seguindo-se o protocolo de Esterificação de Fisher (Hunt *et al.*, 1986). Alíquotas de cada peptídeo foram dissolvidas em 20 μ L de reagente HCl metanólico (10 μ L de cloreto de acetila em 250 μ L de metanol anidro) e incubadas por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, o solvente foi removido por liofilização e os peptídeos metilados reconstituídos em 20 μ L de 0,1% (v/v) TFA em 50% (v/v) acetonitrila para análise por MALDI-TOF MS como descrito na sessão

anterior. Nesse experimento, os resíduos ácidos presentes nos peptídeos são metilados juntamente com a porção C-terminal livre.

4.6. Bioinformática

Os seguintes programas foram utilizados: **(1)** *Expasy pI/Mw tool* (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html), para cálculo da massa molecular teórica; **(2)** *BLAST 2* (Altschul *et al.*, 1997 - <http://au.expasy.org/tools/blast/>), para busca de similaridades no *UnitProt Knowledgebase*; **(3)** *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994 - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>), para alinhamento de múltiplas seqüências; **(4)** <http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>, para a construção das projeções em hélice dos peptídeos; **(5)** *Peptide property calculator* (<http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>), para cálculo do ponto isoelétrico (pI); **(6)** *HydroMCalc* (<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html#Description>), para cálculo da hidrofobicidade e do momento hidrofóbico médio de acordo com a escala de Eisenberg (1982); **(7)** *SOPMA algorithm* (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html), para a predição da estrutura secundária; **(8)** PAUP 4.0 (Swofford, 1993) para análises filogenéticas por parsimônia e de similaridade por *neighbor-joining*, *bootstrap 50% majority-rule* com 1000 réplicas.

4.7. Ensaio hemolítico

O ensaio hemolítico utilizado foi modificado do protocolo descrito por Onuma *et al.* (1999). Eritrócitos de sangue humano O⁺, obtidos no HEMOCENTRO de Brasília, foram separados do plasma por sedimentação e lavados três vezes com tampão Tris-HCL 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M e CaCl₂ 0,01 M. Utilizou-se o mesmo tampão para solubilizar as amostras e preparar uma solução 1% (v/v) de hemáceas. As amostras ressuspensas em 100 µL de tampão foram incubadas por 60 min à temperatura ambiente com 100 µL da suspensão de eritrócitos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 729 g por 2 min. Uma alíquota de 100 µL de cada sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços de fundo chato (Nunc, Denmark) e a leitura da absorvância realizada a 405 nm (BioRad 3550-UV). Para as amostras de referência utilizaram-se 100 µL da suspensão de eritrócitos 1% (v/v) incubada com 100 µL de Triton X-100 1% (v/v) como referência de 100% de lise e 100 µL da suspensão de eritrócitos 1% (v/v) com tampão salino como referência de 0% de hemólise.

4.7.1. Ensaio preliminar

A fim de verificar quais componentes da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* apresentariam atividade hemolítica, cada fração cromatográfica de uma corrida de RP-HPLC foi solubilizada em tampão e incubada com a suspensão de hemáceas de acordo com o método descrito acima.

4.7.2. Determinação da HC₅₀

Para a determinação da concentração capaz de promover 50% de hemólise (HC₅₀), os peptídeos de interesse purificados foram diluídos serialmente a partir de uma solução estoque de 128 µM e incubados com a solução de eritrócitos como descrito anteriormente. O ensaio foi realizado em triplicata. O valor de HC₅₀ foi obtido após ajuste por regressão logarítmica.

4.8. Ensaio antimicrobiano

Linhagens referenciais de bactérias, obtidas do Banco de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP), foram cultivadas em 5 mL de meio Mueller-Hinton contendo 10 mM de CaCl₂ sob agitação a 37°C até a densidade óptica igual a 1 a 595 nm. As bactérias, em fase logarítmica, foram diluídas no mesmo meio de cultura nas proporções 1:50 para as Gram-negativas e 1:100 para as Gram-positivas. Uma alíquota de 50 µL de cada cultura bacteriana (contendo 2 a 5 x 10⁵ CFUs) foi incubada por 22 h a 37°C com 50 µL de amostra ressuspensa em água Milli-Q estéril. Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e água Milli-Q estéril, ambos incubados com as suspensões bacterianas. A inibição do crescimento foi determinada pela leitura da densidade óptica a 595 nm com uma leitora de placas BioRad (Modelo 3550-UV, Hercules, CA, USA).

4.8.1. Ensaio preliminar

Para verificar a presença de frações peptídicas ativas contra microorganismos, foi realizado um ensaio antimicrobiano inicial em placa multi-poços (Nunc F96, Denmark) contra as bactérias patogênicas Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), e a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Cada fração cromatográfica de uma mesma corrida de RP-HPLC foi solubilizada em água Milli-Q e incubada com a suspensão bacteriana, de acordo com o método descrito acima.

Após 22 h de incubação a 37°C, as placas foram analisadas em 595 nm por meio da leitora de placa da BioRad (Modelo 3550-UV, Hercules, CA, USA).

4.8.2 Determinação de MIC

Os peptídeos que apresentaram atividade antimicrobiana no ensaio preliminar ou que se apresentavam em grande quantidade foram acumulados para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC), ou seja, a menor concentração onde nenhum crescimento é detectado por meio de leitura espectrofotométrica. Foram realizadas determinações de MIC para as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 19659). 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 filtro Millex GV 0,22 µm, foram incubadas com 50 µL de suspensão bacteriana, contendo de 2 a 7 x 10⁵ CFUs, dependendo da linhagem bacteriana utilizada. Após a incubação por um período de 22 h a 37°C, as placas foram analisadas a 595 nm, em leitora BioRad (Modelo 3550-UV, Hercules, CA, USA). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9. Síntese Química

O peptídeo *pentadactylin* usado nos ensaios para inferência sobre o mecanismo de ação da atividade anticarcinogênica foi obtido por meio da síntese química manual, segundo o protocolo de Atherton & Sheppard (1989) pelo Prof. Eduardo Cilli (UNESP- Araraquara). Utilizaram-se os seguintes grupos de proteção da cadeia lateral: Boc (t-butoxicarbonil) para K; tBut (t-butil) para D, T e E e Pmc (2,2,5,7,8 pentametil-chromane-6-sulfonil) para Q e N. Cada ciclo de síntese consistiu na desproteção de Na-Fmoc com piperidina/dimetilformamida 20% (v/v) durante 20 min, seguido por lavagem com diclorometano e dimetilformamida e acoplamento ao próximo resíduo. Ao final da síntese, a clivagem do peptídeo foi realizada em um coquetel contendo água ultra-pura 5% (v/v); fenol 5% (v/v); 1,2 etanoditiol 2,5% (v/v) e tioanisol 5% (v/v) em TFA, por 2 h, sob agitação. O peptídeo foi então precipitado com éter etílico gelado e filtrado em placa porosa juntamente com a resina. O peptídeo, retido na placa, foi dissolvido em solução aquosa de ácido acético 10% (v/v) e separado da resina por filtração. O filtrado foi liofilizado, solubilizado em TFA 0,045% (v/v) em água (solvente A) e purificado por RP-HPLC, utilizando-se coluna semi-preparativa (Beckman C₁₈ 1 cm x 25 cm), gradiente linear de 10 a 40% de TFA 0,036% (v/v) em acetonitrila (solvente B) durante

90 min, detecção em 220 nm e fluxo de 5 mL/min. As impurezas derivadas do processo de síntese foram retiradas por meio de RP-HPLC em coluna C₁₈ (Vydac 218TP54, 4.6 X 250 mm). A identidade do peptídeo sintético foi confirmada por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (Bruker, Autoflex II).

4.10. Linhagens Celulares

A linhagem celular derivada de câncer de mama utilizada no estudo foi a MCF-7 e a derivada de câncer cervical foi a HeLa. Ambas de origem humana foram obtidas do banco de células *American Type Culture Collection* (ATCC). A linhagem MCF-7 apresenta como principais características: crescer de forma aderente ao substrato, ser responsiva à presença de estrogênio e não possuir caspase 3 (Levenson & Jordan, 1997; Burow *et al.*, 1998). A linhagem celular HeLa apresenta um crescimento aderente e morfologia epitelial. Estudos reportam que células de HeLa contêm seqüências do papiloma vírus humano (HPV-18). A linhagem celular de melanoma murino B16F10 também foi utilizada nos ensaios. A linhagem B16F10 apresenta uma elevada característica metastásica, baixa imunogenicidade e moderada virulência (Rodrigues *et al.*, 2008).

Devido ao conhecimento bem estabelecido de suas características morfológicas, bioquímicas e moleculares, essas linhagens têm servido como os modelos celulares mais utilizados na pesquisa de câncer, tanto no estudo de efeitos de compostos anticarcinogênicos quanto na elucidação dos mecanismos de ação dos mesmos.

A linhagem de fibroblastos normais humanos (FHN) utilizada no presente trabalho foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Rui Curi do Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). É uma linhagem imortalizada que cresce de forma aderente ao substrato e apresenta morfologia fusiforme.

Todos os ensaios de atividade anticarcinogênica foram realizados no Laboratório de Morfologia e Morfogênese da Universidade de Brasília.

4.11. Manutenção da cultura de células

Todos os procedimentos foram realizados com materiais rigorosamente esterilizados e em câmara de fluxo laminar, cuja luz ultra-violeta permaneceu ligada de 30 a 40 minutos antes do uso.

Alíquotas de células de câncer e fibroblastos foram removidas de um estoque em nitrogênio líquido e descongeladas rapidamente a 37°C. Alíquotas de 500 µL foram

lentamente adicionados em 3 mL de meio de cultura DMEM completo (tamponado com bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico). Esse meio de cultura foi utilizado em todos os outros procedimentos experimentais. Em seguida, as células foram centrifugadas a 750 g por 5 minutos, ressuspensas em 5 mL de meio de cultura DMEM, transferidas para um frasco de cultura de células e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Para assegurar a qualidade das células a serem utilizadas nos experimentos, a cada 48 horas o meio de cultura foi substituído por um meio de cultura novo. A cultura de células foi observada em microscópio de luz invertido e monitorada quanto ao crescimento celular, aspectos morfológicos e presença de contaminantes.

Ao atingir o estágio de confluência (elevada densidade de células em uma determinada área), as células foram removidas do frasco de cultura e re-cultivadas em uma densidade menor seguindo o procedimento descrito a seguir. O meio de cultura foi descartado e 2 mL de solução de tripsina-EDTA foram adicionados ao frasco de cultura para a remoção da monocamada de células. Após 2 minutos de incubação em estufa a 37°C, a remoção das células foi observada em microscópio de luz invertido. Em seguida, foram acrescentados 2 mL de meio de cultura para inativar a atividade da tripsina. A suspensão de células foi centrifugada a 750 g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em meio de cultura. Aproximadamente, 10% das células foram re-cultivadas em frascos de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O restante foi utilizado em experimentos ou recebeu a adição de hipoclorito de sódio e detergente e, após 24 horas, foram descartados.

Após o término dos experimentos, as células de câncer e fibroblastos foram congeladas de acordo com o procedimento descrito a seguir. No estágio de confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura e centrifugadas (como descrito acima). Após o descarte do meio de cultura, as células foram ressuspensas em meio de congelamento (DMEM, 20% soro fetal bovino, 1% de antibiótico, 5% de DMSO). A suspensão celular foi rapidamente transferida para criotubos, os quais foram identificados e envolvidos por uma espessa camada de papel toalha e mantidos a -80°C por 24 horas. Em seguida, os criotubos foram estocados imersos em nitrogênio líquido.

4.12. Tratamento das células com os peptídeos de *Leptodactylus labyinthicus*

Ao atingir o estágio de confluência, as células de câncer ou fibroblastos normais foram removidas do frasco de cultura e centrifugadas como descrito anteriormente. O

sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. Para a determinação do número de células, 10 µL da suspensão de células foi adicionado a 40 µL de solução de azul tripan (0,4% diluídos em PBS, p/v). Uma alíquota de 8 µL dessa mistura foi depositada gentilmente em uma câmara de Neubauer, onde células presentes nos quatro quadrantes maiores laterais foram contadas em microscópio de luz. O número de células foi determinado pela seguinte fórmula:

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

As células contadas foram transferidas para placas de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 12 a 16 horas para a completa adesão das células no fundo da placa. As células foram transferidas para placas de tamanhos diferentes dependendo do experimento a ser realizado. Placas de 96 poços foram utilizadas para ensaios de viabilidade celular por MTT (ver descrição abaixo) com concentração inicial de 5 x 10³ células/poço. Placas de 12 poços foram utilizadas no restante dos experimentos com concentração inicial de 5 x 10⁴ células/poço.

Após o período de incubação na estufa, as placas de cultura foram observadas em microscópio de luz invertido para a avaliação da morfologia, dispersão das células pela placa e presença de contaminação. Essa análise foi realizada para decidir se as células estavam homoganeamente dispersas e saudáveis para serem submetidas aos ensaios com os peptídeos.

O meio de cultura contendo os peptídeos de interesse foi preparado a partir da diluição seriada das soluções estoque dessas moléculas (512 µM) em meio de cultura. As doses utilizadas nos experimentos variaram a partir de 128 µM para o ensaio de viabilidade celular MTT; e para os ensaios de mecanismo de ação utilizou-se a dose calculada para o IC₅₀. O meio de cultura do grupo controle (ausência dos peptídeos) continha apenas água nanopura na mesma proporção que foi adicionada aos outros grupos experimentais.

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

4.13. Análise de efeitos citostáticos

Esses testes têm como objetivo avaliar se o peptídeo *pentadactylin* induz efeitos relacionados ao bloqueio da proliferação e do ciclo celular. Tal avaliação é importante, considerando que a proliferação celular descontrolada é uma das principais características do câncer. Além disso, moléculas indutoras de efeitos citostáticos em células tumorais são promissoras para tratamentos terapêuticos dessa doença.

4.13.1. Ciclo Celular

A identificação das fases do ciclo celular foi realizada de acordo com protocolo descrito por Peres e Curi (2005). Após o tratamento com 49 μM de *pentadactylin* sintético, células de MCF-7 ressuspensas em 100 μL de meio de cultura (ver item 4.12) foram incubadas em 200 μL de tampão de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% Triton X-100 e 20 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio diluído em PBS, pH 7,4) por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram protegidas da luz durante o tempo de incubação. Em seguida, essa suspensão foi avaliada em citômetro de fluxo no canal FL2-A (sensível a detecções na faixa de 560 e 580 nm) para a identificação das fases do ciclo celular. Os dados obtidos foram analisados com o programa *CellQuest 3.0.1* (Becton & Dickinson, EUA). O cálculo da proporção de células em cada uma das fases do ciclo celular foi realizado considerando-se apenas as células com DNA não fragmentado. A significância das proporções das médias das triplicatas foi analisada por teste t. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

4.14. Análise de efeitos citotóxicos

Esses testes tiveram como objetivo avaliar se o PAM *pentadactylin* induz efeitos em estruturas celulares vitais levando a morte celular. Tal avaliação foi feita em diversas estruturas celulares visando observar diferentes aspectos dos efeitos dessa molécula nas células. Essas observações forneceram pistas valiosas sobre os possíveis mecanismos de ação do peptídeo estudado. Considerando que a indução de morte celular é uma das principais estratégias utilizadas em tratamentos contra o câncer, a identificação de novas moléculas com tais efeitos é potencialmente promissora.

4.14.1. Viabilidade Celular (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT estabelecido por Mosmann (1983). Esse é um dos métodos colorimétricos mais utilizados em testes preliminares para

identificar e determinar as concentrações ativas de novas moléculas anticarcinogênicas. Em células metabolicamente viáveis, enzimas mitocondriais, como a succinil-desidrogenase, reduzem o substrato MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) formando formazan, um produto de cor azulada. Dessa forma, a quantificação da produção de formazan por células submetidas a determinado tratamento está correlacionada com sua viabilidade.

As células tumorais (MCF-7, HeLa e B16F10) e normais (FHN) foram cultivadas e tratadas com os peptídeos PGL-LI, *fallaxin* e *pentadactylin* em placas de 96 poços como descrito no item acima. Após o período de incubação, o meio de cultura das placas foi removido e 150 µL de solução de uso de MTT (15 µL de MTT 5mg/mL diluídos em 135 µL de DMEM completo) foram adicionados em cada poço. As células foram incubadas por 3 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi removido e 100 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver o formazan formado. A quantificação do formazan foi feita pela medida da absorvância dos poços no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro conjugado a uma leitora de microplacas (BioRad 3550-UV).

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

4.14.2. Fragmentação de DNA

A determinação da fragmentação de DNA foi realizada de acordo com protocolo já descrito (PERES *et al.*, 2005). Após o tratamento com 49 µM de *pentadactylin* sintético, células de MCF-7 ressuspensas em 100 µL de meio de cultura (ver item 4.12) foram incubadas em 200 µL de tampão de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% Triton X-100 e 20 µg/mL de iodeto de propídio diluído em PBS, pH 7,4) por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram protegidas da luz durante o tempo de incubação. Em seguida, essa suspensão foi avaliada em citômetro de fluxo no canal FL2-H (sensível a detecções na faixa de 560 e 580 nm). Os dados obtidos foram analisados no programa *CellQuest 3.0.1* (Becton & Dickinson, EUA). A significância das proporções das médias das triplicatas foi analisada por teste t. Foi considerado estatisticamente significativo p<0,05.

4.14.3. Potencial de Membrana Mitocondrial

A rodamina 123 é uma molécula fluorescente catiônica permeável à membrana plasmática e rapidamente seqüestrada por mitocôndrias com potencial de membrana normalizado. Alterações no potencial de membrana da mitocôndria desencadeiam um efluxo da rodamina 123 da mitocôndria (Chen *et al.*, 1982). Muitos grupos de pesquisa vêm utilizando esse composto para analisar alterações no potencial de membrana mitocondrial de células tratadas com compostos citotóxicos (Peres *et al.*, 2005).

No presente estudo, a determinação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada de acordo com protocolo já descrito (Peres *et al.*, 2005). Após o tratamento com 49 μM de *pentadactylin* sintético, células de MCF-7 ressuspensas em 100 μL de meio de cultura (ver item 4.12) foram lavadas com 500 μL de PBS. Em seguida, as células foram ressuspensas em 500 μL de PBS e incubadas no escuro com 0,5 μL de solução de rodamina 123 (5 mg/mL diluídos em etanol) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS. Por fim, elas foram incubadas com 300 μL de PBS por 30 minutos (temperatura ambiente e no escuro) e avaliadas em citômetro de fluxo no canal FL1-H (sensível a detecções na faixa de 515 a 530 nm). Os dados obtidos foram analisados no programa *CellQuest 3.0.1* (Becton & Dickinson, EUA). Todas as etapas de lavagem foram seguidas por centrifugação (750 g por 3 minutos) e descarte do sobrenadante. A significância das proporções das médias das triplicatas foi analisada por teste t. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

4.14.4. Integridade da Membrana Plasmática

A integridade da membrana plasmática foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan. Em células viáveis, esse corante penetra pela membrana plasmática, mas é rapidamente externalizado. Já em células que apresentam a membrana plasmática comprometida, o azul de tripan não sai da célula, a qual permanece corada de azul (Freshney, 2000).

Após tratamento com 49 μM de *pentadactylin* sintético, as células de MCF-7 foram ressuspensas em 100 μL de meio de cultura (ver item 4.12). Uma alíquota de 10 μL dessa suspensão foi adicionada a 20 μL de solução de azul tripan, sendo que 8 μL dessa mistura foram lentamente depositados em câmara de Neubauer. As células foram contadas diferencialmente, sendo que células brancas foram consideradas com a membrana plasmática íntegra e células coradas de azul com a membrana plasmática danificada. Em seguida, a

proporção de células coradas em azul em relação ao número total de células foi determinada. A significância das proporções das médias das triplicatas foi analisada por teste t. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

4.14.5. Morfologia Celular

A morfologia celular é um importante indicativo de viabilidade. Alterações severas desencadeadas por agentes citotóxicos geralmente culminam na modificação da morfologia celular. A microscopia de contraste de fase consiste na passagem da luz do microscópio por um anel de contraste, que atinge a amostra e produz um efeito de destaque, onde estruturas claras ficam mais claras e estruturas escuras ficam mais escuras. Dessa forma é possível observar e analisar rapidamente a morfologia de células imersas em meio de cultura sem utilização de fixadores ou corantes.

No presente trabalho, após o período de tratamento (ver item 4.12), as placas de cultura foram observadas em microscópio de contraste de fase invertido (UNICO, EUA) para análise de possíveis alterações morfológicas. A aquisição das imagens foi realizada com o uso de câmera digital acoplada a ocular do microscópio e o *software* de aquisição *Scope* (versão 1.0.0.0, 2003).

4.15. Quantificação protéica

A fim de determinar a concentração protéica das alíquotas que seriam utilizadas nos ensaios proteolíticos e de atividade fosfolipásica, foi realizada a quantificação do conteúdo protéico da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* por meio do microensaio de Bradford, com curva de calibração construída a partir de diluições de albumina sérica bovina (solução-estoque 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Esse é um método rápido e acurado de estimar a concentração protéica de uma amostra, o qual se baseia na ligação do corante *Coomassie blue G250* às proteínas (Kruger, 2002). A quantificação de peptídeos puros para a realização dos ensaios antimicrobianos, hemolíticos e antitumorais foi realizada por pesagem em microbalança.

4.16. Eletroforese em Gel Desnaturante de Poliacrilamida 12% (SDS-PAGE)

O protocolo de SDS-PAGE foi uma das ferramentas mais úteis desenvolvidas na área da biologia molecular. A separação de proteínas e peptídeos por esse método torna possível a quantificação do total de uma determinada proteína/peptídeo e a determinação

aproximada de sua massa molecular. Esse gel em tampão de corrida do tipo glicina resolve proteínas entre 3-200 kDa (Judd, 2002).

O gel de poliacrilamida 12% foi preparado entre placas de vidro utilizando o sistema de eletroforese da Hoefer. O gel separador foi feito em um volume de 16 mL, sendo composto por 5,44 mL de água Milli-Q, 40% de acrilamida/bisacrilamida (PlusOne), 25% de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 1% de SDS 10% (p/v), 1% de PSA 10% (p/v) e 0,04% (v/v) de TEMED. O gel concentrador foi preparado em um volume de 5 mL e polimerizado sobre o separador entre as placas de vidro juntamente com o pente. O concentrador foi constituído de 2,8 mL de água Milli-Q, 12,6% de acrilamida/bisacrilamida, 25% de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 1% de SDS 10% (p/v), 5% de PSA 10% (p/v) e 0,08% (v/v) de TEMED (Santos, 2007).

Após a polimerização, 15 e 20 µg da secreção de *L. labyrinthicus* foram misturadas ao tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, SDS 2%, DTT 0,1M, azul de bromofenol e água Milli-Q), fervidos por 3 min e aplicados no gel. O marcador de massa molecular (Amersham Pharmacia-Biotech) utilizado foi uma mistura de proteínas de massas moleculares conhecidas: fosforilase b (94 kDa), albumina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), e lactolbumina (14,4 kDa). A eletroforese foi realizada em tampão Tris-base 0,55 mol/L - Glicina 1,92 mol/L pH 8,3, sob corrente constante de 3 mA, 21°C por 16 h.

4.17. Coloração com nitrato de prata

Após a eletroforese, o gel foi corado com nitrato de prata segundo Blum *et al.* (1987). Primeiramente, o gel foi fixado com etanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e formaldeído 0,05% (v/v) por 1 h. Em seguida, incubado em etanol 50% (v/v) por 20 min e sensibilizado por tiosulfato de sódio 0,02% (p/v) por 1 min. A sensibilização foi seguida de lavagem em água Milli-Q por 1 min e impregnação com solução de nitrato de prata 0,2% (v/v) e formaldeído 0,075% (v/v) por 20 min. Finalmente, o gel foi lavado por 1 min em água Milli-Q e revelado em sala escura com carbonato de sódio 6% (p/v), formaldeído 0,05% (v/v) e tiosulfato de sódio 0,27% (p/v). A reação foi interrompida incubando-se o gel por 1 h na mesma solução utilizada na fixação.

4.18. Atividade caseinolítica

O teste de atividade caseinolítica evidencia a clivagem da caseína por enzimas proteolíticas, fazendo com que os peptídeos resultantes da clivagem permaneçam em

suspensão após precipitação com ácido tricloroacético, de tal modo que o sobrenadante obtido após a centrifugação das amostras incubadas com a caseína possa ser medido com relação à sua absorvância a 280 nm (Cominetti, 2007).

O ensaio foi realizado como descrito por Sousa (2003). A uma alíquota de 40 µg de secreção de *L. labyrinthicus* (quantificada por microensaio de Bradford), solubilizada em 250 µL de tampão HEPES 100 mM pH 8,0, contendo CaCl₂ 10 mM, acrescentaram-se 500 µL de solução de caseína 0,1% (p/v), preparada com o tampão HEPES. Como controle negativo, adicionaram-se 250 µL de tampão a 500 µL da solução de caseína. A incubação foi feita a temperatura ambiente por 2 h. Ao final, acrescentou-se 1,25 mL de TCA 10% (p/v) para parar a reação. A amostra e o controle foram centrifugados a 8.106 g por 10 min e fez-se a leitura de absorvância a 280 nm em cubeta de quartzo.

Para a verificação da termolabilidade e do pH ótimo de atividade, o ensaio acima foi repetido em diferentes condições. O efeito da temperatura foi verificado realizando-se o ensaio caseinolítico com incubação a 25, 37 e 50°C. Para o estudo do efeito do pH, o ensaio foi realizado com os tampões contendo CaCl₂ 10 mM: acetato de sódio 100 mM pH 4,0 e pH 5,0; HEPES 100 mM pH 6,0 e pH 7,0 e Tris-HCl 100 mM pH 8,0, pH 9,0 e pH 10,0. Todos os testes foram realizados em duplicata. A análise estatística dos dados foi feita por ANOVA de uma via seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

4.19. Atividade gelatinolítica

O ensaio de atividade gelatinolítica foi realizado como em Menezes *et al.* (2006) com modificações por zimografia. Este ensaio é extremamente sensível, capaz de detectar picomoles de enzimas proteolíticas, além de ser capaz de separar enzimas de agentes mascaradores da atividade (Almeida *et al.*, 2002).

Alíquotas de 40 µg de secreção de *L. labyrinthicus*, sem aquecimento prévio, foram misturadas ao tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 15% (v/v) e azul de bromofenol) e aplicadas em gel SDS-PAGE 9% contendo 0,1% (p/v) de gelatina como substrato para atividade proteolítica. A eletroforese ocorreu a 4°C, em aparelho Mini Protean II (BioRad), com voltagem constante de 90V. Após a corrida, os géis foram submetidos a cinco lavagens de 15 min em 2,5% (v/v) de Triton X-100 para remover traços de SDS. Finalmente, foram lavados com água destilada para remover o excesso de Triton X-100 e incubados a 25°C por 22 h em diferentes tampões de incubação, como descrito a seguir.

Os géis foram corados em solução de *Coomassie Blue R250* 0,25% (p/v) em solvente metanol/ácido acético/água (50:10:40) e descorados no mesmo solvente, para revelar as bandas onde houve atividade gelatinolítica. A digestão da gelatina foi identificada como zonas claras de lise contra o fundo corado em azul.

Para a verificação do melhor tampão de incubação, os seguintes tampões em pH 8,0 foram testados: Tris-HCl 50 mM; Tris-HCl 50 mM contendo CaCl₂ 1 mM ou 10mM; Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM e 0,02% CHAPS (p/v); o tampão anterior contendo EDTA 10 mM; Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 1 mM e SO₄Zn 1 mM.

O pH de atividade ótima foi observado incubando-se os géis em diferentes tampões contendo CaCl₂ 10 mM: acetato de sódio 50 mM pH 4,0 e pH 5,0; HEPES 50 mM pH 6,0 e pH 7,0 e Tris-HCl 50 mM pH 8,0, pH 9,0 e pH 10,0.

4.20. Ensaio fluorogênico

Todos os ensaios fluorogênicos foram feitos no Laboratório de Patologia e analisados no Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília.

4.20.1. Em placa

Ensaios com substratos enzimáticos baseados no fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina (AMC) são ferramentas bastante populares e bem estabelecidas para estudo de atividade e especificidade de peptidases (Thornberry *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2003). Nesses substratos, o AMC está ligado ao peptídeo pela formação de uma ligação entre a amina cumarínica e o grupo carboxil do resíduo de aminoácido C-terminal (Figura 13). A proteólise dessa ligação libera o AMC livre, resultando em um grande aumento da fluorescência que pode ser detectada a 445 nm após excitação a 345 nm. Bibliotecas de peptídeos ligados ao AMC já foram sintetizadas para a investigação da especificidade ao substrato por proteases.

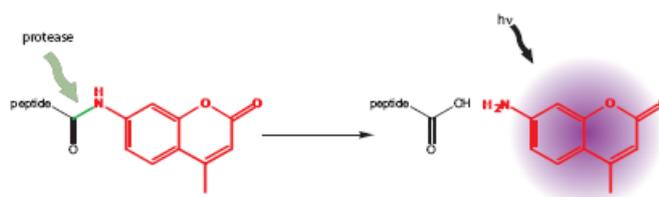


Figura 13. O emprego dos substratos marcados com o fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina (AMC) está relacionado à liberação do grupo AMC por ataque proteolítico, levando a um aumento na fluorescência do meio detectado em 445 nm após excitação a 345 nm.

No presente ensaio, foi determinada a especificidade do substrato para o conjunto de proteases presentes na secreção cutânea de *L. labyrinthicus* usando diferentes aminoácidos acoplados ao fluoróforo AMC (Sigma-Aldrich Company) (Tabela 2). Estoques de 200 μM de cada substrato foram preparados em tampão HEPES 25 mM pH 7,5. Em cada poço de uma placa de 96 poços de fundo chato, foram adicionados 10 μL (15,6 μg) da secreção cutânea recém-extraída e não-lioofilizada de *L. labyrinthicus* e 80 μL do mesmo tampão em que se prepararam os substratos. Como controle, utilizou-se tampão no lugar da amostra. A reação foi iniciada pela adição de 10 μL da solução-estoque de substrato usando uma pipeta multicanal. A liberação do AMC foi imediatamente acompanhada em uma leitora de fluorescência de placa (Spectra Max M2 - Molecular Devices) a $\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$ com leituras a cada 3 min por 30 min. A velocidade de cada reação foi calculada pelo *software Soft Max Pro* (Molecular Devices) em mili-UF/min. O ensaio foi realizado em triplicata.

Tabela 2. Substratos fluorogênicos (Sigma-Aldrich Company) utilizados no experimento em placa para avaliação da atividade proteolítica.

Substratos fluorogênicos

N-Succinyl-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC^a

Gly-Pro-AMC

N-Succinyl-Ile-Ala-AMC

L-Pro-AMC

N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC

L-Leu-AMC

N-Succinyl-Leu-Tyr-AMC

N α -CBZ-Gly-Gly-Arg-AMC

N-CBZ-Gly-Gly-Arg-AMC

N-CBZ-Phe-Arg-AMC

L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC

N α -CBZ-L-Arg-AMC

^a AMC: 7-amino-4-metilcumarina

4.20.2. Influência da concentração protéica na atividade

O mesmo ensaio fluorogênico em placa foi feito analisando-se a atividade hidrolítica de diferentes concentrações do veneno da rã-pimenta sobre 10 μL dos peptídeos Gly-Pro-AMC, L-Leu-AMC e L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC na concentração final de 20 μM . O tampão utilizado foi o HEPES 50 mM pH 7,5 e as concentrações testadas foram: 0, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 μL (1,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). As leituras foram realizadas em intervalos de 3 min durante 30 min para a determinação da velocidade máxima de cada concentração.

4.20.3. Determinação do pH ótimo

O ensaio descrito acima foi realizado novamente incubando-se 32 μL (25,6 μg) de secreção fresca com 58 μL de tampão AMT (ácido acético 25 mM, MES 25 mM e Tris-base 25 mM) nos pHs 5,0; 6,0; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9 e 10 por 15 min a temperatura ambiente. A hidrólise foi iniciada pela adição de 10 μL da solução-estoque dos substratos Gly-Pro-AMC, L-Leu-AMC e L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC usando uma pipeta multicanal. A liberação do fluoróforo AMC foi monitorada em uma leitora de fluorescência de placa (Spectra Max M2 - Molecular Devices) a $\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$ por 30 min para a determinação (Soft Max Pro - Molecular Devices) da velocidade máxima (mili-UF/min) nos diferentes pHs.

4.20.4. Em gel SDS-PAGE 10%

Alíquotas de 16,3 μL (15,2 μg) de secreção de *L. labyrinthicus*, sem aquecimento prévio, foram misturadas ao tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 15% (v/v) e azul de bromofenol) e aplicadas em gel SDS-PAGE 10%. A eletroforese ocorreu a 4°C, em aparelho Mini Protean II (BioRad), com voltagem constante de 90V. Após a corrida, os géis foram submetidos a quatro lavagens de 15 min em 2,5% (v/v) de Triton X-100 para remover traços de SDS, sendo então lavados três vezes por 15 min com tampão HEPES 25 mM pH 7,5 para remover o excesso de Triton X-100 e promover a renaturação das proteínas. Finalmente, os géis foram incubados por 15 min com os substratos fluorogênicos (20 μM) Gly-Pro-AMC, L-Leu-AMC e L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC e os resultados foto-documentados sob exposição à luz UV. Esses substratos foram selecionados por terem sido clivados pela amostra testada no ensaio realizado em placa de 96 poços de fundo chato descrito anteriormente.

4.20.5. Ensaio de inibição

O ensaio fluorogênico em placa foi repetido na presença de diferentes inibidores, cada um em uma determinada concentração (Tabela 3), para a determinação do grupo a que pertenciam as proteases presentes na secreção cutânea de *L. labyrinthicus*. Aliquotas de 10 µL da solução-estoque 10x de inibidor foram incubados com 32 µL (25,6 µg) de secreção cutânea fresca de *L. labyrinthicus* por 45 min à temperatura ambiente. Logo em seguida, foram adicionados 10 µL dos substratos que foram clivados nos ensaios anteriores. Cada substrato foi testado com todos os inibidores. Como controle de 100% de inibição, utilizou-se tampão HEPES 50 mM pH 7,5 no lugar da amostra e para 0% de inibição, incubou-se a amostra com o mesmo tampão na ausência de inibidores. A influência dos solventes metanol e isopropanol em que os inibidores foram dissolvidos foi obtida incubando-se 10 µL de cada solvente com a amostra pelo mesmo período. A análise dos resultados foi realizada como descrita acima e apresentada na forma de atividade relativa (%) em relação ao controle.

Tabela 3. Inibidores utilizados no ensaio fluorogênico, especificando-se o seu alvo de inibição, a concentração utilizada e o solvente em que foi ressuspenso.

Inibidor	Alvo	Concentração final	Estoque 100x	Solvente
TPCK	Irreversível serino/cisteíno-peptidases	100 µm	10 mM	Metanol
PMSF	Irreversível serino/cisteíno-peptidases	1 mM	100 mM	Isopropanol
TLCK	Irreversível serino/cisteíno-peptidases	100 µm	10 mM	Água pH 3,0
Pepstatina A	Reversível, ativos na presença de DTT peptidases aspárticas e ácidas	1 µm	100 µm	Metanol

Leupeptina	Reversível, ativos na presença de DTT serino/cisteíno-peptidases	100 µM	10 mM	Água
EDTA	Metalo-peptidases	10 mM	1 M	Água pH 8,0
E-64	Cisteíno-peptidases	10 µM	1 mM	Água
Bestatina	Amino-peptidases	10 µM	1 mM	Metanol
Fenantrolina	Metalo-peptidases	10 mM	1 M	Metanol

4.21. Ensaio de atividade fosfolipásica

A secreção cutânea liofilizada de *L. labyrinthicus* foi submetida a um ensaio de atividade fosfolipásica do tipo A₂ descrito por Price III (2007) com modificações. Este ensaio parte do princípio que a liberação de ácidos graxos pela enzima PLA₂ altera o pH, alteração esta detectável pela mudança da absorvância do corante indicador.

Amostras da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* e da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (controle positivo) foram diluídas em tampão HEPES 2 mM e o pH ajustado para 7,0. Aliquotas de 20 µL de cada amostra ou do tampão HEPES 2 mM pH 7,0 foram transferidas para os poços de uma placa de 96 poços de fundo chato. Posteriormente, adicionaram-se 180 µL da solução de ensaio contendo HEPES 2 mM, Triton X-100 5 mM, CaCl₂ 10 mM, fosfatidilcolina 25 mM (Sigma; tipo II-S; 20%) e 0,0124% (p/v) de azul de bromotimol (Vetec) em água pH 8,0. A cinética da reação foi imediatamente analisada em uma leitora de microplaca a 595 nm (BioRad 3550-UV), com leituras realizadas em intervalos de 1 min durante 5 min e em intervalos de 5 min por mais 25 min.

Todas as soluções do ensaio foram preparadas e armazenadas a 4°C, exceto o substrato (fosfatidilcolina), o qual foi dissolvido na concentração de 76 mg/mL em metanol apenas na hora do uso, visto que sofre hidrólise em meio aquoso. A dissolução em metanol foi realizada após 5 minutos de agitação e 15 min de sonicação. Este é um teste colorimétrico simples e barato, feito em pH fisiológico e que possui uma alta sensibilidade, além de utilizar uma pequena quantidade de enzima por ser realizado em pequeno volume. Os resultados

foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Fracionamento da secreção cutânea e análise por espectrometria de massa

Alíquotas de 5,0 mg da secreção bruta foram inicialmente fracionadas em coluna C₁₈ por RP-HPLC a um fluxo de 1 mL/min, obtendo-se o perfil cromatográfico abaixo (Figura 14). O perfil apresentou uma boa reprodutividade ao longo das corridas cromatográficas realizadas, totalizando uma média de 58 frações coletadas manualmente.

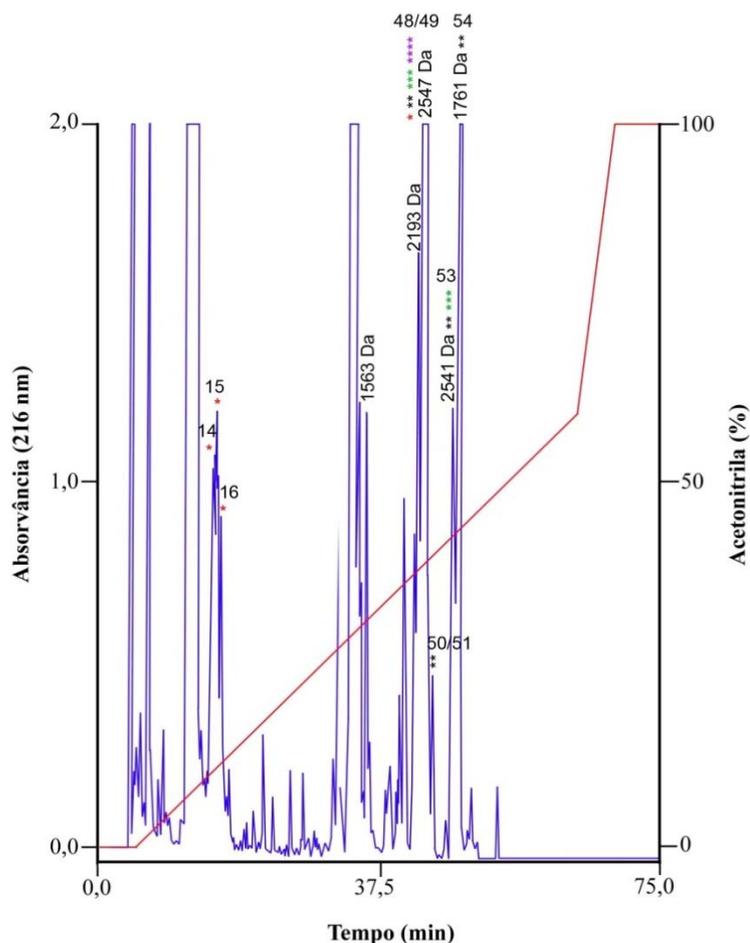


Figura 14. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* em coluna C₁₈ (Vydac 218TP54) em sistema HPLC com emprego de gradiente linear de acetonitrila/TFA 0,1%. O monitoramento das frações foi a 216 nm e a eluição realizada com fluxo de 1 mL/min. As frações contendo os peptídeos utilizados ao longo do trabalho estão indicadas pelas massas moleculares dos peptídeos (1563 Da, 2193 Da, 2547 Da, 2541 Da e 1761 Da). As frações que apresentaram atividade nos *screenings* biológicos estão identificadas pelos seguintes símbolos: * hemolítica; **contra *E. coli*; ****P. aeruginosa*; *****S. aureus*.

Após secagem, cada fração obtida foi ressuspensa em tampão apropriado, plaqueada e analisada em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (Autoflex II, Bruker Daltonics, Alemanha) cobrindo uma faixa de m/z de 500 a 20.000 Da. Os peptídeos e proteínas cujas massas $[M + H]^+$ foram identificadas (apresentados no Anexo 2) foram agrupados e representados na Figura 15.

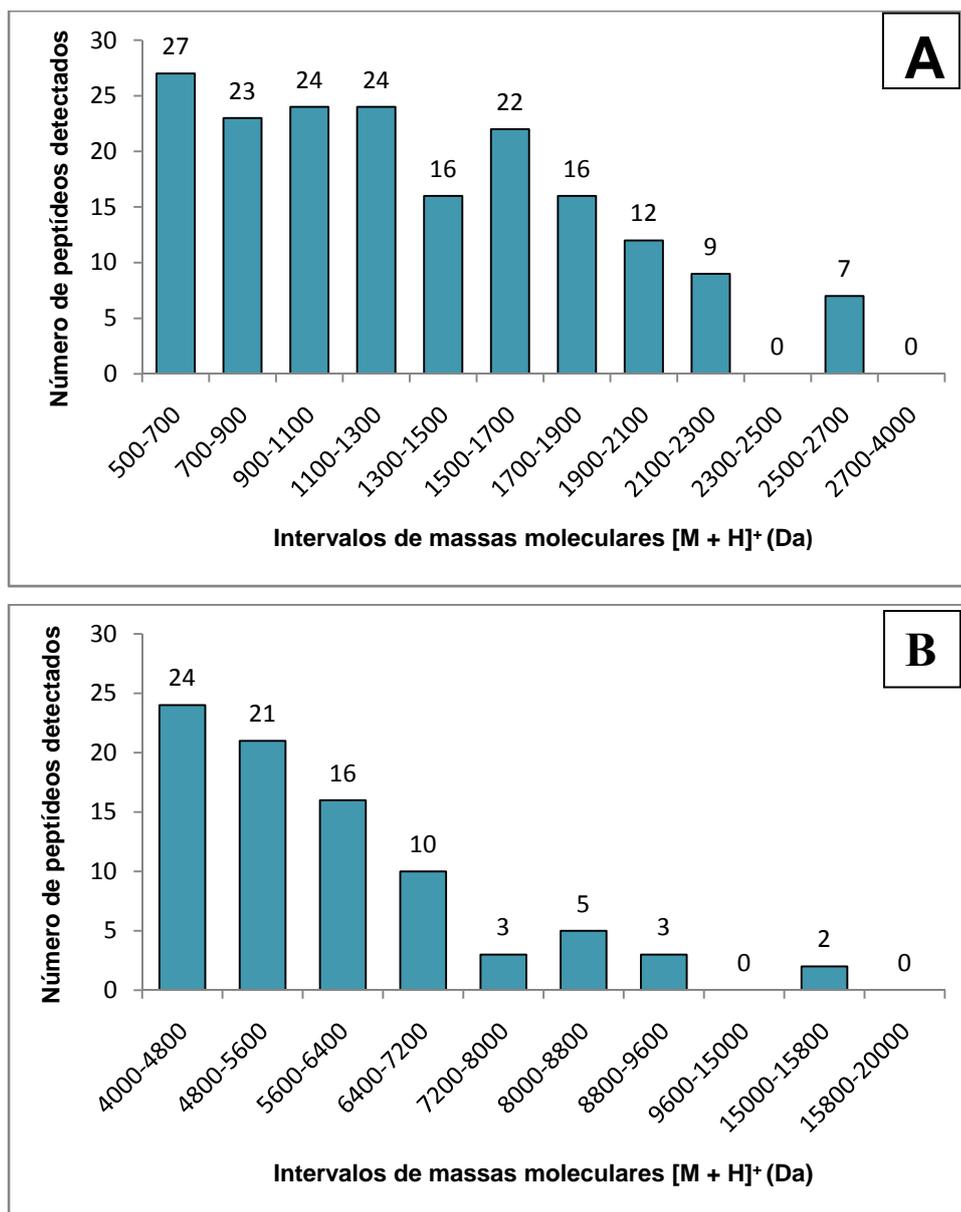


Figura 15. Composição peptídica/protéica da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* representada em grupos de massa molecular monoisotópicas obtidos pela análise por espectrometria de massa MALDI-TOF das frações oriundas de uma corrida de RP-HPLC. **(A)** Quantidade de peptídeos presentes na secreção que possuem até 4 kDa $[M+H]^+$. **(B)** Número de peptídeos/proteínas com m/z entre 4 e 20 kDa $[M+H]^+$.

5.2. Ensaios preliminares hemolítico, antimicrobiano e análise por espectrometria de massa

A partir das frações obtidas com uma corrida cromatográfica, realizou-se um ensaio preliminar de atividade antimicrobiana (contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*) e de atividade hemolítica. A fração 48/49 foi ativa contra as três bactérias testadas. A fração 53 demonstrou atividade contra as bactérias Gram-negativas e as frações 50 e 54 apenas contra *E. coli*. As frações 14, 15, 16, 48/49 apresentaram fraca atividade hemolítica (Figura 14).

As frações 48/49, 53 e 54 de várias corridas foram reunidas e analisadas no espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF. A massa monoisotópica $[M+H]^+$ dos peptídeos responsáveis pela atividade biológica da fração 48/49 foi 2.547 Da, da fração 53 foi 2.541 Da e da 54 foi 1.761 Da. É importante ressaltar que as frações não se apresentavam puras, os peptídeos indicados como os responsáveis pelas funções testadas eram os mais abundantes de cada amostra.

5.3. Purificação dos peptídeos de interesse

As frações contendo os peptídeos de massa monoisotópica 1.563 Da, 2.193 Da, 2.547 Da, 2.541 Da e 1.761 Da foram acumuladas e recromatografadas em coluna C_{18} (Onyx monolítica ou Vydac 218TP54) por RP-HPLC, sendo a eluição realizada a 1 mL/min segundo os gradientes apresentados na Figura 16.

Os materiais resultantes das recromatografias foram analisados quanto ao grau de pureza por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF no modo refletor de íons positivos na faixa de massa de 500 a 4.000 Da. A faixa de massa de 4 a 20 kDa também foi analisada em busca de possíveis contaminantes, verificando-se que os três peptídeos estudados encontravam-se puros (Figura 17).

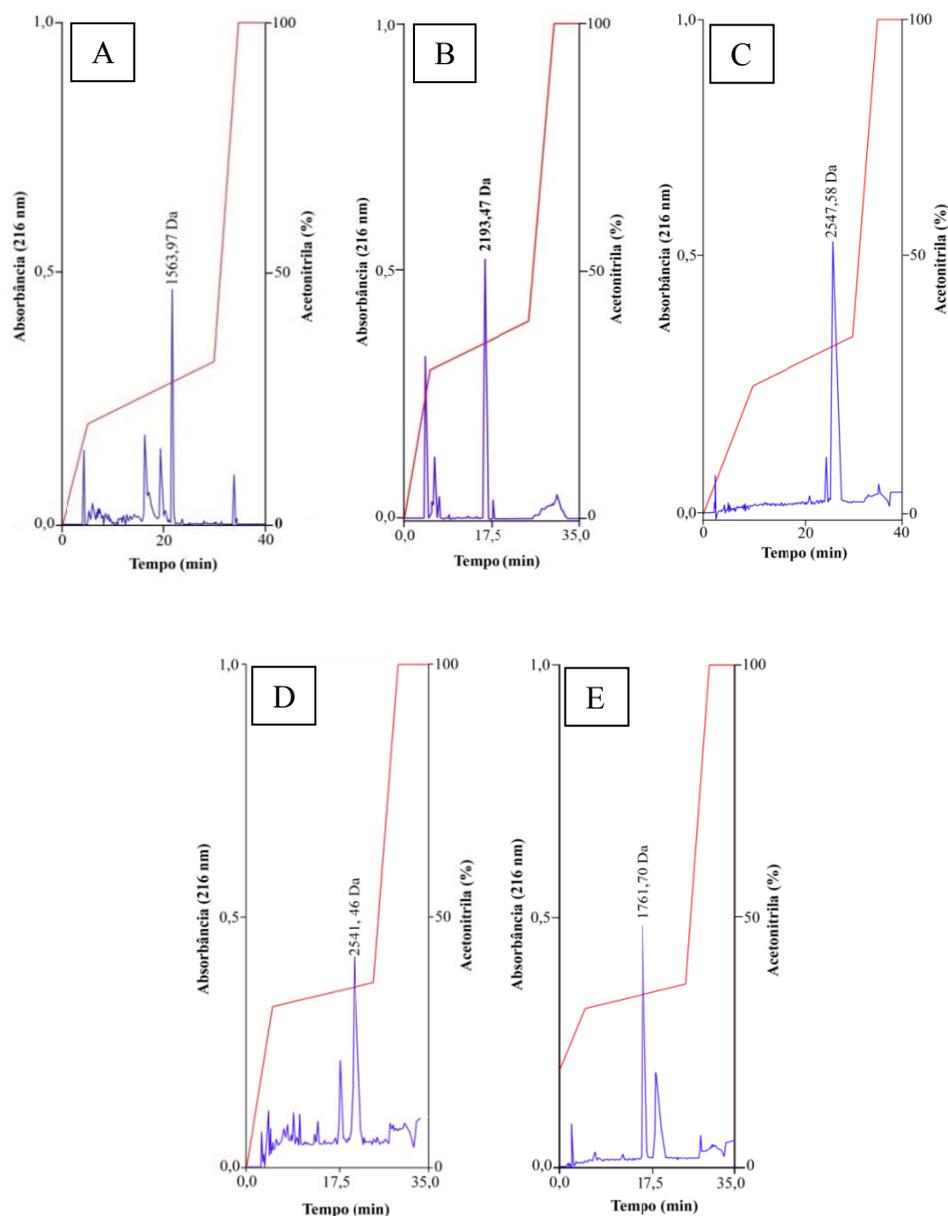


Figura 16. Purificação dos peptídeos de interesse. As recromatografias dos peptídeos de massa 2.541 Da e 1.761 Da foram realizadas por RP-HPLC em coluna analítica C₁₈ Onyx monolítica, já os peptídeos de 2.547 Da, 2.193 Da e 1.563 Da foram isolados com uma coluna C₁₈ Vydac (218TP54) a um fluxo de 1 mL/min. (A) Purificação do peptídeo de 1.563 Da por meio do gradiente de 20–32,5% de acetonitrila/TFA 0,1% por 25 min; (B) 2.193 Da (30–40% de acetonitrila/TFA 0,1% por 20 min); (C) 2.547 Da (26–36% de acetonitrila/TFA 0,1% por 20 min). Purificação do peptídeo de 2.541 Da (D) e 1.761 Da (E) utilizando-se o gradiente de 32–37% de acetonitrila/TFA 0,1% em 20 min. A eluição foi monitorada a 216 nm. Os picos contendo os peptídeos purificados estão indicados pela massa molecular monoisotópica dos mesmos.

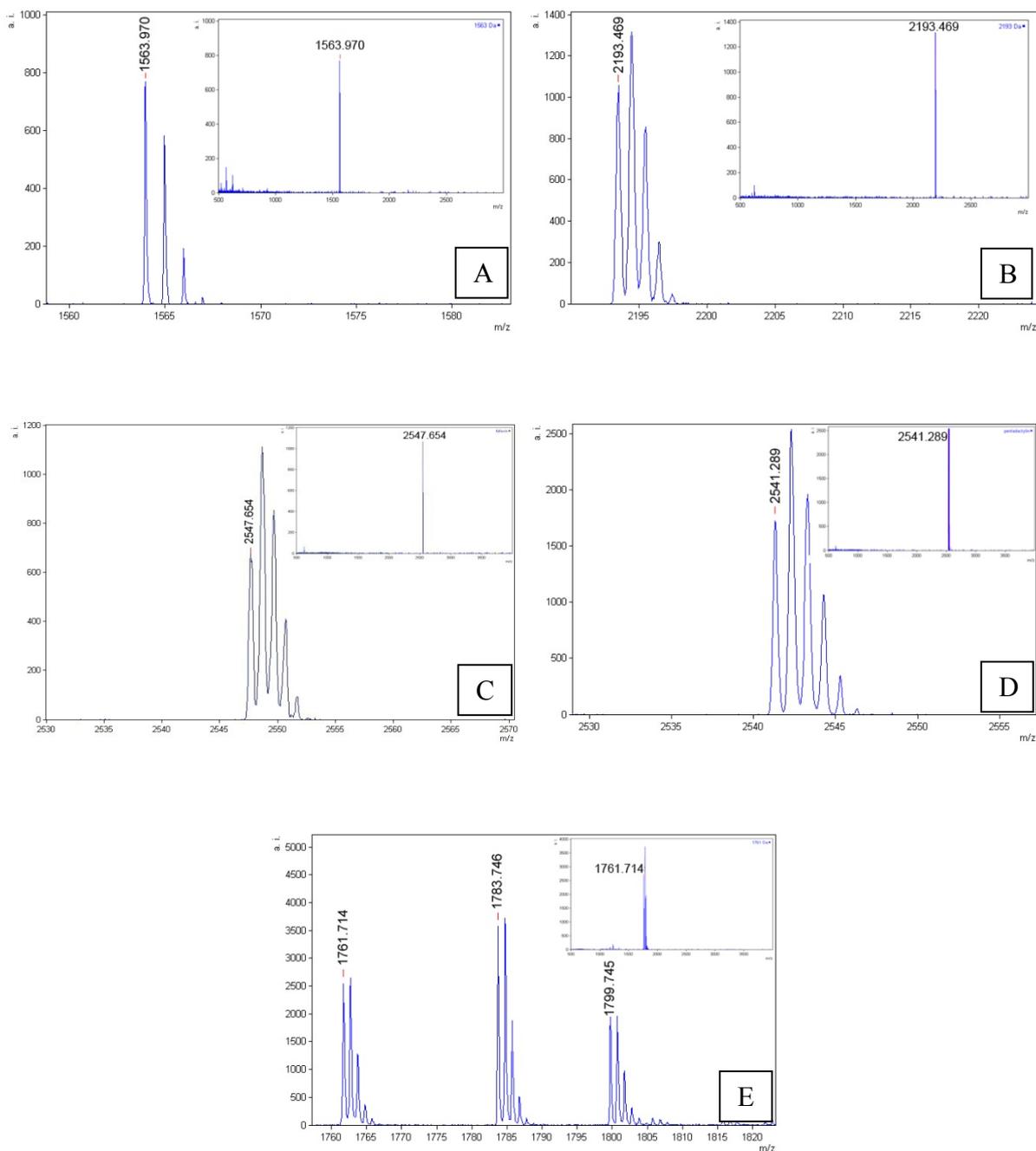


Figura 17. Espectros de massa dos peptídeos **(A)** 1.563 Da, **(B)** 2.193 Da, **(C)** 2.547 Da, **(D)** 2.541 Da e **(E)** 1.761 Da purificados por RP-HPLC em coluna analítica C₁₈. As massas de 1.783 Da e 1.799 Da observadas na figura E são os adutos de sódio e de potássio do peptídeo de 1.761 Da. Os espectros foram obtidos plaqueando-se as amostras com HCCA 20 µg/µL e analisando-se na faixa de massa de 500 a 4000 Da no modo refletor de íons positivos calibrado com *Pepmix*.

5.4. Caracterização química dos peptídeos

As estruturas primárias dos peptídeos de interesse foram determinadas em estudos anteriores por degradação de Edman em seqüenciador automático de proteínas e peptídeos modelo 477A da Applied Biosystems. O peptídeo de 1.761 Da, rico em glicina e leucina, foi denominado de PGL-L1 e apresentou a seguinte estrutura primária: $^1\text{GLLGLLGPLLGGGGGGGGGLL}^{22}$. O peptídeo de massa monoisotópica 2.541 Da: $^1\text{GLLDTLKGAAKNVVGSLASKVMEKL}^{25}$; e o de 2.547 Da: $^1\text{GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL}^{25}$. Dois fragmentos do peptídeo anterior foram identificados, o de menor tempo de eluição possui 1.563 Da e foi denominado de Flx-16: $^1\text{GVVDILKGAAKDIAGH}^{16}$; o outro de 2.193 Da, chamado de Flx-22, apresenta a seguinte seqüência: $^1\text{GVVDILKGAAKDIAGHLASKVM}^{22}$.

Por meio de esterificação de Fisher, constatou-se que apenas os peptídeos 2.541 Da e 2.547 Da apresentam a porção C-terminal amidada (Figura 18). A busca por seqüências similares foi realizada pelo *Blast 2*. Os peptídeos estudados também foram comparados *off-line* a outros peptídeos de leptodactídeos usando as informações disponíveis na literatura, visto que a maioria dessas moléculas não se encontra cadastradas no banco de dados públicos disponíveis via internet. A análise de similaridade revelou que os peptídeos 2.541 Da e o de 2.547 Da já haviam sido isolados de outras espécies do gênero *Leptodactylus*. O peptídeo 2.541 Da é conhecido como *pentadactylin*, previamente isolado de *L. pentadactylus* (King *et al.*, 2005), e o de 2.547 Da é o *fallaxin*, presente na secreção de *L. pentadactylus* e *L. fallax* (King *et al.*, 2005; Rollins-Smith *et al.*, 2005). Nenhum peptídeo similar ao PGL-L1 foi encontrado.

A busca também revelou uma maior similaridade de *fallaxin* e *pentadactylin* a outros peptídeos antimicrobianos isolados do gênero *Leptodactylus*, tais como: *sypfaxin* (Dourado *et al.*, 2007), *latticeptin* (Conlon *et al.*, 2006) e *ocellatins* (Nascimento *et al.*, 2004; Nascimento, 2007; Nascimento *et al.*, 2007). O alinhamento dessas seqüências pelo *ClustalW* evidenciou um elevado grau de conservação da porção N-terminal, sendo a porção C-terminal mais variada (Figura 19). A seqüência de consenso encontrada para esses peptídeos foi $^1\text{GVL DILKGAAKDXXXHLA-KVMEKX}^{25}$, onde X indica ambigüidade, demonstrando uma grande conservação da estrutura primária desses peptídeos maduros. Dentre os peptídeos analisados, os peptídeos *ocellatins* são os que apresentaram menor grau de similaridade com os peptídeos *fallaxin* e *pentadactylin* estudados no presente trabalho.

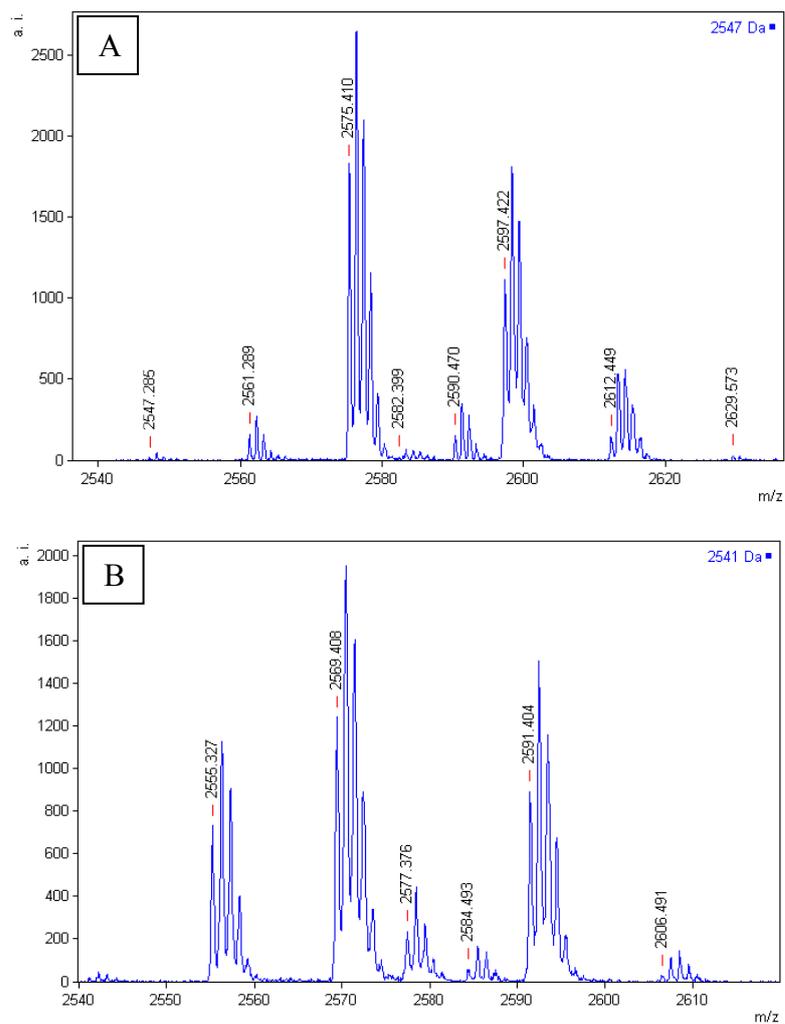


Figura 18. Espectros de massa obtidos após a incubação dos peptídeos **(A)** *fallaxin* (2.547 Da) e **(B)** *pentadactylin* (2.541 Da) com o reagente HCl metanólico no experimento de Esterificação de Fisher. A análise da presença de amidação C-terminal consiste na busca de massas equivalentes ao peptídeo metilado. Cada resíduo metilado corresponde a um incremento de massa de 14 Da. Todos os resíduos ácidos e a porção C-terminal desbloqueada são passíveis de metilação.

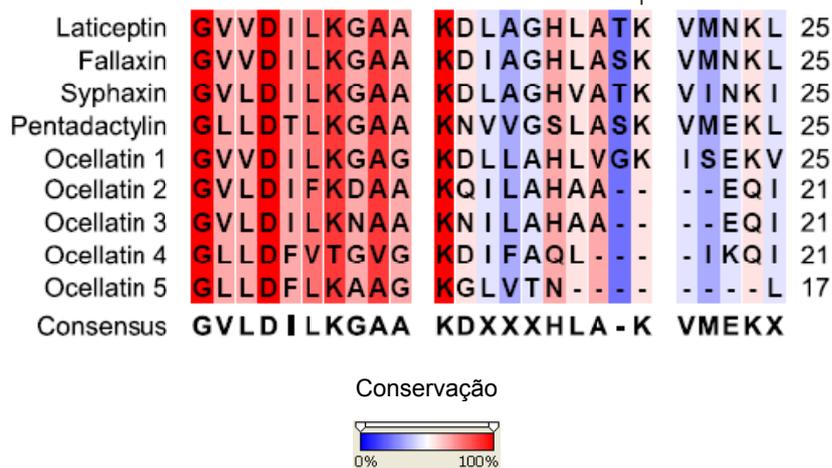


Figura 19. Multi-alinhamento das seqüências de peptídeos isolados de leptodactídeos. Os resíduos em vermelho escuro apresentam 100% de conservação, já aqueles indicados em azul escuro 0%. A seqüência de consenso está indicada abaixo do multi-alinhamento. X indica ambigüidade.

A similaridade entre os nove peptídeos de leptodactídeos foi corroborada pelo filograma abaixo feito pelo programa PAUP (Figura 20). Nota-se pela observação do comprimento dos ramos que o PAM *fallaxin* é mais similar ao *laticeptin* e que o *pentadactylin* ao peptídeo *ocellatin 2*. Os PAMs *ocellatins* apresentam maior similaridade entre si. Todavia, a análise por *bootstrap 50% majority-rule* indicou que a probabilidade desses peptídeos serem realmente similares é baixa. Simplificadamente, o método da análise *bootstrap* consiste em reordenar os caracteres do conjunto de dados de modo a gerar vários outros conjuntos de dados de tamanho igual ao do original, que são analisados, gerando um consenso (*majority rule consensus*) e permitindo a atribuição de um grau de confiança estatística às observações de similaridade. Quanto maior é o valor de *bootstrap* de um grupo da árvore-consenso gerada, maior é seu grau de confiabilidade (Swofford & Begle, 1993). Assim, a similaridade com maior probabilidade de ser verdadeira é entre os PAMs *ocellatin 2* e *ocellatin 3*, sendo de 99%. A análise também forneceu o valor de 63% de veracidade para a similaridade entre os peptídeos *pentadactylin* e os *ocellatins*; e de 75% para o grupo formado pela *syphaxin*, *pentadactylin* e *ocellatins*. A confiabilidade da similaridade entre os outros peptídeos foi menor que 50%, indicando uma forte probabilidade de que as similaridades observadas aconteçam ao acaso.

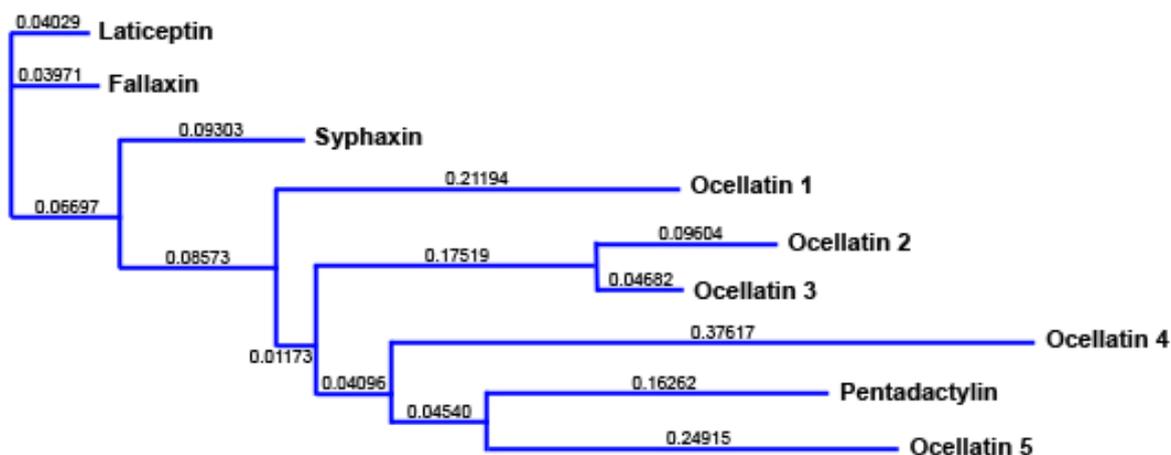


Figura 20. Árvore *neighbor-joining* baseada no alinhamento entre os peptídeos de leptodactilídeos. Os valores de distância estão indicados em cada ramo.

O método da parcimônia produz filogenias com base no menor número de passos (mudanças evolutivas) possíveis. Apesar de amplamente usado, não é um método que permite a inclusão de parâmetros para avaliar a evolução de um grupo de dados e, além disso, não necessariamente a história de um grupo de organismos poderia ser explicada da maneira mais parcimoniosa possível. Nas análises de parcimônia, foram geradas 100 árvores. Cinco grupos externos foram usados: *dermaseptin*, *brevinin 1*, *magainin 2*, *japonicin 1* e *aurein 1.1*. A árvore *strict consensus* não apresentou resolução entre os ramos e os valores de suporte do *bootstrap* foram menores que 50%, não tendo sido possível a determinação de qual carácter é mais antigo e qual é o mais derivado dentre os analisados.

Como já visto em outros trabalhos, as predições das estruturas secundárias dos PAMs *fallaxin*, *pentadactylin*, *laticeptin* e *syphaxin* mostraram que os mesmos apresentam propensão para formar α -hélice, possuem anfipaticidade moderada e são catiônicos. Essas características são evidenciadas nas projeções de Schiffer & Edmundson (1967) (Figura 21), nas quais se pode notar também a idêntica distribuição de resíduos de aminoácidos com as mesmas características de polaridade nos PAMs *fallaxin*, *syphaxin* e *laticeptin*. Deve-se lembrar que não é possível afirmar com certeza que esses peptídeos adotam uma conformação helicoidal, visto que apenas experimentos como o de dicroísmo circular podem esclarecer completamente a questão. Algumas das características químicas como hidrofobicidade e pI desses peptídeos e de seus fragmentos estão sintetizadas na Tabela 4.

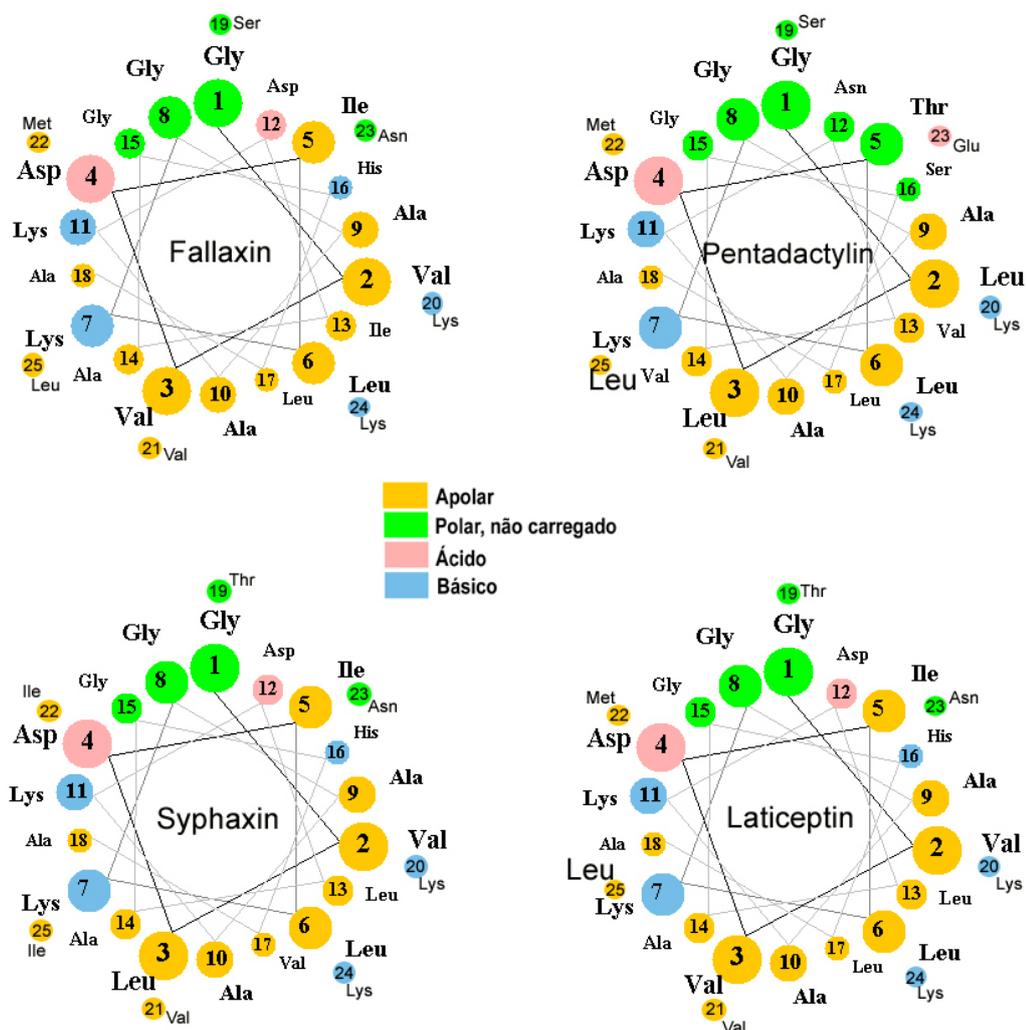


Figura 21. Comparação entre as projeções em hélice de Schiffer & Edmundson (1967) dos peptídeos antimicrobianos *fallaxin*, *pentadactylin*, *syphaxin* e *laticeptin*. As projeções permitem uma melhor visualização da anfipaticidade dessas moléculas.

Tabela 4. Comparação entre alguns dos peptídeos antimicrobianos e seus fragmentos de 22 e 16 resíduos de aminoácidos isolados de leptodactídeos, incluindo: *fallaxin*, *pentadactylin*, *laticeptin* e *syphaxin*. Os parâmetros comparados são a massa molecular monoisotópica (Mm); anfifilicidade, como momento hidrofóbico médio ($\langle\mu H\rangle$); hidrofobicidade média ($\langle H\rangle$); carga em pH neutro; ponto isoelétrico (pI), porcentagem de resíduos hidrofóbicos (%H); atividade contra Gram-positivas (+) e Gram-negativas (-); predição da estrutura secundária.

Peptídeos	Mm (Da)	Carga	pI	$\langle\mu H\rangle$	$\langle H\rangle$	%H	Atividade	Estrutura
<i>Fallaxin</i>	2.547	+3.1	10.5	0.07	-0.14	68	+/-	α -hélice
<i>Flx-22</i>	2.193	+1.1	9.8	0.16	-0.07	73	s.a. ^a	α -hélice
<i>Flx-16</i>	1.563	+0.1	7.8	0.32	-0.07	75	s.a.	α -hélice
<i>Pentadactylin</i>	2.541	+3.0	10.5	0.09	-0.16	64	+/-	α -hélice
<i>Syphaxin</i>	2.543	+3.1	10.5	0.05	-0.11	72	n.d. ^b	α -hélice
<i>SPX(1-22)</i>	2.188	+1.1	9.8	0.13	-0.05	77	+/-	α -hélice
<i>SPX(1-16)</i>	1.576	+0.1	7.8	0.31	-0.08	75	+/-	α -hélice
<i>Laticeptin</i>	2.561	+3.1	10.5	0.06	-0.14	72	-	α -hélice

^a Sem atividade.

^b Não determinada.

5.5. Determinação de HC₅₀, MIC e IC₅₀

Dos quatro peptídeos testados (PGL-LI, *pentadactylin*, *fallaxin* e seu fragmento Flx-16) apenas *fallaxin* foi capaz de lisar eritrócitos humanos na maior concentração testada, e mesmo assim a potência verificada foi baixa (9% de lise). Portanto, não foi possível determinar o HC₅₀ para esse peptídeo.

Os mesmos peptídeos foram testados contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. subtilis* para determinação de MIC. Entretanto, apenas os peptídeos *fallaxin* e *pentadactylin* apresentaram atividade antimicrobiana, sendo que a determinação de MIC para o segundo só foi possível contra as bactérias *E. coli* e *B. subtilis*, visto que na concentração máxima testada com as outras linhagens não houve inibição do crescimento bacteriano. As Tabelas 5 e 6 resumizam os resultados de MIC e HC₅₀ obtidos neste e em outros estudos com PAMs isolados de anfíbios do gênero *Leptodactylus*.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana e hemolítica dos peptídeos estudados. Os valores dos MICs foram obtidos por meio de testes contra cepas de bactérias ATCC. A determinação de HC₅₀ foi realizada incubando-se os peptídeos em diferentes concentrações com eritrócitos de sangue humano O⁺.

Peptídeo	MIC (µM)				HC ₅₀ (µM)
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	
<i>Fallaxin</i>	32	64	32	16	>128 ^a
<i>Pentadactylin</i>	32	>128	>128	2	s.a. ^b
PGL-L1	s.a. ^b	s.a. ^b	s.a. ^b	s.a. ^b	s.a. ^b
Flx-16	s.a. ^b	s.a. ^b	s.a. ^b	s.a. ^b	s.a. ^b

^a Cerca de 9% dos eritrócitos foram lisados na concentração de 128 µM.

^b Sem atividade.

Tabela 6. Comparação dos MICs e do HC₅₀ de PAMS purificados da secreção cutânea de leptodactilídeos. Os valores dos MICs foram obtidos por meio de testes contra cepas de bactérias ATCC. A determinação de HC₅₀ foi realizada incubando-se o peptídeo em diferentes concentrações com eritrócitos de sangue humano O⁺.

Peptídeo	MIC (µM)			HC ₅₀ (µM)	Referência
	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>		
<i>Fallaxin</i>	40 ^a	80 ^b	>160 ^c	>200 (8)	Rollins-Smith <i>et al.</i> (2005)
	32 ^a	64 ^b	32 ^d	>128 (9)	Este trabalho (2008)
	100 ^a	>100 ^b	>100 ^e	>50 (0)	Nielsen <i>et al.</i> (2007)
<i>Flx-16</i>	>128 ^a	>128 ^b	>128 ^d	>128 (0)	Este trabalho (2008)
	>100 ^a	>100 ^b	>100 ^e	>100 (0)	Nielsen <i>et al.</i> (2007)
<i>Pentadactylin</i>	25 ^a	100 ^b	200 ^c	>400 (29)	King <i>et al.</i> (2005)
	32 ^a	>128 ^b	>128 ^d	>128 (0)	Este trabalho (2008)
<i>SPX(1-22)</i>	3,6 ^a	n.d.	14,6 ^e	>29,5	Dourado <i>et al.</i> (2007)
<i>SPX(1-16)</i>	10,1 ^a	n.d.	40,5 ^e	n.d. ^f	Dourado <i>et al.</i> (2007)
<i>Laticeptin</i>	50 ^a	100 ^b	>200 ^c	>400	Conlon <i>et al.</i> (2006)

O valor entre parêntesis representa a porcentagem de hemólise na maior concentração testada.

^a ATCC 25922; ^b ATCC 27853; ^c NCTC 8325; ^d ATCC 25923; ^e ATCC292132.

^f Não determinado.

Apesar do fragmento Flx-16 não ter apresentado atividade biológica nos testes preliminares, ele foi utilizado para a determinação de MIC e HC₅₀ por apresentar-se em quantidade suficiente para a realização dos testes. Além disso, apesar de apenas três peptídeos terem apresentado atividade nos ensaios preliminares, não quer dizer que não existam outras moléculas bioativas na secreção estudada, pode ser que a concentração em que apareçam em uma corrida não seja suficiente para desencadear alguma atividade significativa.

Como alguns dos PAMs catiônicos com amplo espectro de ação também são citotóxicos para células de câncer (Tabela 7), os peptídeos *fallaxin* e *pentadactylin* foram testados quanto a sua ação anticarcinogênica. Os dois peptídeos antimicrobianos *fallaxin* e *pentadactylin* (dissolvidos em água), e o peptídeo PGL-L1 (dissolvido em DMSO 10%) foram incubados por 24 h com linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7) e de colo uterino (HeLa) para análise de viabilidade celular. O peptídeo *fallaxin* também foi testado contra uma linhagem murina de melanoma (B16F10). Para analisar o efeito na viabilidade celular de células normais humanas, esses peptídeos foram incubados com uma linhagem de células de fibroblasto normais (FHN) pelo mesmo período de tempo. O mesmo ensaio com a linhagem MCF-7 foi feito com *pentadactylin* sintético e os resultados corroboraram os resultados observados com o peptídeo nativo.

Tabela 7. Comparação das características químicas e biológicas de vários PAMs isolados da secreção cutânea de anfíbios e que também apresentam atividade antitumoral. Os parâmetros comparados são a massa molecular monoisotópica (Mm); anfifilicidade, como momento hidrofóbico médio ($\langle\mu H\rangle$); hidrofobicidade média ($\langle H\rangle$); carga em pH neutro; ponto isoelétrico (pI), porcentagem de resíduos hidrofóbicos (%H); atividade contra Gram-positivas (+) e Gram-negativas (-); predição da estrutura secundária.

Peptídeo	Seqüência	Mm (Da)	$\langle\mu H\rangle$	$\langle H\rangle$	Carga	pI	%H	Atividade	Estrutura	Espécie
Fallaxin	GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL-NH ₂	2547	0.07	-0.14	+3.1	10.5	68	+/-	α-hélice	<i>L. fallax</i> <i>L. pentadactylus</i> <i>L. labyrinthicus</i>
Pentadactylin	GLLDTLKGAAKNVVGLASKVMEKL-NH ₂	2541	0.09	-0.16	+3.0	10.5	64	+/-	α-hélice	<i>L. pentadactylus</i> <i>L. labyrinthicus</i>
Magainin 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-NH ₂	2465	0.36	-0.15	+4.1	11.0	65	+/-	α-hélice	<i>X. laevis</i>
Gaegurin 5	FLGALFKVASKVLPVKCAITKKC-OH	2550	0.27	-0.15	+4.9	10.4	71	+/-	α-hélice	<i>Rana rugosa</i>
Gaegurin 6	FLPLLAGLAANFLPTIICFISYKC-OH	2627	0.10	0.19	+0.9	8.3	87	+/-	α-hélice	<i>Rana rugosa</i>
Aurein 1.2	GLFDIIKKIAESF-NH ₂	1479	0.48	-0.06	+1.0	9.9	62	+/-	α-hélice	<i>Litoria raniformis</i>
Citropin 1.1	GLFDVIKKVASVIGGL-NH ₂	1614	0.37	0.05	+2.0	10.6	75	+	α-hélice	<i>Litoria citropia</i>
Maculatin 1.1	GLFGVLAKVAHVPAIAEHF-NH ₂	2145	0.25	0.16	+1.2	10.1	90	+/-	α-hélice	<i>Litoria genimaculata</i>

O peptídeo PGL-L1 não interferiu na viabilidade celular de nenhuma das linhagens testadas. O peptídeo *fallaxin* reduziu a viabilidade celular de todas as linhagens com as quais foi incubado, porém foi mais potente contra células normais do que contra células de câncer (Figura 22). Já o peptídeo *pentadactylin* apresentou atividade contra ambas as linhagens de câncer testadas, sendo menos eficaz na redução da viabilidade celular que o *fallaxin* (Figura 23). A concentração que reduz em 50% a viabilidade celular foi obtida pelo programa *GraphPad Prism 5*, estando os IC₅₀ de ambos os peptídeos apresentados na figura 24.

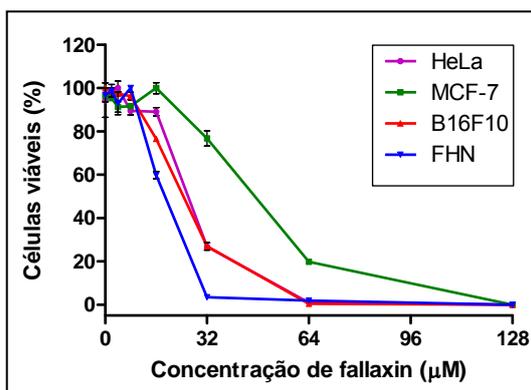


Figura 22. Porcentagem de células viáveis das linhagens celulares de câncer de colo uterino (HeLa), de mama (MCF-7), de pele (B16F10) e de fibroblasto normal (FHN) após a incubação por 24 h com diferentes concentrações de *fallaxin*. O peptídeo testado por meio do ensaio do MTT apresentou uma maior citotoxicidade contra a linhagem FHN. Os valores são expressos como média ± SD de um experimento feito em triplicata.

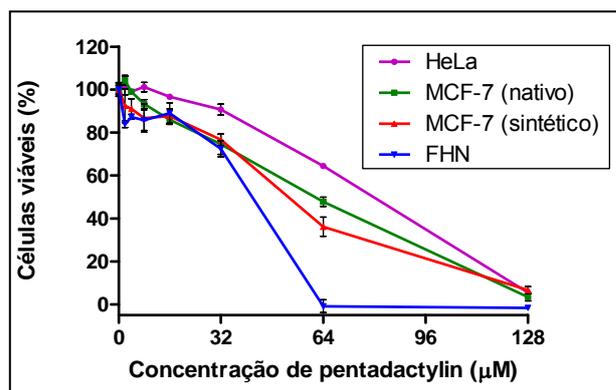


Figura 23. Porcentagem de células viáveis das linhagens celulares de câncer de colo uterino (HeLa), de mama (MCF-7) e de fibroblasto normal (FHN) após a incubação por 24 h com diferentes concentrações de *pentadactylin* nativo ou sintético. Os valores são expressos como média ± SD de um experimento feito em triplicata.

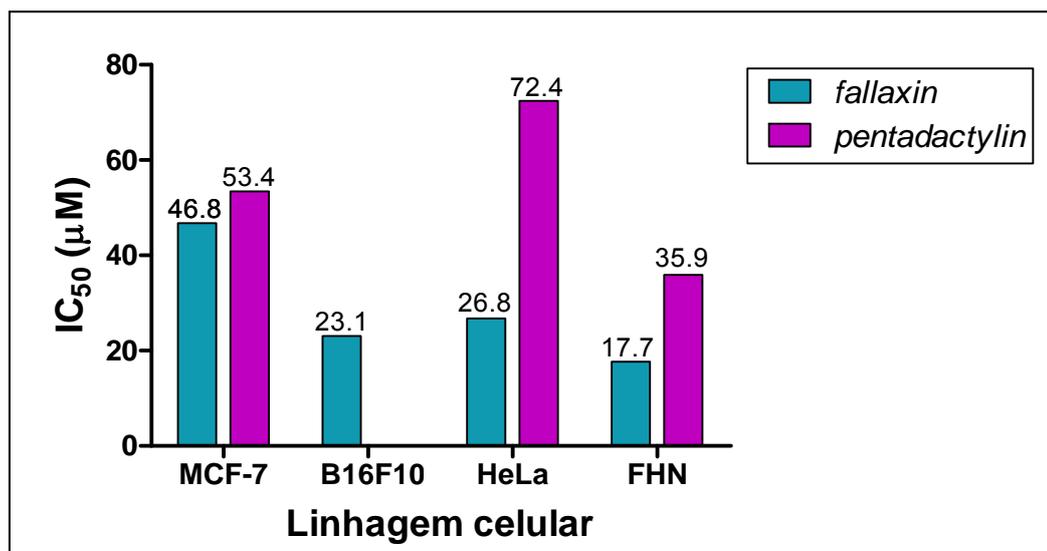


Figura 24. Concentração de *fallaxin* e *pentadactylin* que reduz em 50% a viabilidade celular das linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7), de pele (B16F10), de colo uterino (HeLa) e de fibroblastos normais (FHN) após 24 h de incubação a 37°C. A atividade do peptídeo *pentadactylin* não foi avaliada sobre a linhagem celular de câncer de pele B16F10.

5.6. Efeitos citostáticos e citotóxicos

Após o tratamento com os peptídeos, as linhagens celulares foram analisadas por microscopia de contraste de fase e foto-documentadas em duas condições de incubação: 1) na ausência do peptídeo (controle) e 2) em sua presença na concentração de 128 µM quanto a possíveis alterações morfológicas, utilizando-se um microscópio de contraste de fase invertido. As linhagens HeLa (Figura 25), MCF-7 (Figura 26) e FHN (Figura 28) foram tratadas com diferentes concentrações dos peptídeos *fallaxin* e *pentadactyllin*. Os controles de todas as linhagens usadas apresentaram morfologia bem definida, membrana citoplasmática íntegra, núcleo e nucléolos definidos. Observou-se, após a incubação de 24 h, que as células de todas as linhagens incubadas com 128 µM de peptídeo haviam perdido a integridade da membrana e deixaram de apresentar núcleo e nucléolos definidos. Resultado diferente foi observado depois do tratamento da linhagem B16F10 com *fallaxin* (Figura 27), onde se notou alteração da morfologia das células, as quais apresentaram o seu volume bastante reduzido, mas sem perderem aparentemente a integridade da membrana plasmática. Apesar de a foto-documentação ter ocorrido apenas na maior concentração, notou-se que algumas concentrações mais baixas, como a de 64 µM, também causaram efeitos semelhantes, todavia com uma intensidade menor. Nas linhagens de células de câncer tratadas com os PACs

fallaxin e *pentadactylin* também se verificou a presença de pequenas vesículas, as quais se encontravam suspensas no meio de cultura, nas maiores concentrações de peptídeo. As linhagens incubadas com o peptídeo PGL-LI não foram foto-documentadas, pois não ocorreu redução da viabilidade celular das linhagens celulares testadas no ensaio do MTT.

A análise das células da linhagem MCF-7 tratadas com 49 μM (IC_{50}) de *pentadactylin* sintético mostraram resultados interessantes. Primeiramente, a redução da viabilidade celular foi bem menor que 50%, o esperado já que a concentração utilizada foi a do IC_{50} . Não se observou por microscopia óptica de contraste de fase perda da integridade da membrana, contudo, notou-se a presença de pequenas vesículas livres no meio (Figura 29). Observou-se também um pequeno, mas significativo (teste t: $t = 5,478$, $df = 4$; $p = 0,0054$) aumento (5,21% *versus* 11,73%) do número de células pequenas e de baixa granulosidade após o tratamento com o peptídeo (Figura 30). As análises por teste t ($t = 3,170$, $df = 4$) também mostraram que o pequeno aumento (0,16% *versus* 0,51%) de granulosidade das células foi significativo ($p = 0,0339$). Os dados obtidos pelo método de exclusão de azul de tripan pela célula corroboraram os resultados acima de que a membrana das células tratadas permaneceu íntegra (Figura 31A). A determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria por citometria de fluxo demonstrou que a alteração do potencial não foi significativa após o tratamento (Figura 31B).

Todavia, as análises por citometria de fluxo para determinação da fragmentação de DNA e das proporções das células nas diferentes fases do ciclo celular apresentaram alterações significativas. A porcentagem média de DNA fragmentado aumentou, em aproximadamente, 4,5 vezes nas células tratadas em relação ao controle (33,46% *versus* 7,38%), este aumento foi significativo de acordo com o teste t utilizado para as análises estatísticas ($t = 18,25$, $df = 4$, $p < 0,0001$) (Figura 31C). Já a análise do ciclo celular demonstrou que as células não estão conseguindo se dividir para voltar para a fase G1 como evidenciado pela redução da porcentagem de células em G1 em cerca de 2,8 vezes (60,9% *versus* 21,5%; teste t: $t = 9,186$, $df = 3$, $p = 0,0027$) e o aumento de 2,09 vezes (36,6% *versus* 17,5%; teste t: $t = 14,98$, $df = 3$, $p = 0,0006$) da quantidade de células em G2/M (Figura 31D).

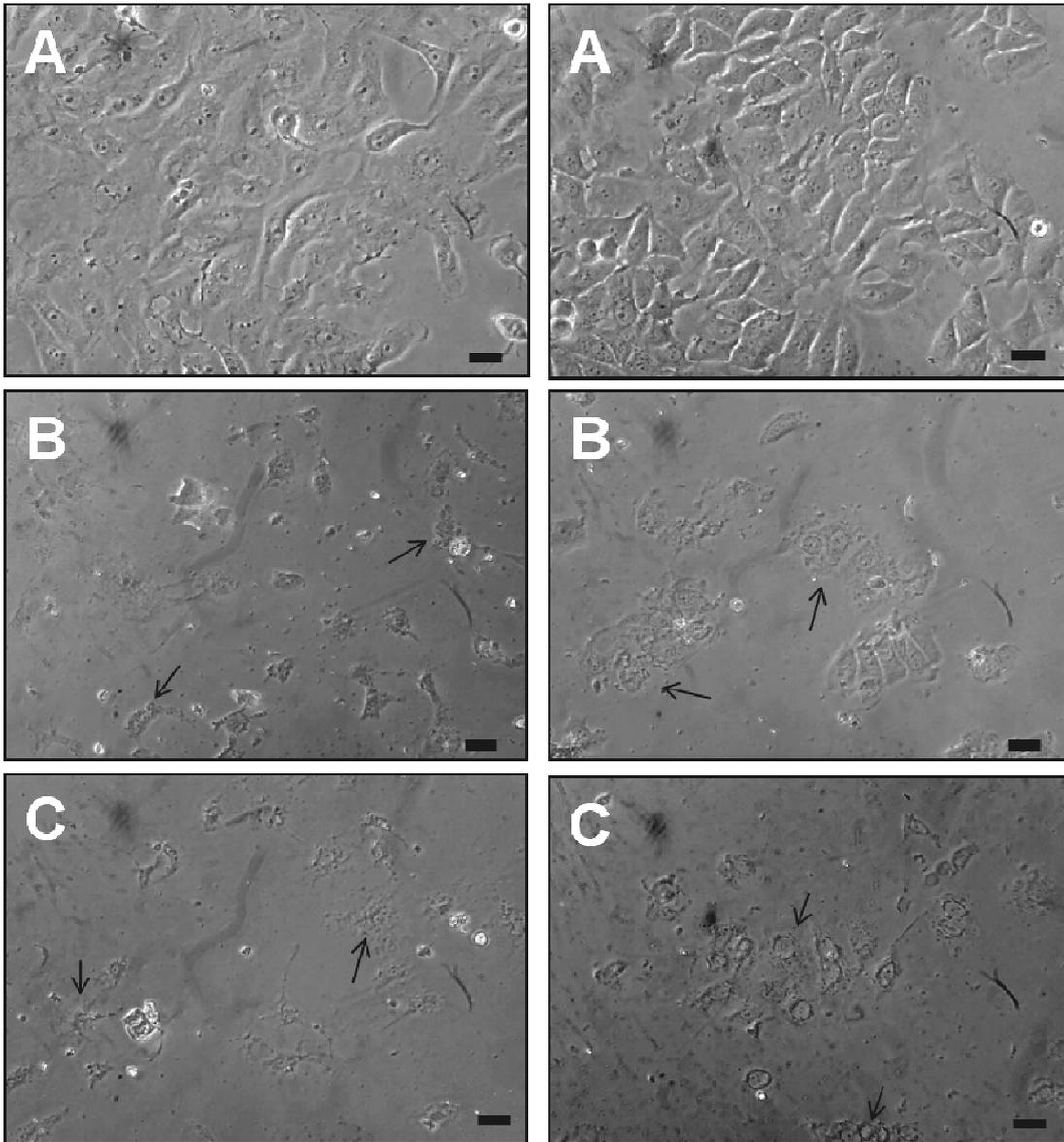


Figura 25. Microscopia de contraste de fase de células de câncer de colo do útero (HeLa) após 24 horas de incubação na ausência de peptídeo (A); com 128 μ M dos peptídeos *pentadactylin* (B) e *fallaxin* (C). Barra = 30 μ m. As setas indicam a presença de *debris* celulares, sugerindo a perda da integridade da membrana plasmática.

Figura 26. Microscopia de contraste de fase de células de câncer de mama (MCF-7) após 24 horas de incubação na ausência de peptídeo (A); com 128 μ M dos peptídeos *pentadactylin* (B) e *fallaxin* (C). Barra = 30 μ m. As setas indicam a presença de *debris* celulares, sugerindo a perda da integridade da membrana plasmática.

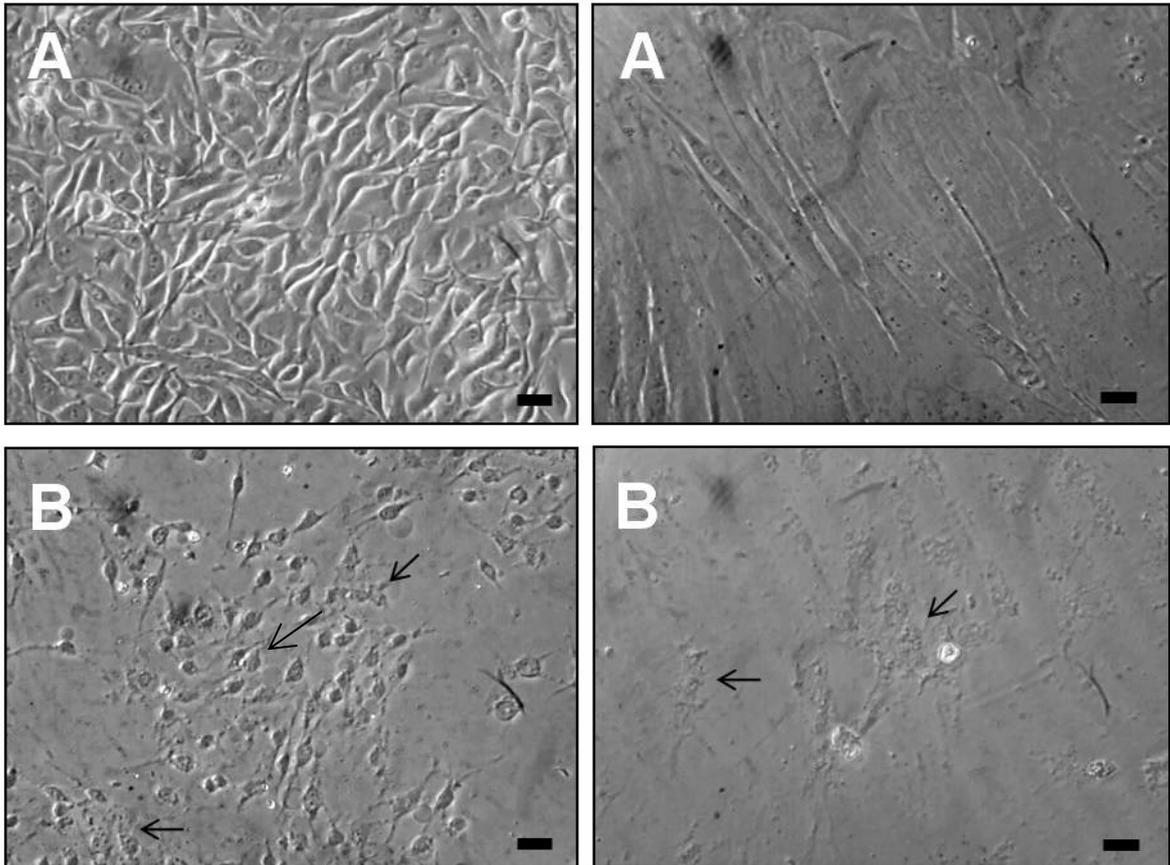


Figura 27. Microscopia de contraste de fase de células de câncer de pele murino (B16F10) após 24 horas de incubação na ausência de peptídeo (A); com 128 μM do peptídeo *fallaxin* (B). Barra = 30 μm . As setas indicam células que tiveram o seu tamanho reduzido e a sua forma alterada.

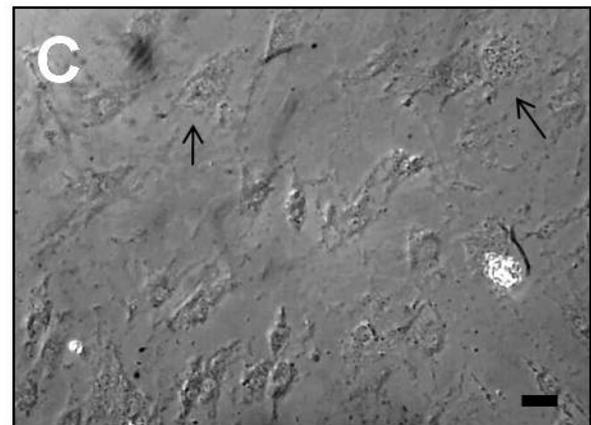


Figura 28. Microscopia de contraste de fase de células de fibroblasto (FHN) após 24 horas de incubação na ausência de peptídeo (A); com 128 μM dos peptídeos *pentadactylin* (B) e *fallaxin* (C). Barra = 30 μm . As setas indicam a presença de *debris* celulares, sugerindo a perda da integridade da membrana plasmática.

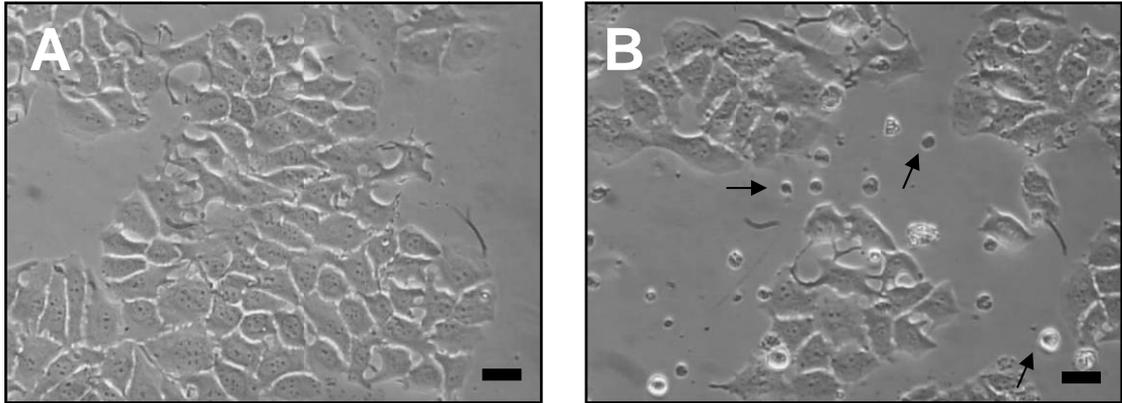


Figura 29. Microscopia de contraste de fase de células de câncer de mama (MCF-7) após 24 horas de tratamento na ausência do peptídeo (A) e na presença de *pentadactylin* sintético na concentração de 49 μM (B). Barra = 30 μm . As setas indicam a presença de pequenas vesículas.

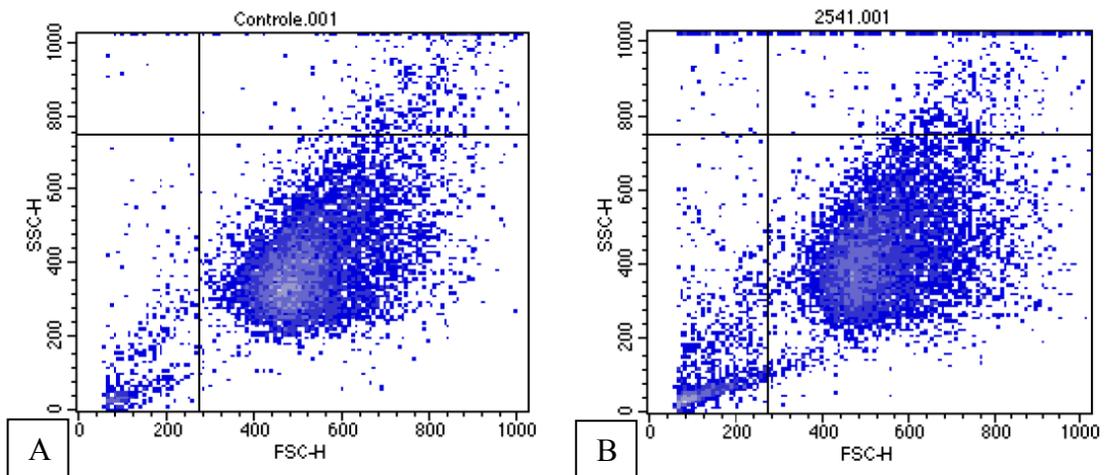


Figura 30. Análise por citometria de fluxo de células da linhagem de câncer de mama MCF-7 tratadas por 24 h com 0 μM (A) e 49 μM (B) de *pentadactylin* sintético. FSC-H: tamanho da célula; SSC-H: granulosidade.

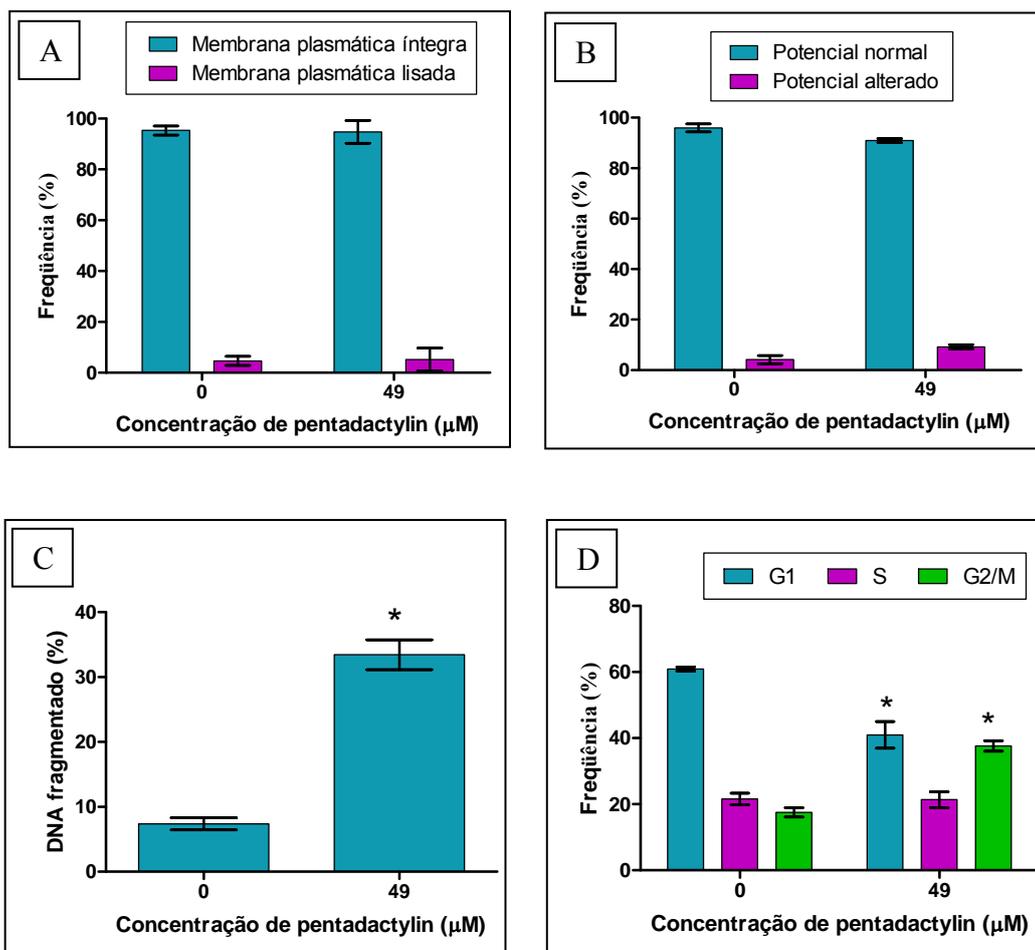


Figura 31. Resultados sobre o mecanismo de ação anticarcinogênico do peptídeo *pentadactylin* sobre células da linhagem celular de câncer de mama MCF-7. As células foram incubadas por 24 h com o peptídeo na concentração de 49 μM. **(A)** Frequência de células com membrana plasmática íntegra ou lisada observadas por microscopia de luz pela exclusão do azul de tripan. **(B)** Análise do potencial transmembrânico da mitocôndria; alterado: exclusão de rodamina 123 e emissão menor de fluorescência. **(C)** Porcentagem de DNA fragmentado após o tratamento com o peptídeo. **(D)** Proporção de células nas diferentes fases do ciclo celular determinada pela excitação do iodeto de propídeo. Os resultados estão apresentados como a média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo teste t. *: $p < 0,05$.

5.7. Perfil protéico em SDS-PAGE

A complexidade protéica do veneno de *L. labyrinthicus* foi avaliada por um gel SDS-PAGE 12%, corrido *overnight* a 3 mA (Figura 32). Após a coloração com nitrato de prata, foi possível observar a presença de proteínas de elevada massa molecular na secreção estudada.

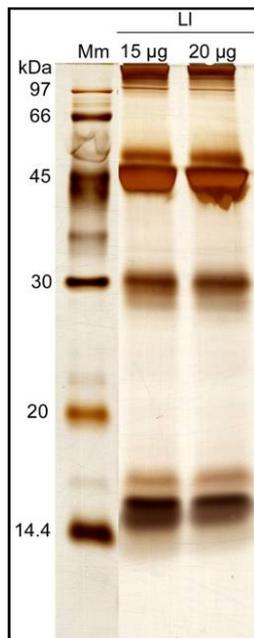


Figura 32. Perfil protéico da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* em SDS-PAGE 12%. Eletroforese realizada a 3 mA e corada com nitrato de prata. Mm: marcador de massa molecular; Li: secreção cutânea de *L. labyrinthicus* (15 e 20 µg).

5.8. Atividade proteolítica

A análise da composição peptídica/protéica da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* por espectrometria de massa indica a presença de possíveis fragmentos dos peptídeos antimicrobianos *fallaxin* e *pentadactylin* (Tabela 8). Todavia, apenas os fragmentos Flx-16 (1.563 Da) e Flx-22 (2.193 Da) do peptídeo *fallaxin* foram confirmados, tendo as suas seqüências obtidas por degradação de Edman. A presença desses fragmentos sugere a ação de enzimas proteolíticas, importantes, por exemplo, na inativação dos peptídeos citotóxicos potencialmente prejudiciais para o animal após algum tempo em contato com a pele. Exemplos de possíveis sítios de clivagem nos PAMs por peptidases presentes na secreção cutânea de leptodactilídeos podem ser vistos na Figura 33.

Tabela 8. Possíveis fragmentos dos peptídeos *fallaxin* e *pentadactylin* detectados por MALDI-TOF MS.

Peptídeos	Massa molecular (Da)	
	Teórica	Experimental
<i>Fallaxin</i>		
GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL-NH ₂	2.547,46	2.546,65
GVVDILKGAAKDIAGHLASKVM ^a	2.192,24	2.192,40
GVVDILKGAAKDIAGHLASK	1.962,13	1.962,36
GVVDILKGAAKDIAGHLAS	1.834,04	1.834,12
GVVDILKGAAKDIAGHLA	1.747,00	1.747,09
GVVDILKGAAKDIAGH ^a	1.562,88	1.562,97
GVVDILKGAAKDIA	1.368,80	1.367,50
<i>Pentadactylin</i>		
GLLDTLKGAAKNVVGSLSKVMNKL-NH ₂	2.541,46	2.540,29
GLLDTLKGAAKNVVGSLS	1.813,03	1.813,12
GLLDTLKGAAKNVVGSLSA	1.726,00	1.725,72
GLLDTLKGAAKNVVGS	1.654,96	1.653,96
GLLDTLKGAAKNV	1.298,76	1.298,70
GLLDTLKGAAKN	1.199,69	1.199,78

^a Fragmento seqüenciado.



Figura 33. Localização dos prováveis pontos de clivagem (barras vermelhas) observados nos peptídeos *fallaxin*, *pentadactylin*, *syphaxin* e *ocellatins 1 a 5*. Em preto, destacam-se os resíduos hidrofóbicos; em vermelho, os negativamente carregados; em azul, os positivamente carregados e, em verde, polares não-carregados.

A partir desses achados, buscou-se a identificação de peptidases na secreção cutânea do animal estudado por meio dos ensaios caseinolíticos, gelatinolíticos e com o emprego de substratos fluorogênicos. O ensaio espectrofotométrico com caseína como substrato protéico

inespecífico revelou a presença de enzimas proteolíticas (serino- e/ou metalo-peptidases) na secreção testada. Observou-se um discreto aumento da atividade à temperatura ambiente (25°C), porém valores semelhantes foram obtidos a 37°C e 50°C (Figura 34A). A análise estatística por ANOVA de uma via seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni indicou que as diferentes temperaturas testadas não afetaram significativamente a atividade mensurada ($F_{2,3} = 6,975$, $p = 0,0745$). Os testes realizados para a determinação do pH ótimo de atividade caseinolítica não puderam determinar o melhor pH para atividade proteolítica da secreção, visto que a atividade foi bastante similar entre o pH 4,0 e pH 10,0 (Figura 34B), não diferindo significativamente entre si (ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni: $F_{6,7} = 1,836$, $p = 0,2225$).

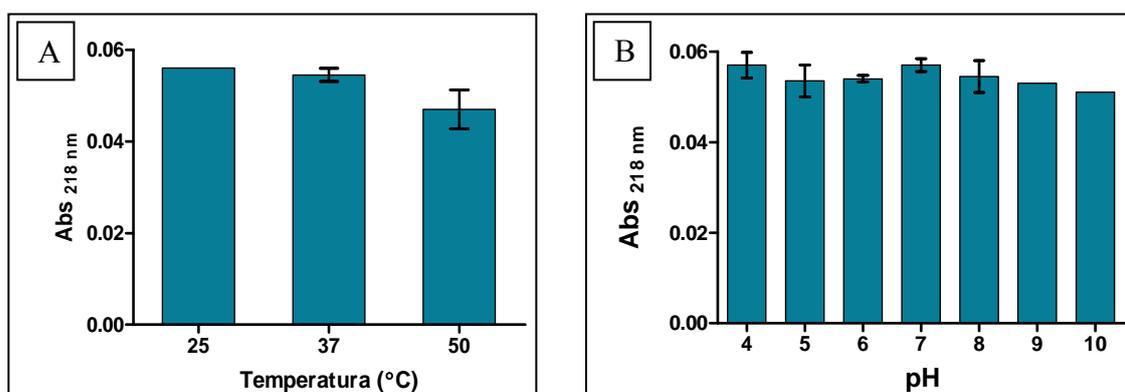


Figura 34. Análise das condições ótimas da atividade caseinolítica utilizando-se 40 µg de secreção cutânea de *L. labyrinthicus*. Os dados são apresentados como o aumento da absorvância a 218 nm da duplicata da reação com amostra em relação à média da duplicata do seu controle. (A) Avaliação da influência da temperatura (25, 37 e 40°C). (B) Influência do pH na atividade proteolítica. Os valores são expressos como média ± SD em relação aos controles de um experimento feito em duplicata.

A atividade gelatinolítica foi visualizada por meio de zimografia. A aplicação de 40 µg de secreção de *L. labyrinthicus* liofilizada e 10 µL (15,2 µg de proteínas) de secreção fresca em gel SDS-PAGE 9% co-polimerizado com 0,1% (p/v) de gelatina, incubado em pH 8,0, revelou leve perda de atividade gelatinolítica durante o processo de congelamento e liofilização da amostra (Figura 35), todavia a quantidade de amostra liofilizada utilizada foi suficiente para detectar atividade. Duas bandas de atividade proteolítica com cerca de 65 kDa e 70 kDa foram visualizadas, sendo a atividade da primeira mais intensa.

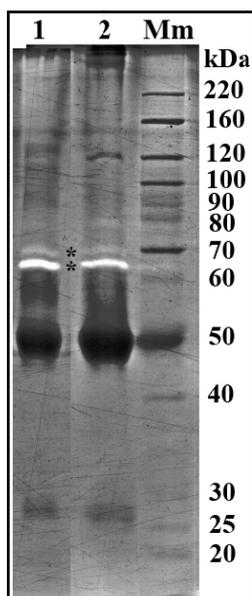


Figura 35. Atividade gelatinolítica da secreção de *L. labyrinthicus* em SDS-PAGE 9%-gelatina 0,1%: (1) 10 µL (15,2 µg de proteínas) de secreção fresca; (2) 40 µg de secreção bruta liofilizada. Mm: marcador de massa molecular; *: bandas de atividade proteolítica.

As melhores condições para a atividade gelatinolítica foram avaliadas por meio da incubação do gel realizado nas mesmas condições do descrito acima em diferentes tampões por 22 horas. A atividade proteolítica observada no gel incubado com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, CHAPS 0,02% (p/v), CaCl₂ 10 mM e NaCl 150 mM foi a mais intensa. Nenhuma atividade foi detectada nos géis incubados com os tampões Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo EDTA 10 mM ou SO₄Zn 1 mM; e o tampão sem CaCl₂ (Figura 36A). As enzimas proteolíticas identificadas no ensaio exerceram sua atividade apenas em pH neutro e básico, não tendo sido identificada nenhuma atividade nos pHs 4,0; 5,0 e 6,0 (Figura 36B).

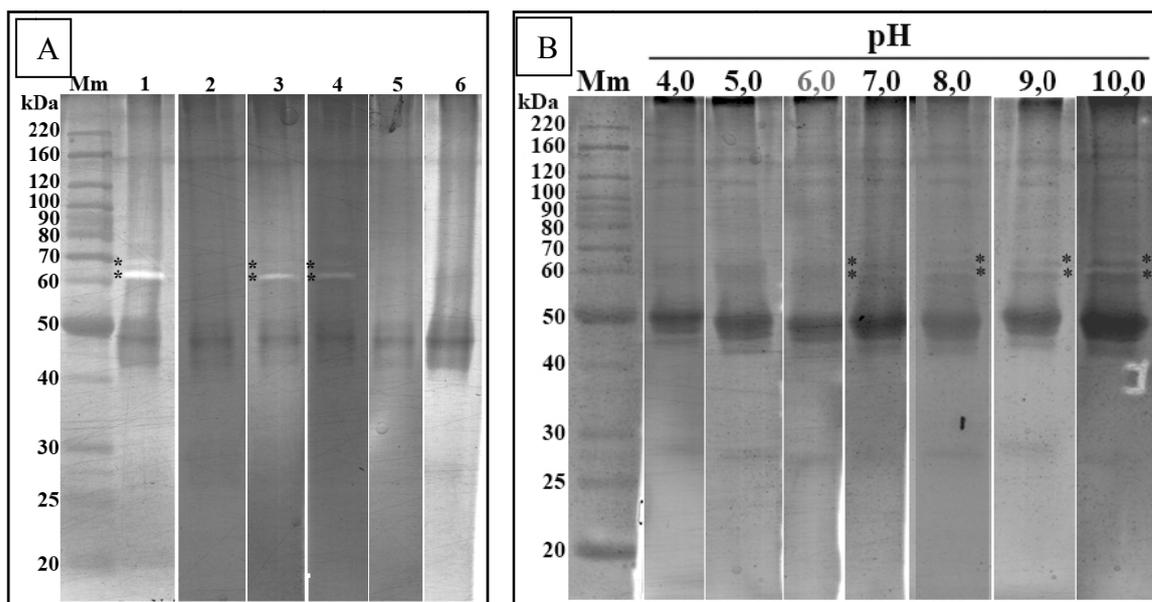


Figura 36. Atividade gelatinolítica da secreção de *L. labyrinthicus* (40 μ g) em SDS-PAGE 9%-gelatina 0,1%. **(A)** Incubada por 22 h com os tampões com pH 8,0: 1) Tris-HCl 50 mM, CHAPS 0,02% (p/v), CaCl₂ 10 mM e NaCl 150 mM; 2) Tris-HCl 50 mM; 3) Tris-HCl 50 mM e CaCl₂ 1 mM; 4) Tris-HCl 50 mM e CaCl₂ 10 mM; 5) Tris-HCl 50 mM e SO₄Zn 1 mM; 6) mesmo tampão usado no poço 1 com adição de EDTA 10 mM. **(B)** Incubada por 22 h em tampões com diferentes pHs contendo CaCl₂ 10 mM. Mm: marcador de massa molecular; *: bandas de atividade proteolítica.

Dos doze peptídeos fluorogênicos testados, apenas três foram clivados por 15,2 μ g de secreção cutânea de *L. labyrinthicus*. As enzimas proteolíticas presentes nessa secreção hidrolizaram os seguintes substratos: Gly-Pro-AMC, L-Leu-AMC e L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC, indicando ação de aminopeptidases (Figura 37). Verificou-se que a concentração protéica da secreção é diretamente proporcional à atividade proteolítica, sendo esta relação mais pronunciada para a hidrólise do peptídeo Gly-Pro-AMC (Figura 38). A análise do perfil de pH sugere a presença de mais de uma peptidase clivando os substratos. Todavia, o pH ótimo ficou em torno de 7,5 para a clivagem dos três peptídeos: Gly-Pro-AMC = pH 8,0; L-Leu-AMC = pH 7,0; L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC = pH 7,5 (Figura 39). Não foi detectada atividade enzimática em pH ácido.

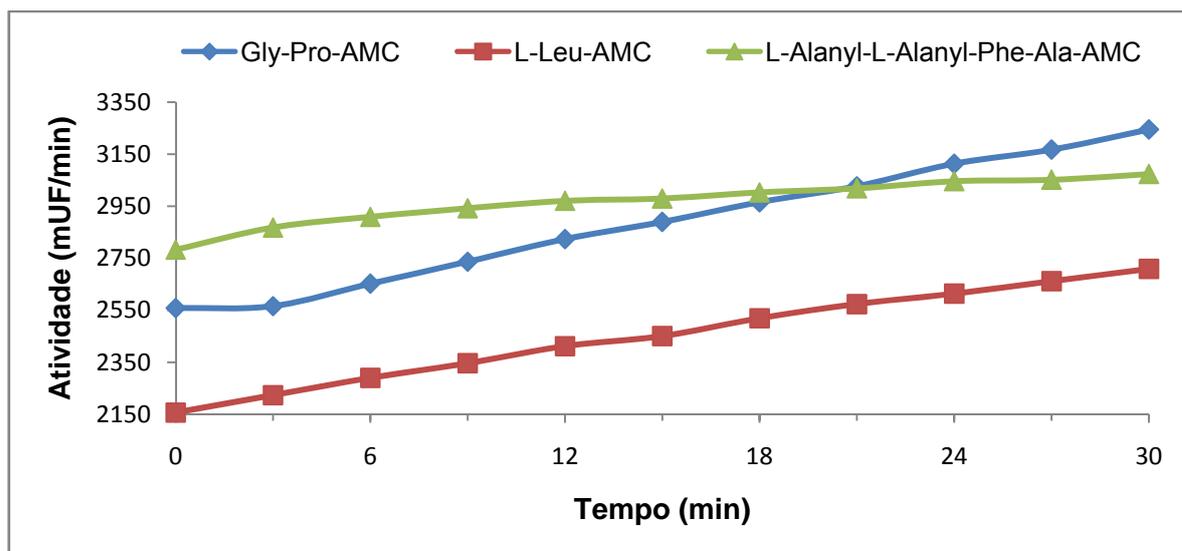


Figura 37. Monitoramento da atividade proteolítica da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* (15,6 µg de proteína) sobre os substratos Gly-Pro-AMC, L-Leu-AMC e L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC ao longo de 30 min. mUF/min = mili-unidades de fluorescência por minuto.

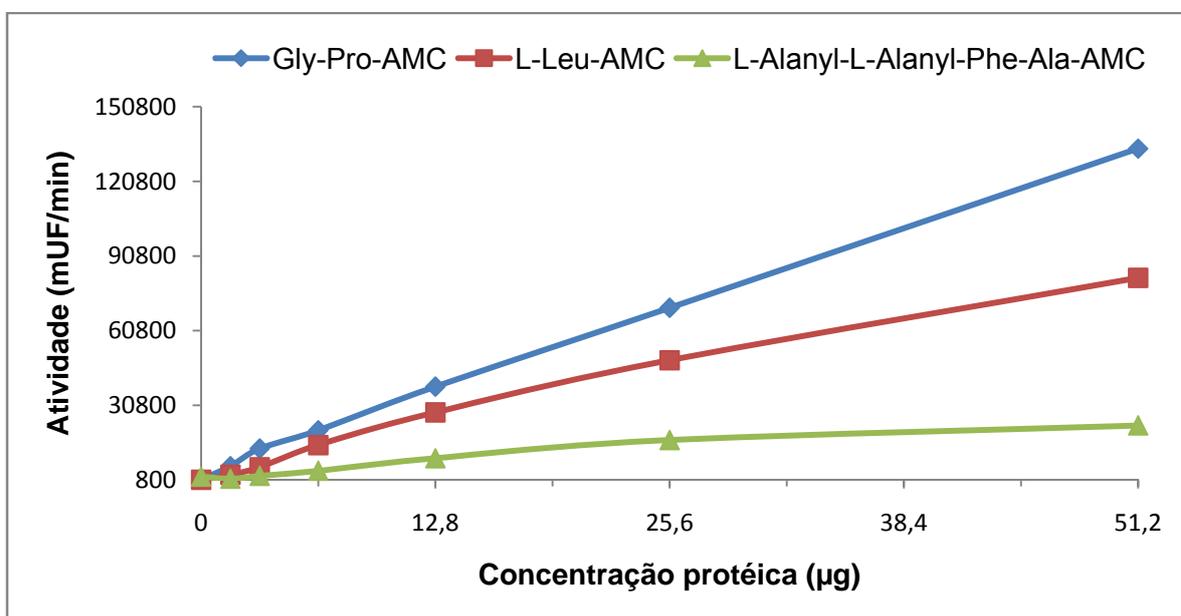


Figura 38. Influência da concentração protéica da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* na atividade proteolítica (mUF/min) sobre três peptídeos fluorogênicos: Gly-Pro-AMC, L-Leu-AMC e L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC. O ensaio foi realizado em tampão HEPES 25 mM, pH 7,5. mUF/min = mili-unidades de fluorescência por minuto.

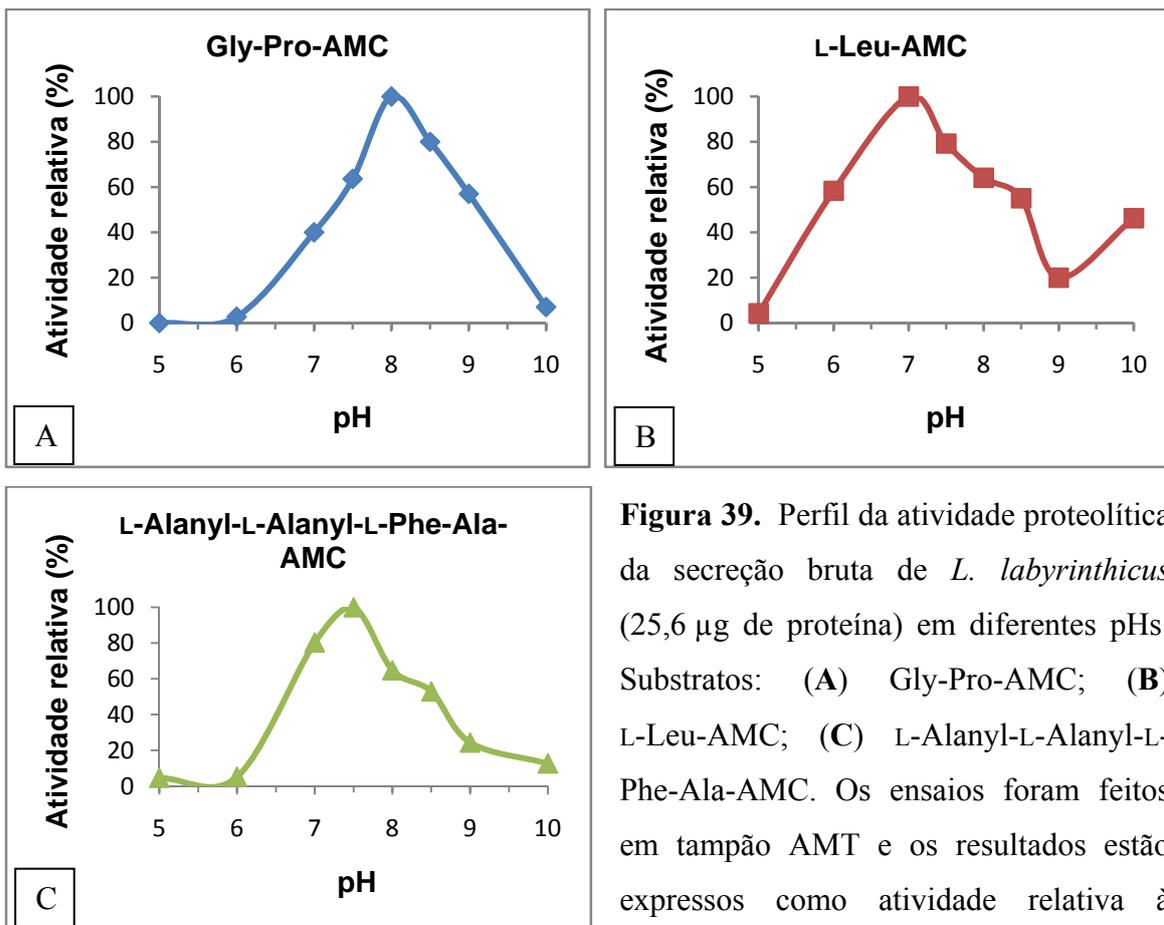


Figura 39. Perfil da atividade proteolítica da secreção bruta de *L. labyrinthicus* (25,6 µg de proteína) em diferentes pHs. Substratos: (A) Gly-Pro-AMC; (B) L-Leu-AMC; (C) L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC. Os ensaios foram feitos em tampão AMT e os resultados estão expressos como atividade relativa à atividade máxima obtida.

Por meio da incubação de 15,2 µg de secreção fresca corrida em gel SDS-PAGE 10% com os três substratos fluorogênicos testados anteriormente, observou-se atividade proteolítica localizada em uma banda de cerca de 50 kDa (Figura 40). Atividade peptidásica em duas bandas com mais de 220 kDa que não entraram no gel também foi observada.

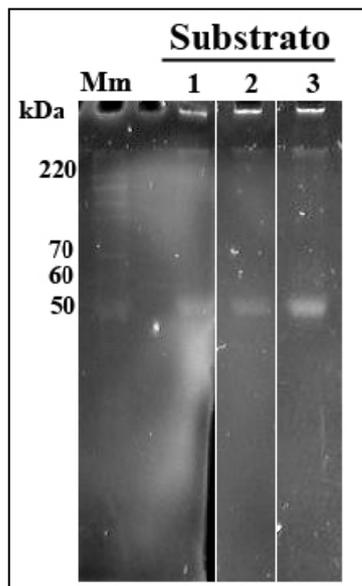


Figura 40. Atividade proteolítica de 15,2 µg de secreção cutânea fresca de *L. labyrinthicus* em SDS-PAGE 10% incubados com três substratos fluorogênicos e foto-documentados sob UV. (1) Gly-Pro-AMC; (2) L-Leu-AMC; (3) L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC. Mm: marcador de massa molecular.

O ensaio fluorogênico na presença de inibidores identificou a presença de enzimas pertencentes aos grupos das metalo-peptidases e serino-peptidases. Os resultados sugerem que o substrato Gly-Pro-AMC é clivado por metalo- e serino-peptidases, sendo que a maior porcentagem de inibição ocorreu pelos inibidores fenantrolina e bestatina, inibidores de metalo-peptidases. O substrato L-Leu-AMC aparentemente não é clivado por aspártico- ou cisteíno-peptidases e a sua hidrólise foi inibida fortemente por fenantrolina e TLCK, inibidores de metalo- e serino-peptidases respectivamente. Já a clivagem do peptídeo L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC pela secreção foi reduzida principalmente pelos inibidores fenantrolina e PMSF, sendo o último inibidor de serino-peptidase. Apenas o solvente isopropanol, diluente do inibidor PMSF, reduziu a velocidade máxima da atividade proteolítica do veneno, mas isso só foi verificado para a clivagem do substrato Gly-Pro-AMC em cerca de 17%. Contudo, a despeito dessa inibição inicial, o PMSF ainda inibiu em 33% a atividade da enzima sobre esse substrato (Tabela 9).

Tabela 9. Efeitos de diferentes inibidores sobre a atividade proteolítica da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* (25,6 µg de proteínas) na hidrólise dos substratos fluorogênicos Gly-Pro-AMC, L-Leu-AMC e L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC. A incubação da secreção bruta com os inibidores foi realizada em tampão HEPES 50 mM pH 7,5 por 45 min.

Inibidor	Concentração (mM)	Atividade relativa (%)		
		Gly-Pro-AMC	L-Leu-AMC	L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC
Fenantrolina ^a	10	0,0	0,0	51,8
EDTA ^a	10	80,8	100,0	100,0
Bestatina ^a	10	73,0	89,5	88,8
TPCK ^b	0,1	81,5	94,6	81,4
TLCK ^b	0,1	89,4	55,8	65,4
PMSF ^b	1	66,8	85,4	11,4
Leupeptina ^b	0,1	87,1	98,3	98,1
E-64 ^c	0,01	100,0	100,0	100,0
Pepstatina A ^d	0,001	74,2	100,0	80,4
Controle	—	100,0	100,0	100,0

^a Inibidor de metalo-peptidase.

^b Inibidor de serino/cisteíno-peptidase.

^c Inibidor de cisteíno-peptidase.

^d Inibidor de aspártico-peptidase.

5.9. Atividade de PLA₂

As PLA₂ são moléculas encontradas frequentemente nos venenos de vários animais. Sabe-se que essas enzimas estão envolvidas em processos inflamatórios, doenças e estão distribuídas em vários tecidos diferentes, o que sugere um papel fundamental em vários processos fisiológicos. A análise da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* detectou a atividade de PLA₂ (Figura 41A). A atividade detectada foi menos potente que a observada na peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel), todavia a análise estatística por ANOVA de duas vias demonstrou que os resultados são significativos (p<0,01).

A ANOVA de duas vias (modelo 3 × 11) (Amostra × Tempo) demonstrou que existe um efeito estatisticamente significativo do fator amostra (F_{2, 66} = 8484, p<0,0001) sobre a absorvância. O fator tempo exerceu também um efeito significativo sobre a absorvância

($F_{10,66} = 72,99$, $p < 0,0001$). Houve também um efeito estatisticamente significativo da interação Amostra \times Tempo ($F_{20,66} = 2,949$, $p = 0,0005$).

O procedimento de comparações múltiplas demonstrou que a secreção cutânea de *L. labyrinthicus* e a peçonha de *C. durissus terrificus* (controle positivo) possuem atividade fosfolipásica, já que as duas curvas de absorvância são diferentes da salina. O controle positivo foi diferente da salina desde a primeira leitura, já a secreção de *L. labyrinthicus* diferiu da salina apenas a partir do segundo minuto. A Figura 41B mostra a redução do pH da reação detectada pelo indicador azul de bromofenol após 12 h de incubação à temperatura ambiente, o qual fica amarelo à medida que o pH vai sendo reduzido devido à clivagem da fosfatidilcolina. Nota-se uma leve redução de pH da reação com salina devido à hidrólise espontânea da fosfatidilcolina em meio aquoso.

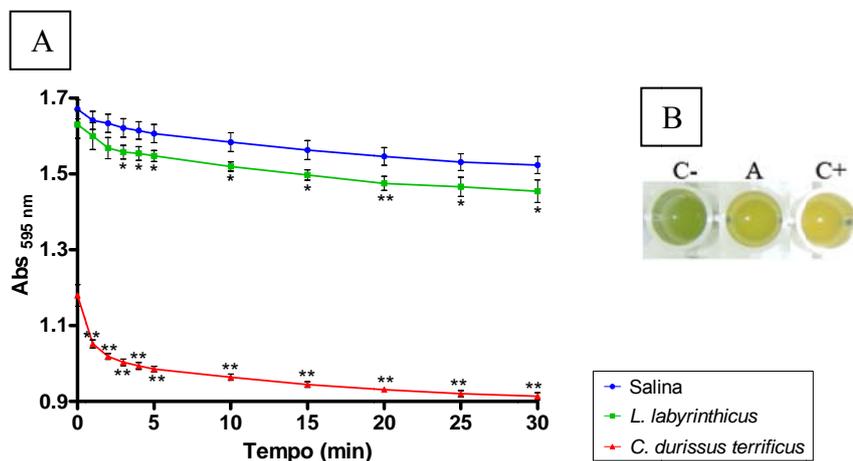


Figura 41. Atividade de PLA₂ da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* (40 μ g). (A) Leitura da absorvância por 30 min, partindo-se do princípio de que a clivagem da fosfatidilcolina reduz o pH do meio, diminuindo a absorvância. A salina (HEPES 2 mM) foi utilizada como controle negativo e a peçonha de *C. durissus terrificus* (40 μ g) como controle positivo. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$. Os valores são expressos como média \pm SD de um experimento feito em triplicata. (B) Foto do ensaio após 12 h, onde C-: HEPES 2 mM; A: secreção cutânea de *L. labyrinthicus* (40 μ g); C+: peçonha de *C. durissus terrificus* (40 μ g).

6. Discussão

6.1. Atividade antimicrobiana e hemolítica

A análise da secreção cutânea da rã-pimenta *L. labyrinthicus* por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF revelou a imensa riqueza química dessa secreção (Figura 15 e Anexo 2). Contudo, essa enorme riqueza se apresenta subestimada por questões metodológicas. De acordo com Zheng e colaboradores (2005), o perfil peptídico da secreção cutânea de anfíbios possui o potencial de ser utilizado para a elucidação de questões de taxonomia biológica, já que o perfil peptídico da secreção de espécimes da mesma espécie é significativamente similar e, entre espécies do mesmo gênero, existe alguma similaridade. Outra importante aplicação do perfil peptídico é na identificação de peptídeos funcionais comuns entre diferentes espécies. Entretanto, essa metodologia é limitada para peptídeos sem pontes dissulfeto com massa molecular entre 300 a 4.000 Da (Favreau *et al.*, 2006).

O presente estudo permitiu a caracterização de um peptídeo inédito de 1.761 Da (PGL-L1) (Figuras 16E e 17E) que não apresenta similaridade a nenhum outro disponível no banco de dados *UniProt Knowledgebase*. Tal peptídeo é rico em glicina e leucina, devendo ser inserido assim no grupo dos peptídeos ricos em determinados aminoácidos. Apesar dos estudos preliminares de atividade terem indicado possível atividade antimicrobiana e hemolítica (Figura 14), ensaios realizados com o peptídeo puro revelaram que este não apresenta atividade contra as bactérias testadas e nem contra eritrócitos humanos (Tabela 5). Provavelmente, a atividade detectada no ensaio preliminar foi causada pelo peptídeo *pentadactylin* que elui praticamente junto com esse peptídeo. Todavia, existe a probabilidade desse peptídeo atuar em sinergismo com o PAM *pentadactylin*. Estudos demonstraram que peptídeos neutros, como *plasticins*, podem atuar como perturbadores primários da membrana, adotando uma orientação transmembrânica, atuando em sinergismo com peptídeos catiônicos. A falta de carga não previne a adsorção de interações hidrofóbicas, mas podem evitar maiores rearranjos do peptídeo responsáveis pela atividade biológica (Amri *et al.*, 2006).

A ausência de atividade antimicrobiana e hemolítica condiz com as características químicas do peptídeo, o qual é extremamente hidrofóbico (todos os resíduos), não é propenso a formar α -hélice e, portanto, não é anfipático, além de não ser catiônico (carga igual a zero em pH 7,0); características inerentes à maioria dos PAMs conhecidos. Devido a sua presença em grande quantidade na secreção cutânea de *L. labyrinthicus*, o peptídeo PGL-L1 deve possuir alguma função biológica desconhecida que não seja a antimicrobiana, antitumoral ou

hemolítica. Outros testes de atividade biológica devem ser realizados para a determinação da função desse curioso peptídeo, lembrando-se de realizar esses ensaios dissolvendo a macromolécula testada em solvente apolar.

Os PAMs *fallaxin* e *pentadactylin* também foram isolados da secreção estudada. O PAM *fallaxin* foi originalmente purificado da secreção cutânea de *L. fallax* (Rollins-Smith *et al.*, 2005) e posteriormente de *L. pentadactylus* (King *et al.*, 2005), espécie da qual também foi isolado o peptídeo *pentadactylin*. A presença de *fallaxin* e *pentadactylin* na secreção cutânea das espécies *L. fallax*, *L. labyrinthicus* e *L. pentadactylus* corrobora os resultados obtidos por Hedges & Heinicke (2007), no qual as três espécies foram colocadas juntas no grupo dos *pentadactylus* por meio da análise de seqüências de DNA mitocondrial, sendo as espécies *L. labyrinthicus* e *L. pentadactylus* mais aparentadas entre si. Análises de seqüências de DNA também mostraram que os leptodactilídeos podem ser um grupo parafilético. A impossibilidade da obtenção de um cladograma bem definido a partir das seqüências dos peptídeos de leptodactilídeos não anula a importância dessas moléculas em estudos filogenéticos. Apenas sugere a necessidade de um maior número de caracteres para a análise, evidenciando a importância do estudo dos PAMs, ou que os dados não são espécie-específicos. Atualmente, está cada vez mais em uso a utilização de diferentes tipos de caracteres em estudos evolutivos, resultando em dados mais precisos e confiáveis, assim, será possível desenvolver estudos evolutivos de leptodactilídeos por meio da análise combinatória com os vários dados disponíveis como seqüências de DNA, de peptídeos e caracteres morfológicos (Conlon *et al.*, 2007b).

As estruturas primárias desses peptídeos possuem grande similaridade a de outros peptídeos antimicrobianos isolados do gênero *Leptodactylus* (Figura 19). A seqüência N-terminal desses peptídeos é extremamente conservada, com a conservação dos resíduos G1, D4 e K11; substituições conservativas nas posições 2, 3, 12 e 13; e trocas semi-conservativas nos resíduos de 6 a 10 e 15. Essas observações sugerem a enorme importância desempenhada por esses PAMs ao longo da história evolutiva desses animais, indicando a possibilidade de apresentarem concomitantemente outras funções, como por exemplo, a anticarcinogênica avaliada no presente trabalho (Vanhoye *et al.*, 2003). O alinhamento múltiplo realizado com o emprego do *ClustalW* revelou uma identidade de 92% entre *fallaxin* e o peptídeo *laticeptin*; e de 68% entre *pentadactylin* e *fallaxin*. Entretanto, de acordo com as distâncias dos ramos da árvore *neighbor-joining* o peptídeo *pentadactylin* é mais similar aos *ocellatins*, principalmente ao *ocellatin 2*, do que ao PAM *fallaxin*. Essa divergência pode ser devido ao

próprio método, visto que a análise por *neighbor-joining* pelo PAUP usa um algoritmo que envolve fatores diferentes dos que os utilizados para o cálculo de graus de similaridade pelo *ChustalW*.

Dessa maneira, nota-se significativa atuação da pressão evolutiva na conservação da seqüência dos aminoácidos dos peptídeos antimicrobianos. Essa observação é consistente com a hipótese de que muitos PAMs são relacionados evolutivamente, tendo surgido de múltiplas duplicações de um gene ancestral que existia antes da radiação das várias famílias de anfíbios. A diversificação dos PAMs poderia então ser parte de uma estratégia evolutiva direcionada pela rápida evolução dos patógenos (Duda Jr. *et al.*, 2002). A distribuição de aminoácidos nesses tipos de peptídeos não é aleatória, pois sempre contêm uma alta proporção de resíduos que promovem a conformação em α -hélice (Ala, Leu, Lys, Met, His), enquanto resíduos que desestabilizam essa conformação são sub-representados. A importância dos resíduos de aminoácidos terminais da parte mais variável da estrutura primária do peptídeo foi ressaltada pela síntese de análogos do PAM *citropin 1.1* em um estudo anterior (Doyle *et al.*, 2003). Assim, a presença de PAMs tão semelhantes como *fallaxin* e *pentadactylin* presentes na secreção cutânea da rã *L. labyrinthicus* pode ser porque cada um embora possua um alvo e uma potência específica, atuando em conjunto, minimizam as chances dos patógenos apresentarem resistência contra ambos. Além do mais, estudos demonstram que a mistura de PAMs de uma secreção podem ter uma eficiência de 10 a 100 vezes maior que a dos peptídeos isolados (Vanhoye *et al.*, 2003).

A tabela 4 evidencia a semelhança das características químicas e biológicas entre os peptídeos antimicrobianos de leptodactídeos. Todos possuem massa molecular semelhante, ponto isoelétrico, carga e atividade antimicrobiana bastante parecidas. Contudo a hidrofobicidade média e o momento hidrofóbico variam, influenciando os diferentes HC₅₀ e MICs observados. Os MICs contra bactérias Gram-negativas determinados para *fallaxin* no presente trabalho estão em total acordo com os obtidos por Rollins-Smith *et al.*(2005), o que é extremamente coerente, visto que as linhagens bacterianas utilizadas foram as mesmas. Todavia, nossos resultados revelaram que o peptídeo em questão é ativo contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, contradizendo os resultados obtidos por Rollins-Smith *et al.*(2005) e Nielsen *et al.* (2007), sendo que os MICs antimicrobianos do último trabalho diferiram dos anteriores (Tabela 6). Contudo, como o ensaio antimicrobiano é sensível aos parâmetros do ensaio e à linhagem bacteriana utilizada, e os três estudos usaram diferentes linhagens de *S. aureus*, a divergência dos resultados pode estar relacionada a estas questões.

Diferentemente da ausência de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas pelo PAM *fallaxin* apresentada em outros trabalhos, nosso estudo detectou atividade contra *B. subtilis*, além da já mencionada atividade contra *S. aureus*. As razões dessa ocorrência ainda não são totalmente compreendidas, sendo necessários maiores estudos, principalmente com relação à interação entre o peptídeo e a membrana celular da bactéria, mas podendo ser influenciada pelas condições do teste. Todavia, a ausência de atividade antimicrobiana e hemolítica do peptídeo truncado Flx-16 também foi observada por Nielsen *et al.* (2007). A perda de atividade biológica com a clivagem sugere que a seqüência completa é necessária para o desempenho da função e que, provavelmente, a amidação C-terminal é importante para o desempenho da atividade.

Resultado divergente do obtido por King *et al.* (2005) foi encontrado no MIC determinado para *pentadactylin* testado contra *P. aeruginosa*, possivelmente decorrente das diferentes condições de ensaio, já que a linhagem bacteriana utilizada foi a mesma. As outras concentrações inibitórias mínimas e o HC₅₀ obtidos estão em pleno acordo com o trabalho anterior (Tabela 6).

A análise do multi-alinhamento dos PAMs de leptodactilídeos mostrou que o PAM mais similar a *fallaxin* é o *laticeptin*, ocorrendo apenas duas substituições conservativas nas posições 13 e 19. Essa similaridade é refletida na semelhança entre os MICs obtidos nos trabalhos publicados. Outro peptídeo que deve apresentar um MIC bastante parecido aos dos peptídeos citados é o *syphaxin*, pois apresenta a mesma distribuição de resíduos de aminoácidos considerando-se a polaridade. Infelizmente, no trabalho de Dourado *et al.* (2007) não foi possível realizar estudos mais aprofundados com este PAM, entretanto os MICs de seus fragmentos SPX(1–16) e SPX(1–22) foram determinados. Curiosamente, esses truncados apresentaram MICs mais potentes que os encontrados para os PAMs íntegros de leptodactilídeos. No presente trabalho e no de Nielsen *et al.* (2007), o fragmento de *fallaxin* Flx-16 foi testado e nenhuma atividade biológica foi encontrada, como dito anteriormente, apesar da enorme semelhança com o truncado SPX(1–16) (Tabela 4). O ensaio antimicrobiano realizado por Nielsen *et al.* (2007) utilizou as mesmas linhagens de *E. coli* e *S. aureus* que Dourado *et al.* (2007), todavia, o protocolo usado foi diferente, inclusive da metodologia do presente trabalho. De acordo com os resultados do trabalho realizado por Zelezetsky *et al.* (2005), pequenas alterações das características químicas do peptídeo, como tamanho da face polar, profundidade do setor hidrofóbico e o gradiente longitudinal de hidrofobicidade, podem produzir grandes impactos na atividade biológica. Por exemplo,

verificou-se que resíduos de aminoácidos hidrofóbicos com cadeia lateral curta reduzem a atividade antimicrobiana e esse pode ser o caso dos fragmentos mencionados acima, onde ocorreu a substituição de uma leucina no peptídeo *syphaxin* por valina no *fallaxin*, sendo que a cadeia lateral da valina é menor que a da leucina. A divergência entre os resultados dos trabalhos levanta a questão da necessidade de padronização dos ensaios antimicrobianos, favorecendo e validando a comparação dos resultados disponíveis na literatura.

A amidação C-terminal é altamente conservada entre os peptídeos antimicrobianos de leptodactilídeos. Essa modificação pode aumentar a atividade antimicrobiana, pois reduz a repulsão eletrostática entre a porção C-terminal do peptídeo e o grupo fosfodiéster dos fosfolípidos (Cao *et al.*, 2005). Uma importante qualidade de um antibiótico é ser seletivo, assim a eficácia de um peptídeo antimicrobiano é determinada pela comparação entre as atividades hemolítica e antimicrobiana, atuando como um índice terapêutico. A natureza seletiva dos peptídeos antimicrobianos vem sendo atribuída a diferenças na composição da membrana das células de mamíferos e de microorganismos. Enquanto, os primeiros possuem fosfolípidos “zwitteriônicos”, a membrana externa das bactérias é carregada negativamente (Yeaman & Yount, 2003). Portanto, seria de se esperar que um aumento na carga positiva pela amidação C-terminal devesse aumentar não apenas a atividade antimicrobiana, como melhorar a seletividade por células bacterianas (Cao *et al.*, 2005). Além disso, o aumento da atividade devido à amidação C-terminal também pode ser ocasionado pela indução da formação de uma hélice C-terminal ou estabilização das conformações em hélice já existentes, alteração do momento dipolo e redução da susceptibilidade à degradação por carboxipeptidases (Mor & Nicolas, 1994; Shalev *et al.*, 2002).

A predição da estrutura secundária para os peptídeos testados *fallaxin* e *pentadactylin* indica uma forte propensão para adotar a conformação α -hélice. Entretanto, a projeção helicoidal (Figura 21) ilustra que a natureza anfipática da hélice é baixa com dois resíduos de lisina segregados de um lado da hélice e outros dois na face posterior. As propriedades antimicrobianas e citolíticas dos peptídeos são determinadas pela complexa interação entre cationicidade, hidrofobicidade, capacidade de adotar a conformação α -hélice e anfipaticidade (Yeaman & Yount 2003).

Estudos demonstram que a conformação em α -hélice anfipática é fundamental para a nocividade contra bactérias Gram-positivas, mas menos necessária contra Gram-negativas (Giangaspero *et al.*, 2001). Desde que a cationicidade e a hidrofobicidade sejam mantidas, peptídeos com pouca anfipaticidade ainda são ativos, como é observado nos peptídeos de

Leptodactylus. Semelhantemente, foi demonstrado que o aumento do momento hidrofóbico promove a atividade hemolítica contra eritrócitos humanos (Dathe & Wieprecht, 1999). A presença de cinco resíduos básicos no *fallaxin* contra quatro no *pentadactylin* torna o peptídeo mais catiônico, resultando na maior potência antimicrobiana dessa macromolécula.

Assim, é provável que as baixas potências hemolíticas dos PAMs *fallaxin* e *pentadactylin* sejam influenciadas pela moderada anfipaticidade dos peptídeos. Além disso, a atividade relativamente baixa contra as bactérias testadas pode ser conseqüência da sua reduzida cationicidade e da presença de dois resíduos carregados negativamente, o que pode prejudicar a interação com a membrana das bactérias. Os peptídeos estudados são encontrados em grande quantidade no veneno bruto, então, apesar da baixa potência, sua concentração pode exceder o valor do MIC para muitos dos patógenos aos quais o animal possa estar exposto no seu ambiente silvestre.

A importância dos parâmetros estruturais dos peptídeos consiste nos seus diferentes papéis na interação com as membranas de células procarióticas e eucarióticas (Dathe & Wieprecht, 1999). A comparação e a compreensão desses parâmetros auxiliarão o desenho de novos antibióticos, suprimindo a urgente necessidade de novos fármacos para combater linhagens de microorganismos resistentes (Oren *et al.*, 1999). Além disso, devido à semelhança entre os peptídeos isolados de leptodactilídeos, estudos nessa linha poderão auxiliar a elucidar questões taxonômicas do grupo.

6.2. Atividade anticarcinogênica

A literatura indica que muitos dos peptídeos antimicrobianos ativos contra um amplo espectro de microorganismos também desempenham uma função antitumoral (Tabela 7). Comparado ao grande número de PAMs já isolados de anfíbios, poucos estudos foram realizados para a verificação de atividade contra linhagens de câncer e sobre o mecanismo de ação (Cruz-Chamorro *et al.*, 2006). Frequentemente, os PACs possuem o C-terminal amidado, apesar dessa característica não ser uma regra, por exemplo, os peptídeos *gaegurins* isolados de *Rana rugosa*; e são catiônicos. Todavia, peptídeos pouco catiônicos como o *gaegurin 6* também podem ser citotóxicos ou citostáticos contra células carcinogênicas. Estudos observaram uma maior incidência dos resíduos de aminoácido I e K nos PACs do que nos PAMs e que o balanço inversamente proporcional entre anfipaticidade e hidrofobicidade é importante para os PACs na invasão das membranas celulares das células tumorais (Dennison *et al.*, 2006). A análise da tabela 7 nos permite verificar que os PACs menos catiônicos

apresentam maior hidrofobicidade média ($\langle H \rangle$), contudo, também sugere que, como na atividade antimicrobiana, a atividade anticarcinogênica é decorrente de um sinergismo de características químicas do peptídeo.

Os dados obtidos nos ensaios de atividade anticarcinogênica indicam que os PAMs *fallaxin* (Figura 22) e *pentadactylin* (Figura 23) são ativos contra as linhagens celulares de câncer testadas. Como no ensaio antimicrobiano, o peptídeo *fallaxin* demonstrou ser mais potente que o *pentadactylin* (Figura 24). Esse resultado pode ser decorrente de uma provável similaridade entre os mecanismos de ação dos peptídeos em ambas as atividades testadas, visto que alguns PACs atuam nas membranas celulares levando à necrose da célula. Considerando-se que o mecanismo anticarcinogênico desses peptídeos seja via membrana, a diferença encontrada nos valores de IC_{50} para as diferentes linhagens celulares testadas sugere que a atividade dos PACs como a dos PAMs é dependente da composição da membrana plasmática da célula testada. Assim, a interação entre as características do peptídeo e a composição da membrana das células utilizadas é que determina a especificidade e a potência da atividade desempenhada pelo peptídeo (Dennison *et al.*, 2006).

Infelizmente, os PAMs testados demonstraram ser mais citotóxicos para a linhagem celular normal de fibroblasto (FHN) do que para as linhagens de câncer (Figura 24), sendo portanto classificados no grupo dos PACs representado por *melittin*, os quais são ativos contra células de câncer e células normais. Este resultado vai de encontro aos dados obtidos nesse e em outros estudos que concluíram que os peptídeos *fallaxin* e *pentadactylin* são fracamente hemolíticos e, portanto, pouco citotóxicos para células normais. Diferentemente do peptídeo *pentadactylin*, o peptídeo *magainin 2* foi seletivo para células tumorais no trabalho de Haimovich & Tanaka (1995). Helmerhorst e colaboradores (1999) demonstraram que a atividade de vários peptídeos catiônicos é fortemente influenciada pela força iônica. No seu trabalho, *histatins* e *magainins* foram inativas contra eritrócitos humanos e *Candida albicans* em PBS, mas apresentaram potente atividade quando testados em meio de menor força iônica. Ensaio hemolíticos são feitos em Tris ou PBS, condições muito salinas para os ensaios antimicrobianos ou antitumorais. Assim, é questionável se os resultados de ensaios hemolíticos conduzidos nesses tampões possam ser comparados apropriadamente a resultados de ensaios conduzidos em um meio de baixa força iônica e sob diferente tempo de incubação. A influência da força iônica na atividade sugere que a interação peptídeo-hemácia é governada primeiramente por forças eletrostáticas. Outros fatores também influenciam no resultado hemolítico, tais como tempo de armazenamento dos eritrócitos e diferenças

individuais nos antígenos dos grupos sanguíneos. Portanto, inferências sobre a citotoxicidade de um peptídeo devem ser feitas com muita precaução e de forma criteriosa, sendo necessária a condução dos ensaios sob condições semelhantes, viabilizando futuras comparações (Helmerhorst *et al.*, 1999).

Apesar da citotoxicidade dos peptídeos *pentadactylin* e *fallaxin* ter sido maior para células normais de fibroblasto do que para as células tumorais testadas, esses peptídeos podem vir a ser usados como uma alternativa no combate ao câncer. Alternativas que aumentem a seletividade desses peptídeos tornariam possível o uso dessas potentes moléculas, as quais apresentaram IC₅₀ menor que a do PAC *magainin 2* ativo contra células de câncer de bexiga (Lehmann *et al.*, 2006). Pesquisas revelaram que peptídeos análogos compostos de D- e L-aminoácidos possuem a sua especificidade contra célula tumoral aumentada, sendo a seletividade provavelmente determinada principalmente pela atração eletrostática dos peptídeos aos componentes ácidos (mucinas O-glicosiladas) da superfície das células de câncer, mas podendo ser influenciada pela maior superfície de contato (microvilos) dessas células. Além da redução da toxicidade, a composição simples desses análogos, a sua estabilidade frente à degradação enzimática e inativação por componentes do soro e a reduzida antigenicidade fazem desses peptídeos excelentes candidatos a novos quimioterápicos (Papo & Shai, 2003). Como a toxicidade para as células normais também é uma característica dos quimioterápicos convencionais, estratégias desenvolvidas para aumentar a sua eficiência também podem ser empregadas no uso de *pentadactylin*. Por exemplo, o direcionamento do PAC para a célula tumoral por meio do uso de vetores, como peptídeos que se ligam especificamente a determinadas células tumorais (Enbäch & Laakkonen, 2007) e vírus (Guo, Thorne & Bartlett, 2008).

Alterações da viabilidade celular das linhagens testadas também foram confirmadas pela observação em microscópio de contraste de fase das células tratadas com os peptídeos *fallaxin* e *pentadactylin* (Figuras 25, 26, 27 e 28). Notou-se que todas as linhagens tratadas com as maiores concentrações de peptídeo tiveram a sua morfologia celular modificada, seja por perda da integridade da membrana celular e indefinição do núcleo e do nucléolo, outrora bastante definidos, ou por redução do tamanho das células. Nas maiores concentrações testadas, foi possível a observação de uma grande quantidade de *debris* celulares, evidenciando uma forte atividade contra a integridade da membrana dessas células, com exceção da linhagem B16F10 incubada com *fallaxin*, na qual aparentemente não houve perda da integridade da membrana plasmática.

O ensaio de viabilidade celular com MCF-7 foi repetido para o peptídeo sintético *pentadactylin*, tendo sido o resultado encontrado bastante coerente ao obtido com o peptídeo nativo (Figura 23). Assim, os ensaios de citostaticidade e citotoxicidade para inferência do mecanismo de ação do PAC *pentadactylin* foram realizados com o IC₅₀ do peptídeo sintético. Apesar da utilização da concentração que deveria reduzir em 50% a viabilidade celular, aparentemente, uma porcentagem muito menor de células foi afetada. A relação dose-dependência também foi constatada por Risso *et al.* (1998) com os peptídeos BMAP, os quais, em concentrações mais baixas causavam pouca permeabilidade da membrana celular e necrose, no entanto, em altas concentrações induziam a maioria das células U937 à morte por necrose.

Os resultados oriundos da análise por citometria de fluxo demonstraram que ocorreu um aumento da fragmentação de DNA (Figura 31C) e o ciclo celular das células incubadas com o *pentadactylin* foi alterado de forma significativa (Figura 31D). A fragmentação do DNA e a condensação de cromatina foram verificadas pela redução do número de eventos com alta fluorescência e aumento dos eventos com baixa fluorescência. Já o ciclo celular foi interrompido, observando-se uma redução da quantidade de células em G1 e o aumento proporcional de células estacionadas em G2/M, sugerindo que as células não estão conseguindo se dividir, que o ciclo foi obstruído.

Em células somáticas normais, a fase M do ciclo celular envolve dois passos: mitose, onde cromátides-irmãs são alinhadas e segregadas em duas células; e citocinese, caracterizada pela partição do citoplasma e de seus componentes nas duas células-filhas. O ponto de checagem G2 do ciclo celular é responsável pela suspensão da mitose quando o DNA é danificado. Os danos no DNA ativam várias moléculas que promovem atividades celulares como interrupção do ciclo celular, reparo do DNA ou apoptose por meio da via do p53, se o dano não puder ser reparado. Outros pontos de checagem também podem levar à interrupção do ciclo celular caso algo de errado seja detectado, um deles detectando a má formação do fuso mitótico, o outro verificando o posicionamento do fuso. Algumas vezes a célula retorna ao ciclo mitótico, acumulando danos, o que leva à sua morte por catástrofe mitótica, caracterizada por células gigantes micro ou multinucleadas, com cromatina não-condensada (Erenpreisa *et al.*, 2000; Okada & Mak, 2004; Jin & El-Deiry, 2005; Erenpreisa & Cragg, 2007). O DNA é o principal alvo de vários quimioterápicos utilizados na terapêutica do câncer, os quais atuam direta ou indiretamente nessa molécula, ou bloqueando funções

metabólicas envolvidas com o DNA, por exemplo, a da DNA polimerase (Roos & Kaina, 2006).

Como dito anteriormente, a fragmentação do DNA pode levar à apoptose (Igney & Krammer, 2002). O grau de degradação de DNA varia de acordo com o estágio do processo apoptótico, tipo celular e a natureza do agente indutor da morte celular. Os danos secundários causados pela danificação do DNA e desbalanceamento do crescimento geralmente causam alterações na morfologia celular e no metabolismo, apresentando características tanto do processo apoptótico, quanto do necrótico (Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

Além da fragmentação do DNA, foram observadas por citometria de fluxo (Figura 30) alterações no tamanho (redução do volume celular) e na granulosidade das células (redução da granulosidade), as quais sugerem morte celular por apoptose. A habilidade de espalhar luz do feixe de laser do citômetro de fluxo é alterada durante a morte celular, refletindo mudanças morfológicas das células. Entretanto, tais mudanças não são específicas de apoptose, podendo ser resultado de quebra mecânica das células, isolamento do núcleo celular ou do processo necrótico. É provável que o resultado obtido seja oriundo do aparecimento de pequenas vesículas livres no meio, como visualizado na análise por microscopia de contraste de fase (Figura 29), já que alterações da morfologia das células não foram visualizadas. De acordo com Barros e colaboradores (2003), tais vesículas podem indicar morte celular pela via apoptótica. Portanto, as imagens obtidas na microscopia refutam a interpretação dos resultados da citometria de fluxo de alteração da morfologia das células de MCF-7 incubadas com o peptídeo. Apesar da técnica de citometria de fluxo ser um procedimento rápido, objetivo e sensível, é necessário que o mecanismo de morte celular seja sempre confirmado por microscopia de luz ou eletrônica (Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

O ensaio com rodamina 123 mostrou que o potencial transmembrânico da mitocôndria não foi alterado com o tratamento por *pentadactylin* (Figura 31B), todavia a apoptose é caracterizada pela redução do referido potencial. O experimento para verificação da integridade da membrana plasmática pela exclusão do azul de tripan (Figura 31A) indicou que a mesma permaneceu inalterada. A exclusão do azul de tripan de dentro da célula e outros métodos baseados na integridade da membrana plasmática apesar de simples e baratos podem falhar na identificação de células em apoptose. A exclusão desses corantes não ocorre em células necróticas e em apoptose tardia, entretanto, o experimento é falho na detecção de células em estágios iniciais de apoptose que excluem o corante, podendo ser alterado também pelo tipo de célula e pelo modo de indução da apoptose. Portanto, tais resultados não refutam

a hipótese de morte por apoptose, visto que células em estágios iniciais desse processo apresentam integridade estrutural, preservação da função da membrana plasmática e das organelas. A inexistência de evidências confirmando a apoptose celular com um método em particular não significa a ausência de apoptose. Por isso é importante o uso de diferentes métodos, visando à análise de diferentes características (Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

Além das características observadas nas células de MCF-7 tratadas, o processo apoptótico apresenta outras peculiaridades, tais como DNA picnótico, desintegração do envelope nuclear e presença de corpos apoptóticos que são fagocitados sem causar inflamação local. A morte celular por apoptose nem sempre é acompanhada por todas essas características, podendo ser atípica (Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

A translocação pela membrana plasmática de células de HeLa pelo PAM *buforin 2* sem a perturbação da sua organização lipídica foi observada por Takeshima *et al.* (2003). Contudo, apesar da ação antimicrobiana pela inibição de síntese de proteína, o mesmo não apresentou toxicidade contra as células testadas, em oposição à atividade dispensada pelo PAM *pentadactylin*. Resultado interessante também foi obtido com o PAM *dermaseptin S3*, o qual é tóxico apenas para o parasita intraeritocítico, agindo sem danificar a integridade da membrana do eritrócito (Ghosh *et al.*, 1997). Infelizmente, o processo pelo qual *buforin 2*, *dermaseptin S3* e *pentadactylin* transpõem a membrana celular (se é que transpõem) ainda não foi elucidado. Foi sugerido que alguns peptídeos se ligam paralelamente à membrana induzindo uma curvatura positiva, aumentando a área da superfície da camada externa. Esse fato leva à redução da espessura do cerne hidrofóbico da membrana, o que pode facilitar a penetração dos peptídeos, atingindo alvos intracelulares (Sato & Feix, 2006). Os PACs citotóxicos também para células normais geralmente provocam a morte celular via modelo *barrel-stave*. Outra forma de morte de células tumorais causada por PACs é pela formação de poros toroidais, caracterizado pela formação de poros temporários. Enquanto abertos, esses poros também podem permitir a entrada dos peptídeos dentro da célula, atingindo alvos celulares e desencadeando a via apoptótica, assim a ação dos PACs pode ter múltiplos alvos (Dennison *et al.*, 2006).

Os dados obtidos com a incubação do PAM *pentadactylin* com células da linhagem de câncer de mama MCF-7 sugerem morte celular pela via apoptótica. O PAC *magainin* isolado de anfíbio também parece inviabilizar células de leucemia promielocíticas HL-60 por apoptose (Cruz-Chamorro *et al.*, 2006). Nesse estudo foram verificados sinais apoptóticos como liberação de citocromo c, aumento da atividade proteassômica, fragmentação de DNA,

externalização de fosfatidilserina e aumento da geração de espécies reativas de oxigênio. É possível que o PAC *pentadactylin* não entre na célula para desencadear a via apoptótica, podendo esta ser iniciada pela via extrínseca, visto que não houve permeabilização da membrana externa da mitocôndria, evento central da via intrínseca. Portanto, o PAC *pentadactylin* pode estar atuando nos receptores de morte, desencadeando a cascata de caspases, responsáveis pelas alterações químicas e morfológicas típicas da apoptose (Igney & Krammer, 2002). Entretanto, existe a possibilidade da via apoptótica não ser a principal responsável pela morte celular. Por exemplo, Zaffaroni *et al.* (2001) cogitaram que a droga C1311, a qual bloqueia o ciclo celular em G2/M de células osteogênicas, pode levar ao processo de apoptose como resultado de uma autólise generalizada, já que apenas um pequeno número de células apresentavam características apoptóticas e de uma maneira tempo-dependente.

Resultados como a fragmentação do DNA, a alteração do ciclo celular e a presença de vesículas na cultura de células de MCF-7 tratadas com *pentadactylin* sugerem morte celular por apoptose, visto que a ativação da caspase 3 resulta nas características mencionadas. Entretanto, a fragmentação da membrana plasmática de células incubadas com maior concentração de *pentadactylin* sugere o mecanismo de morte celular por necrose, contudo, a perda de integridade da membrana pode ocorrer nos estágios finais do processo apoptótico. Também é possível que o processo apoptótico seja seguido de necrose.

Durante o início do processo apoptótico ocorre a perda da assimetria dos fosfolípidos da membrana plasmática, levando à exposição de fosfatidilserina na face externa, tornando a membrana mais suscetível à desestabilização pelo peptídeo, levando à necrose da célula. A perda de integridade de membrana observada sob altas concentrações pode indicar o mecanismo de ação *carpet-like*, pois pode ser que a destruição da membrana dependa que a concentração de peptídeos ligados atinja um limiar específico, levando ao colapso inúmeros poros toroidais (Dennison *et al.*, 2006). Esse mecanismo de ação (carpete/poro toroidal) foi recentemente descrito para o peptídeo *melittin* (Allende, Simon & McIntosh, 2005). Portanto, o cálculo de IC₅₀ para esse tipo de peptídeo não é satisfatório, pois este valor, caso não seja o da concentração limitante para o desempenho da atividade biológica, não inviabilizará metade das células.

Outro mecanismo pelo qual as células tratadas poderiam perder a sua integridade de membrana seria pelo modelo *Shai-Matsuzaki-Huang*, no qual ocorre um adelgaçamento da membrana seguido da formação de poros transientes e colapso da membrana. Nesse caso, os

poros também permitiriam que os peptídeos atingissem alvos intracelulares capazes de desencadear o processo apoptótico antes da desintegração da membrana (Dennison *et al.*, 2006).

A apoptose é um modo ativo e fisiológico de morte celular sujeito a processos regulatórios complexos (Darzynkiewicz *et al.*, 1997). Ainda não se sabe se apoptose, senescência, necrose, autofagia e catástrofe mitótica são programas independentes ou que se relacionam em algum grau; e se ocorrem sucessivamente ou simultaneamente. Um importante aspecto da tumorigenicidade e do desenvolvimento de resistência a drogas anticâncer é a resistência a morte celular, principalmente via apoptose. Assim, novas estratégias capazes de induzir o processo apoptótico em células de câncer são bem-vindas, modulando a sensibilidade do tumor e das células normais aos agentes antitumorais, via os mecanismos regulatórios da apoptose (Okada & Mak, 2004).

Além do papel antimicrobiano dos peptídeos catiônicos de anfíbios, várias evidências já indicam o seu uso na terapêutica do câncer, visto que os PACs apresentam potente atividade contra células tumorais, são pouco imunogênicos e são pequenos, reduzindo os custos da síntese. Vale ressaltar que a maior parte dos estudos foram realizados em modelos *in vitro*, portanto o desempenho desses PACs pode ser totalmente alterado *in vivo*. O estudo do mecanismo de ação e o desenvolvimento de estratégias capazes de aumentar a potência, seletividade e resistência a componentes do soro podem representar um importante avanço dos modelos terapêuticos (Kim *et al.*, 2003; Shadidi & Sioud, 2003; Cruz-Chamorro *et al.*, 2006). Contudo, ainda não está claro se o animal utiliza a atividade anticâncer dos PACs, ou se essa atividade é apenas um feliz bônus originado da possível atividade membranolítica desses peptídeos (Doyle *et al.*, 2003).

6.3. Atividade enzimática

O perfil eletroforético da secreção cutânea da rã-pimenta apresentou algumas bandas principais como: várias bandas acima de 90 kDa, bandas com cerca de 45 kDa, 50 kDa e 30 kDa; e em torno de três bandas ao redor de 16 kDa (Figura 32). Os dados gerados pela análise da secreção cutânea de *L. labyrinthicus* por espectrometria de massa revelaram vários possíveis fragmentos dos peptídeos estudados *fallaxin* e *pentadactylin*, sendo que dois desses fragmentos foram confirmados por Edman (Flx-16 e Flx-22) (Tabela 8).

A presença desses truncados é um forte indicador de atividade peptidásica. Formas truncadas de peptídeos também foram observadas nas secreções de outros

leptodactilídeos (Figura 33): Dourado *et al.* (2007) identificaram seis fragmentos do peptídeo *syphaxin* de *Leptodactylus syphax*, Nascimento (2007) obteve a confirmação de quatro dos 17 possíveis fragmentos derivados de *ocellatins 1 a 5* (*L. ocellatus*) e o truncado Flx-22 identificado no presente trabalho também foi isolado por Rollins-Smith *et al.* (2004) da secreção de *L. fallax*. Assim, esforços foram voltados para a pesquisa de enzimas proteolíticas do veneno estudado.

Os pontos de clivagem correspondentes aos prováveis fragmentos situam-se entre as posições 12 e 23 dos PAMs *pentadactylin* e *fallaxin* (Figura 33). Não foi possível identificar a presença de uma característica específica nas seqüências que cause o reconhecimento como substrato para peptidases, porém nenhuma clivagem após resíduo ácido foi detectada. Assim, sugere-se que a clivagem seja realizada por proteases com diferentes especificidades, podendo, até mesmo, existir peptidases inespecíficas no veneno. Até o momento, não foram encontrados nas secreções cutâneas de leptodactilídeos peptídeos truncados que resultem de clivagens entre as posições 1 e 11. Os fragmentos de *syphaxin* descritos por Dourado *et al.* (2007) originaram-se de cisões após os resíduos 16, 19, 22, 23 e 24, enquanto os fragmentos de *ocellatins 1 a 5* resultaram da clivagem após o resíduo 12 ao 17 e depois do 19 (Nascimento, 2007) (Figura 33). Como até agora nenhuma clivagem antes do resíduo 12 foi observada, é possível que esse segmento N-terminal, o qual é extremamente conservado, seja menos importante para o desempenho da atividade biológica do que a porção C-terminal. Sabe-se que peptídeos como *citropin 1.1* são armazenados na forma inativa nas glândulas da pele, mas quando o sapo é estressado, fica doente ou é atacado, uma endoprotease cliva o peptídeo espaçador e o peptídeo ativo é liberado na pele. Como esses peptídeos podem ser tóxicos para o anfíbio, 10 minutos após ser secretado, endoproteases removem resíduos do peptídeo, destruindo a sua atividade biológica (Doyle *et al.*, 2003). Porém, o número de peptídeos resultantes de processamento proteolítico conhecidos até o momento é muito reduzido, não permitindo conclusões definitivas a respeito da ocorrência ou da frequência de clivagens nas regiões N-terminais e a respeito da especificidade dessas cisões.

Como os fragmentos de *fallaxin* Flx-16 e Flx-22 não apresentaram atividade antimicrobiana e nem hemolítica nos testes preliminares ou nos ensaios para determinação de HC₅₀ e MIC no caso do primeiro fragmento, sugere-se que a clivagem do PAM *fallaxin* tenha ocorrido com o propósito da inativação do peptídeo, visando à proteção do animal. Foi observado que alguns fragmentos peptídicos isolados das secreções de outras famílias de anuros sofrem amidação C-terminal após a clivagem (Resnick *et al.*, 1991), o que pode

restaurar a atividade antimicrobiana perdida com a cisão (Sitaram & Nagaraj, 1999) ou ativar os fragmentos para o desempenho de outras funções, por exemplo, hormonais. Todavia, existem relatos de fragmentos como o SPX(1–16) e SPX(1–22), de *sypfaxin*, com potente atividade biológica e que não sofreram processamento após a clivagem (Dourado *et al.*, 2007).

Os experimentos com substrato fluorogênico identificaram enzimas proteolíticas capazes de clivar após os resíduos de leucina (L), prolina (P) e alanina (A), todos hidrofóbicos como verificado na maioria das clivagens dos prováveis fragmentos encontrados (Figura 37). Observa-se também que apenas os peptídeos com o N-terminal livre foram sujeitos à atuação das peptidases do veneno, indicando a presença de aminopeptidases. Existe a possibilidade que a secreção testada seja capaz de clivar após resíduos de tirosina (Y) e arginina (R), hidrofóbico e básico respectivamente. Todavia, como a extremidade N-terminal dos peptídeos contendo os resíduos citados antes do AMC apresenta-se bloqueada, a atividade proteolítica tenha sido impossibilitada. Por exemplo, os peptídeos fluorogênicos N-Succinyl-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC e N-Succinyl-Ile-Ala-AMC não sofreram hidrólise enzimática, já os Gly-Pro-AMC e L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC liberaram AMC em contato com a secreção testada. Apesar dos peptídeos Gly-Pro-AMC, L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC e L-Leu-AMC terem sido clivados, a atividade proteolítica foi maior no primeiro substrato, o qual é específico para dipeptidilaminopeptidase (Figura 37). A menor atividade detectada foi com o peptídeo L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC. Os resultados obtidos após a incubação do gel SDS-PAGE 10% com os substratos acima revelaram que a mesma banda de aproximadamente 50 kDa é responsável pela clivagem dos três peptídeos fluorogênicos testados (Figura 40). As outras duas bandas de atividade de proteínas que não entraram no gel separador podem ser resultado da oligomerização da proteína de 50 kDa, visto que a amostra não foi fervida e que o tampão de amostra não possui agente redutor como DTT. Contudo, essa observação não significa que a mesma enzima é responsável pelas clivagens, podem existir outras enzimas de massas semelhantes gerando proteólise, visto que o padrão de inibição resultante do ensaio em placa com inibidores foi diferente, além de perfis de pH ótimo e velocidade máxima distintos.

Utilizando-se os peptídeos fluorogênicos para os quais a secreção cutânea de *L. labyrinthicus* apresentou atividade proteolítica, testou-se a influência da concentração protéica na atividade, revelando que a atividade enzimática sobre os substratos testados aumenta com o aumento da quantidade de proteína na secreção testada (Figura 38). O mesmo

ensaio foi utilizado para verificar o pH ótimo de atividade (Figura 39). O pH ótimo de atividade proteolítica foi distinto para cada substrato e para os substratos L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC e L-Leu-AMC houve mais de um pico de atividade, indicando a atuação de enzimas diferentes. O peptídeo L-Leu-AMC (Figura 39B) sofreu maior hidrólise no pH 7,0 e picos nos pHs 8,0 e 10,0, já com o substrato L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC, houve pico de liberação de fluoróforo nos pHs 7,5 e 8,0 (Figura 39C). Entretanto, para todos os substratos, a atividade máxima foi observada em pH neutro a levemente básico, o que é extremamente coerente com o pH 6,9 da secreção estudada, visto que é nesse pH que as enzimas atuam. Observou-se também que as enzimas que clivam os substratos Gly-Pro-AMC e L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC perdem a atividade em pH 5,0, pH 6,0 e pH 10,0, enquanto o peptídeo L-Leu-AMC é hidrolizado por peptidases que reduzem a sua atividade principalmente nos pHs 5,0 e 9,0.

Verificou-se a presença de atividade caseinolítica na secreção, mesmo que esta tenha sido baixa. Não foi possível a identificação da temperatura (Figura 34A) e do pH (Figura 34B) ótimos para essa atividade, pois os resultados não foram estatisticamente significativos, variando muito pouco. Possivelmente esse fato se deve às características desse ensaio, capaz de evidenciar a presença de diferentes enzimas (serino- e metalo-peptidases) que requerem condições específicas para clivarem o substrato inespecífico caseína, além da baixa sensibilidade do mesmo.

A atividade gelatinolítica de duas bandas entre 60 e 70 kDa foi observada na zimografia (Figura 35). A massa molecular das enzimas gelatinolíticas não pôde ser determinada com acurácia, pois as amostras não foram aquecidas e nem reduzidas, não evitando a agregação entre proteínas, e porque a presença de gelatina pode resultar em interações capazes de afetar a mobilidade das proteínas (Almeida *et al.*, 2002). A atividade testada foi observada apenas nos pHs 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0, coincidindo com o pH ótimo neutro a alcalino observado no ensaio fluorogênico (Figura 36B). Entretanto, como no ensaio caseinolítico, não foi possível identificar o melhor pH para a atividade proteásica. A incubação do gel com diferentes tampões mostrou que a atividade observada é dependente de cálcio e é inibida na presença de EDTA e de excesso de zinco (Figura 36A), características indicadoras da presença de metalo-peptidases (Souza, Gerlach & Line, 2001). O tampão de incubação contendo Tris-HCl 50 mM, CHAPS 0,02% (p/v), CaCl₂ 10 mM e NaCl 150 mM foi o que favoreceu mais a atividade das enzimas gelatinolíticas identificadas. Estudos sugerem que o detergente CHAPS pode modular a atividade e a estabilidade de algumas

proteínas (Sah & Kim, 2006), entretanto o aumento observado pode ser devido também ao aumento da força iônica gerado pelo NaCl. Todavia, a determinação de qual dos dois fatores influencia no aumento da atividade detectada só poderá ser feita após a realização de experimentos testando cada uma das variáveis separadamente.

O ensaio fluorogênico com diferentes inibidores sugere que a proteólise observada pela secreção glandular da rã-pimenta é gerada por metalo- e serino-peptidases (Tabela 9), pois inibições da atividade menores que 25% não foram consideradas significativas. A clivagem do peptídeo Gly-Pro-AMC foi inibida por inibidores de metalo- e serino-peptidases. A inibição total ocorreu após a incubação com o inibidor de metalo-peptidase fenantrolina, ocorrendo também em menor intensidade com os inibidores bestatina e EDTA, reforçando a idéia de que a hidrólise desse substrato é feita principalmente por metalo-peptidases. Aparentemente, a proteólise do substrato L-Leu-AMC acontece por metalo- e serino-peptidases, visto que não houve inibição por E-64, inibidor exclusivo de cisteíno-peptidase, e por pepstatina A, inibidor de aspártico-peptidase. Já a hidrólise do peptídeo fluorogênico L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phe-Ala-AMC é menos reduzida por fenantrolina que com os outros substratos, todavia a inibição por PMSF chegou a 88% da atividade máxima, indicando, além da presença de metalo-peptidases, forte atuação de serino-peptidases. Como, em todos os ensaios realizados, não houve atividade proteolítica em meio ácido, sugere-se a ausência de glutâmico- e aspártico-peptidases. Os resultados do ensaio de inibição estão em conformidade com os perfis de atividade *versus* pH obtidos, pois metalo- e serino-peptidases são mais ativas em pH neutro a ligeiramente básico (Barrett & Rawlings, 1995; Dunn, 2001; Rawlings *et al.*, 2008).

O ensaio de atividade fosfolipásica demonstrou a presença de fosfolipases na secreção glandular da rã-pimenta. A atividade detectada passou a ser estatisticamente significativa após o segundo minuto de leitura. Já a peçonha de *C. durissus terrificus* usada como controle positivo alterou rapidamente o pH do ensaio (Figura 41). Portanto, a secreção cutânea de *L. labyrinthicus* apresenta atividade fosfolipásica assim como a do anfíbio *Phyllomedusa hypochondrialis* (Conceição *et al.*, 2007). Como a maioria das fosfolipases A₂ possuem entre 13 kDa e 20 kDa, as bandas em torno de 16 kDa e algumas em torno de 14,4 kDa detectadas por SDS-PAGE 12% (Figura 32) e as massas de cerca de 15 kDa observadas na análise por MALDI-TOF das últimas frações (Anexo) podem ser de fosfolipases.

Apesar da detecção de diferentes tipos de atividade enzimática na secreção cutânea de *L. labyrinthicus*, a identificação dos grupos de peptidases e fosfolipases só poderá ser feita

de forma conclusiva após a purificação e seqüenciamento dessas proteínas. A análise de proteínas presentes na secreção de anuros não é muito comum, sendo a busca por peptídeos bioativos mais corriqueira. A atividade das enzimas observadas na secreção de *L. labyrinthicus* pode estar envolvida na regulação da homeostase da pele, processamento de peptídeos (por ex: PAMs) ou atuando como moléculas de defesa. Finalmente, mais estudos são necessários para melhor caracterizar as proteínas dessa secreção e elucidar as suas funções bioquímicas.

7. Considerações finais

O presente estudo constatou a enorme riqueza peptídica/protéica da secreção cutânea de *L. labyrinthicus*, sendo esta uma possível fonte de peptídeos com as mais diversas funções biológicas. Toda essa variedade possui relevante potencial para o desenvolvimento de novas drogas, principalmente contra bactérias ou células tumorais resistentes aos fármacos convencionais.

Os peptídeos antimicrobianos caracterizados neste trabalho, *fallaxin* e *pentadactylin*, haviam sido previamente purificados da secreção de *L. fallax* e *L. pentadactylus* respectivamente por outros grupos de pesquisa. A presença dos mesmos PAMs em três espécies diferentes sugere a importância evolutiva dessas macromoléculas, indicando também que os mesmos possuem outras funções igualmente importantes como a antibacteriana. Nossos resultados mostraram que os dois peptídeos são ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de não apresentarem atividade hemolítica significativa.

A divergência dos resultados antimicrobianos e de toxicidade celular deste trabalho com relação a trabalhos de outros pesquisadores evidencia a necessidade de padronização de um protocolo único e com condições que viabilizem comparações posteriores.

Como verificado para outros PAMs de anfíbios, os peptídeos *fallaxin* e *pentadactylin* também são anticarcinogênicos. A descoberta de novas moléculas antitumorais é de extrema importância e urgência devido ao surgimento de resistência aos quimioterápicos disponíveis no mercado. Infelizmente, ambos os peptídeos são pouco seletivos para células de câncer, tendo apresentado o menor IC₅₀ para células de fibroblasto normais, portanto o seu uso terapêutico deverá ser acoplado a mecanismos que reduzam a toxicidade dos mesmos.

Os resultados dos estudos do mecanismo de ação de *pentadactylin* contra a linhagem celular de câncer de mama MCF-7 sugerem que uma das vias de morte celular induzida por este peptídeo é a apoptótica, já que algumas características de apoptose inicial foram observadas nas células tratadas com uma dose equivalente ao IC₅₀. Contudo, células de MCF-7 tratadas com 128 µM do peptídeo perderam completamente a integridade da membrana celular, podendo essa observação ser resultado do processo apoptótico avançado ou de morte celular por necrose. No último caso, o processo necrótico aconteceria após o início da via apoptótica, de forma dependente da concentração do peptídeo, sugerindo a inviabilização celular pelo mecanismo *poro toroidal/carpet-like*. Todavia, essas são apenas sugestões,

necessitando-se de maiores estudos para chegar a conclusões sobre o verdadeiro mecanismo de ação do PAC *pentadactylin*.

Apesar da maioria dos estudos de secreção glandular de anfíbios investigar peptídeos biologicamente ativos, verificou-se a presença de importantes componentes enzimáticos. Notou-se a presença de enzimas proteolíticas pertencentes, provavelmente, ao grupo das metalo- e serino-peptidases, as quais atuam de maneira ótima em pH neutro a ligeiramente básico. Verificou-se no ensaio gelatinolítico a presença de duas bandas de atividade proteolítica dependentes de cálcio e inibidas por EDTA e excesso de zinco, características de metalo-peptidases. Além da atividade proteolítica, uma fraca atividade fosfolipásica também foi detectada. Ainda não se sabe a verdadeira importância dessas proteínas, podendo estar envolvidas no processamento dos peptídeos biologicamente ativos presentes no veneno ou atuar como um mecanismo de defesa. Assim, este é um campo praticamente inexplorado, capaz de gerar inúmeros resultados interessantes e importantes para a melhor compreensão da biologia dos anfíbios.

8. Perspectivas

Como verificado nas análises por MALDI-TOF MS, a secreção cutânea de *L. labyrinthicus* é riquíssima em peptídeos. Além dos dois peptídeos com atividade biológica caracterizados neste trabalho, outros peptídeos responsáveis pela atividade hemolítica observada em algumas frações ainda precisam ser purificados e caracterizados tanto química como biologicamente. Além disso, outros ensaios preliminares de atividade biológica podem ser realizados buscando moléculas com diferentes funções, por exemplo, antiparasitária e antiviral.

Brevemente será realizado um ensaio antimicrobiano, testando-se em conjunto os peptídeos *pentadactylin* e PGL-L1 para verificar a hipótese levantada de que, apesar da falta de atividade antibacteriana detectada para o último, possa ocorrer uma ação sinérgica entre os dois.

Neste trabalho, o perfil peptídico da secreção estudada baseia-se apenas nas massas moleculares; a obtenção da estrutura primária dessas moléculas aumentará a fonte de dados disponíveis para elucidar questões taxonômicas do grupo dos leptodactilídeos, facilitando também a identificação de peptídeos com atividades em potencial.

Experimentos de atividade com os fragmentos Flx-16 e Flx-22 poderão ser realizados seguindo-se o protocolo utilizado por Dourado *et al.* (2007) no estudo dos fragmentos de *sypfaxin*, extremamente parecidos com os de *fallaxin*, todavia detentores de uma potente atividade antibacteriana. Assim, será possível determinar até onde as condições do ensaio influenciaram no resultados de ausência de atividade detectada para esses fragmentos.

Para o maior conhecimento do padrão de clivagem dos PAMs pelas peptidases do veneno estudado, os fragmentos prováveis dos PAMs isolados poderão ser confirmados por seqüenciamento.

Muito ainda deve ser esclarecido acerca da atividade anticarcinogênica dos peptídeos *fallaxin* e *pentadactylin*. Logo deverão ser feitos outros experimentos para determinação do mecanismo de ação do PAC *pentadactylin*, como análise morfológica por microscopia eletrônica e estudos com anexina V, além de testar outras concentrações do peptídeo. Ensaios para verificar se o peptídeo entra ou não na célula também são de extrema relevância. Os mesmos ensaios serão realizados com o peptídeo *fallaxin*, o qual já se encontra sintetizado.

Tendo em vista a citotoxicidade de *fallaxin* e *pentadactilin* para células normais de fibroblasto, a qual não foi observada para eritrócitos humanos, torna-se necessário a verificação da toxicidade desse peptídeo para outras células normais por meio de um protocolo que possibilite comparações posteriores. Caso a citotoxicidade seja confirmada, esse problema poderá ser minimizado, por exemplo, pela construção de análogos com D- e L-aminoácidos com maior especificidade para células tumorais.

Quanto aos estudos acerca das enzimas presentes na secreção cutânea da rã-pimenta, muito ainda tem a ser feito. Outras condições podem ser utilizadas para verificar a atividade proteolítica do veneno, por exemplo, a influência da temperatura e da força iônica sobre a atividade. Para identificar a que grupos pertencem às proteínas detectadas na zimografia, o gel poderá ser incubado com diferentes inibidores. Futuramente, as enzimas proteolíticas e fosfolipásicas responsáveis pelas atividades detectadas poderão ser purificadas e sua estrutura primária determinada.

Apesar da diversidade funcional dos peptídeos antimicrobianos atrair a atenção para que sejam fontes de novas drogas, o caminho para o seu uso clínico é longo e cheio de entraves. Algumas das dificuldades enfrentadas são o elevado custo de produção e a susceptibilidade às enzimas proteolíticas. Portanto, concomitantemente à descoberta de novos peptídeos biologicamente ativos, deve-se desenvolver novas estratégias capazes de sanar os problemas existentes e aumentar a seletividade e a potência dessas fascinantes moléculas.

9. Referências Bibliográficas

- ALAM, J. J. (2003) Apoptosis: target for novel drugs. *TRENDS in Biotechnology*. 21:479–483.
- ALLENDE, D.; SIMON, S. A. & MCINTOSH, T. J. (2005) Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores. *Biophys. J.* 88:1828–1837.
- ALMEIDA, F. M. *et al.* (2002) Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon*. 40:1041–1045.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389–3402.
- AMRI, C. E. *et al.* (2006) The plasticins: membrane adsorption, lipid disorders, and biological activity. *Biochemistry*. 45:14285–14297.
- APPONYI, M.A. *et al.* (2004) Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. *Peptides*. 25:1035–1054.
- ATHERTON, E. & SHEPPARD, R. C. (1989) Solid phase peptide synthesis: a practical approach (the practical approach series). USA: *Oxford University Press*, 216 p.
- BAEK, H. J. *et al.* (2000) Ligand binding inhibitors of A1 adenosine receptor from *Rana rugosa* are phospholipase A2s. *Eur. J. Biochem.* 267:1340–1346.
- BARRA, D. & SIMMACO, M. (1995) Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends Biothechnol.* 13:205–209.
- BARRETT, A. J. & MACDONALD, J. K. (1986) Nomenclature: protease, proteinase e peptidase. *Biochem. J. Let.* 237:935.
- BARRETT, A. J. & RAWLINGS, N. D. (1995) Families and clans of serine peptidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 318:247–250.
- BARRET, A. J. (2001) Proteolytic enzymes: nomenclature and classification. In: BEYNON, R. & BOND, J. S. (eds.) *Proteolytic enzymes*. New York: *Oxford University Press*, 1–22 p.
- BARROS, L. F. *et al.* (2003) Apoptotic and necrotic blebs in epithelial cells display similar neck diameters but different kinase dependency. *Cell Death and Diferentoiation*. 10:687–697.
- BATISTA, C. V. F. *et al.* (2001) A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*. *FEBS Lett.* 494:85–89.

- BESSALLE, R. *et al.* (1990) All D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance. *FEBS*. 274:151–155.
- BHUTIA, S. K. & MAITI, T. K. (2008) Targeting tumors with peptides from natural sources. *Trends Biotechnol.* 26:210–217.
- BLAUSTEIN, A. R. & JOHNSON, P. T. J. (2003) The complexity of deformed amphibians. *Front. Ecol. Environ.* 1:87–94.
- BLONDELLE, S. E.; LOHNER, K. & AGUILAR, M. I. (1999) Lipid-Induced Conformation and Lipid Binding Properties of Cytolytic and Antimicrobial Peptides: Determination and Biological Specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462:89–108.
- BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H. J. (1987). Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 8:93–99.
- BRANNON-PEPPAS, L. & BLANCHETTE, J. O. (2004) Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56:1649–1659.
- BROGDEN, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology.* 3:238–250.
- BUROW, M. E. *et al.* (1998) Differences in susceptibility to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. *Cancer Reserach.* 58:4940–4946.
- CAO, W. *et al.* (2005). Expression and purification of antimicrobial peptide adenoregulin with C-amidated terminus in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification.* 40:404–410.
- CHARPENTIER, S. *et al.* (1998) Structure, synthesis, and molecular cloning of dermaseptins B, a family of skin peptide antibiotics. *J. Biol. Chem.* 273:14690–14697.
- CHEN, L. B. *et al.* (1982) Probing mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* 46:141–155.
- COMINETTI, M. R. (2007) Caracterização da atividade proteolítica de toxinas e uso de inibidores. In: SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. & SOUZA, D. H. F. (ed.), *Métodos em toxinologia: toxinas de serpentes*. São Carlos: EdUFSCar, 45–51 p.
- CONCEIÇÃO, K. *et al.* (2007) Major biological effects induced by the skin secretion of the tree frog *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Toxicon.* 49:1054–1062.

- CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J. & NOWOTNY, N. (2004) Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1696:1–14.
- CONLON, J. M. *et al.* (2005) Antimicrobial and cytotoxic properties of the frog skin peptide, kassinatuerin-1 and its L- and D-lysine-substituted derivatives. *Peptides*. 26:2104–2110.
- CONLON, J. M. *et al.* (2006) Purification and properties of laticeptin, an antimicrobial peptide from skin secretions of the South American frog *Leptodactylus laticeps*. *Protein & Peptide Letters*. 13:355–359.
- CONLON, J. M. *et al.* (2007a) Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. *Methods*. 42:349–357.
- CONLON, J. M. *et al.* (2007b) Peptide defenses of the Cascades frog *Rana cascadae*: implications for the evolutionary history of frogs of the Amerana species group. *Peptides*. 28:1268–1274.
- CRUZ-CHAMORRO, L. *et al.* (2006) In vitro biological activities of magainin alone or in combination with nisin. *Peptides*. 27:1201–1209.
- CSORDAS, A. & MICHL, H. (1970) Isolation and structure of a haemolytic polypeptide from the defensive secretion of European Bombina species. *Monatsh. Chem.* 101:182–189.
- CUNHA, R. B. *et al.* (2007) Espectrometria de massa de proteínas: o papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 40–46p.
- DALY, J. W. (2003) Amphibian skin: A remarkable source of biologically active arthropod alkaloids. *J. Med. Chem.* 46:445–452.
- DALY, J.W. *et al.* (2004) Biologically active substances from amphibians: preliminary studies on anurans from twenty-one genera of Thailand. *Toxicon*. 44:805–815.
- DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.* (1997) Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis an accidental cell death (necrosis). *Cytometry*. 27:1–20.
- DATHE, M. *et al.* (1997) Hidrofobicidade, momento hidrofóbico e ângulo subtendido por resíduos carregados modulam a atividade antibacteriana e hemolítica de peptídeos anfipáticos helicais. *FEBS Letters*. 403:208–212.

- DATHE, M. & WIEPRECHT, T (1999) Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462:71–87.
- DENNIS, E. A (1994) Diversity of groups types, regulation, and function of phospholipase A₂. *The Journal of Biol. Chemistry.* 269:13057–13060.
- DENNISON, S. R. *et al.* (2006) Anticancer α -helical peptides and structure/function relationships underpinning their interactions with tumour cell membranes. *Current Protein and Peptide Science.* 7:487–499.
- DIAZ, B. L. & ARM, J. P. (2003) Phospholipase A₂. *Prostaglan., Leukotrienes and Essent. Fatty Acids.* 69:87–97.
- DOURADO, F. S. *et al.* (2007) Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus syphax*. *Toxicon.* 50:572–580.
- DOYLE, J. *et al.* (2003) nNOS inhibition, antimicrobial and anticancer activity of the amphibian skin peptide, citropin 1.1 and synthetic modifications- The solution structure of a modified citropin 1.1. *Eur. J. Biochem.* 270:1141–1153.
- DUNN, B. M. (2001) Determination of protease mechanism. In: BEYNON, R. & BOND, J. S. (eds.) *Proteolytic enzymes*. New York: *Oxford University Press.* 77–104 p.
- DUDA JR., T. F.; VANHOYE, D. & NICOLAS, P. (2002) Roles of diversifying selection and coordinated evolution in the evolution of amphibian antimicrobial peptides. *Mol. Biol. Evol.* 19:858–864.
- EISENBERG, D. *et al.* (1982) Hydrophobic moments and protein structure. *Faraday Symp. Chem. Soc.* 17:109–120.
- ENBÄCH, J. & LAAKKONEN, P. (2007) Tumour-homing peptides: tools for targeting, imaging and destruction. *Biochemical Society Transactions.* 35:780–783.
- ERENPREISA, J. *et al.* (2000) Arrest in metaphase and anatomy of mitotic catastrophe: mild heat shock in two human osteosarcoma cell lines. *Cell Biology International.* 24:61–70.
- ERENPREISA, J. & CRAGG, M. S. (2007) Cancer: A matter of life cycle? *Cell Biology International.* 31:1507–1510.
- ERSPAMER, V. (1994) Bioactive Secretions of the Amphibian Integument. In: HEATWOLE, H.; BARTHALMUS, G. T. & HEATWOLE, Y. *Amphibian Biology*. Chipping Norton: *Surrey Beatty and Sons*, 178–350 p.

- FAN, T. P. *et al.* (2006) Angiogenesis: from plants to blood vessels. *TRENDS in Parm. Scien.* 27:297–309.
- FAVREAU, P. *et al.* (2006) Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case applications with single arthropod specimen. *Toxicon.* 47:676–687.
- FESIK, S. W. (2005) Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer.* 5:876–885.
- FONTES, W. *et al.* (1998) Improving the recovery of lysine in automated protein sequencing. *Analytical Biochemistry.* 258:259–267.
- FRESHNEY, R.I. (2000) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.* New York: *Wiley-Liss*, 600 p.
- FROST, D. R. (2007) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.1 (10 October, 2007). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. *American Museum of Natural History*, New York, USA.
- GHOSH, J. K. *et al.* (1997) Selective Cytotoxicity of Dermaseptin S3 toward Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the Underlying Molecular Basis. *The Journal of Biological Chemistry.* 272:31609–31616.
- GIANGASPERO, A.; SANDRI, L. & TOSSI, A. (2001) Amphipathic α -helical peptides. A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. *Eur. J. Biochem.* 268:5589–5600.
- GOMEZ-CAMBRONERO, J. & KEIRE, P. (1998) Phospholipase D: A novel major player in signal transduction. *Cell. Signal.* 10:387–397.
- GORDO, M. & CAMPOS, Z. M. (2005) Anuros das serras de entorno do pantanal sul. *Corumbá: Embrapa Pantanal.* 78:1517–1973.
- GUO, Z. S.; THORNE, S. H. & BARTLETT, D. L. (2008) Oncolytic virotherapy: Molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1785:217–231.
- HAIMOVICH, B. & TANAKA, J. C. (1995) Magainin-induced cytotoxicity in eukaryotic cells: kinetics, dose-response and channel characteristics. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1240:149–158.
- HANCOCK, R. E. W. & CHAPPLE, D. S. (1999) Peptides Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 43:1317–1323.

- HEDGES, S. B. & HEINICKE, M. P. (2007) Molecular phylogeny and biogeography of West Indian frogs of the genus *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44:308–314.
- HELMERHORST, E. J. *et al.* (1999) A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters*. 449:105–110.
- HEYER, R.; MIJARES, A. & BALDO, D. (2004) *Leptodactylus labyrinthicus*. In: IUCN 2007. *2007 IUCN Red List of Threatened Species*. <www.iucnredlist.org> Acessado em: 18 abr. 2008.
- HEYER, H. R. (2005) Variation and taxonomic clarification of the large species of the *Leptodactylus pentadactylus* species group (Amphibia: Leptodactylidae) from Middle America, Northern South America, and Amazonia. *Arq. Zool. S. Paulo*. 37:269–348.
- HOSKIN, D. W. & RAMAMOORTHY, A. (2008) Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*. 1778:357–375.
- HUNT, D. F. *et al.* (1986) Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:6233–6237.
- IGNEY, F. H. & KRAMMER, P. H. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*. 2:277–288.
- ISAACSON, T. *et al.* (2002) Antimicrobial peptides with atypical structure features from the skin of the Japanese brown frog *Rana japonica*. *Peptides*. 23:419–425.
- IZADPANA, A. & GALLO, R. L. (2005) Antimicrobial peptides. *J. Am. Acad. Dermatol.* 52:381–389.
- JIN, Z. & EL-DEIRY, W. S. (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*. 4:139–163.
- JUDD, R. C. (2002) SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Peptides. In: Walker, J.M. (ed.), *The Protein Protocols Handbook*. Totowa: Humana Press, 101–105 p.
- KIM, J. B.; IWAMURO, S.; KNOOP, F. C. & CONLON, J. M. (2001) Antimicrobial peptides from the skin of the Japanese mountain frog *Rana ornativentris*. *J. Pept. Res.* 58:349–356.
- KIM, S. *et al.* (2003) In vitro activities of native and designed peptide antibiotics against drug sensitive and resistant tumor cell lines. *Peptides*. 24:945–953.

- KING, J. D. *et al.* (2005) Pentadactylin: An antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 141:393–397.
- KINI, R. M. (2003) Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon*. 42:827–840.
- KRUGER, N.J. (2002) The Bradford method for protein quantification. In: Walker, J.M. (ed.), *The Protein Protocols Handbook*. Totowa: Humana Press, 747–752 p.
- LEHMANN, J. *et al.* (2006) Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. *European Urology*. 50:141–147.
- LEITE, J. R. S. A. *et al.* (2005) Phylloseptins: a novel class of antibacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides*. 26:565–573.
- LEUSCHNER, C. & HANSEL, W. (2005) Targeting breast and prostate cancers through their hormone receptors. *Biol. of Reproduction*. 73:860–865.
- LEVENSON, A. S. & JORDAN, V. C. (1997) MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research*. 57:3071–3078.
- LÓPEZ-OTÍN, C. & MATRISIAN, L. M. (2007) Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nature Reviews Cancer*. 7:800–808.
- LORIN, C. *et al.* (2005) The antimicrobial peptide Dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. *Virology*. 334:264–275.
- MACKAY, H. J. & TWELVES, C. J. (2007) Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nature Reviews Cancer*. 7:554–562.
- MANGONI, M. L. *et al.* (2001) The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms. *The FASEB J.* Apr 6, 2001, doi:10.1096/00-0695fje.
- MANGONI, M. L. *et al.* (2006) Effect of natural l- to d-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H. *Biochemistry*. 45:4266–4276.
- MANZOLI, L. *et al.* (2005) Nuclear phospholipase C: Involvement in signal transduction. *Progress in Lipid Research*. 44:185–206.
- MATSUZAKI, K. (1999) Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. et Biophys. Acta*. 1462:1–10.

- MÄRKI, F. & WITKOP, B. (1963) The venom of the Colombian arrow poison frog *Phyllobates bicolor*. *Experientia*. 19:329–338.
- MENEZES, M. C. *et al.* (2006) Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon*. 47:304–312.
- MOR, A. & NICOLAS, P. (1994) The NH₂-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* 269:1934–1939.
- MOSMANN, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65:55–63.
- MYERS, C. W. & DALY, J. W. (1983) Dart-poison frogs. *Sci. Am.* 248:120–133.
- NASCIMENTO, A. C. C.; FONTES, W.; SEBEN, A. & CASTRO, M. S. (2003) Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein and Peptide Letters*. 10:227–238.
- NASCIMENTO, A.C. *et al.* (2004) *Ocellatins*: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). *Protein J.* 23:501–508.
- NASCIMENTO, A. C. C. C. (2007) Avaliação biológica da secreção cutânea da rã *Leptodactylus ocellatus*: peptídeos citolíticos e proteases. *Tese de Doutorado em Biologia Molecular* – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.
- NASCIMENTO, A. *et al.* (2007) Purification, characterization and homology analysis of ocellatin 4, a cytolytic peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus ocellatus*. *Toxicon*. 50:1095–1104.
- NERI, D. & BICKNELL, R. (2005) Tumour vascular targeting. *Nature Cancer Reviews*. 5:436–446.
- NEURATH, H. (1999) Proteolytic enzymes, past and future. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:10962–10963.
- NICOLAS, P. & MOR, A. (1995) Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defence system of vertebrates. *Annual Rev. Microbiol.* 49:277–304.
- NIELSEN, S. L. *et al.* (2007) Structure-activity study of the antibacterial peptide fallaxin. *Protein Science*. 16:1969–1976.
- OKADA, H. & MAK, T. W. (2004) Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer*. 4:592–603.

- ONUMA, Y. *et al.* (1999) Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon*. 37:55–65.
- OREN, Z. & SHAI, Y. (1998) Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 47:451–463.
- PAPO, N. & SHAI, Y. (2003) New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. *Biochemistry*. 42:9346–9354.
- PAPO, N. & SHAI, Y. (2004) Effect of drastic sequence alteration and D-amino acid incorporation on the membrane binding behavior of lytic peptides. *Biochemistry*. 43:6393–6403.
- PAPO, N. & SHAI, Y. (2005) Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:784–790.
- PERES, C. M. & CURI, R. (2005) *Como cultivar células*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 283 p.
- PONTI, D. *et al.* (2003) An amphibian antimicrobial peptide variant expressed in *Nicotiana tabacum* confers resistance to phytopathogens. *Biochem. J.* 370:121–127.
- POWERS, J. P. & HANCOCK, R. E. (2003) The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*. 24:1681–1691.
- PRICE III, J. A. (2007) A colorimetric assay for measuring phospholipase A₂ degradation of phosphatidylcholine at physiological pH. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 70:441–444.
- PUENTE, X. S. *et al.* (2003) Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Gen.* 4:544–558.
- PUKALA, T. L. *et al.* (2006) Host-defense peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. *Nat. Prod. Rep.* 23:368–393.
- RACHOWICZ, L. J. *et al.* (2005) The novel and endemic pathogen hypotheses: competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. *Conservation Biology*. 19:1441–1448.
- RAWLINGS, N. D. & BARRETT, A. J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290:205–218.
- RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P. & BARRETT, A. J. (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 378:705–716.

- RAWLINGS, N.D., MORTON, F.R., KOK, C.Y., KONG, J. & BARRETT, A.J. (2008) *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **36**:320–325.
- RAWLINGS, N. D. & MORTON, F. R. (2008) The *MEROPS* batch BLAST: a tool to detect peptidases and their non-peptidase homologues in a genome. *Biochimie.* **90**:243–259.
- REDDY, K. V. R.; SHAHANI, S. H. & MEHERJI, P. K. (1996) Spermicidal activity of magainins: in vitro and in vivo studies. *Contraception.* **53**:205–210.
- REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D. & ARANHA, C. (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents.* **24**:536–547.
- RESNICK, N.; MALOY, W.; CRUT, H. & ZASLOFF, M. (1991) A novel endopeptidase from *Xenopus* that recognises α -helical structure. *Cell.* **66**:541–554.
- RINALDI, A. C. (2002) Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. *Current Opinion in Chemical Biology.* **6**:799–804.
- RISSO, A.; ZANETTI, M. & GENNARO, B. (1998) Cytotoxicity and apoptosis mediated by two peptides of innate immunity. *Cellular Immunology.* **189**:107–115.
- RODRIGUES, R. B. & FERREIRA, V. L. (2004) Dieta de *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824) (Amphibia– Leptodactylidae) do Morro Santa Cruz, Corumbá–MS. In: *IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal, Corumbá–MS.*
- RODRIGUES, E. G. *et al.* (2008) Effective topical treatment of subcutaneous murine B16F10-Nex2 melanoma by the antimicrobial peptide gomesin. *Neoplasia.* **10**:61–68.
- ROLLINS-SMITH, L. A. *et al.* (2005) An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura: Leptodactylidae). *Regulatory Peptides.* **124**:173–178.
- ROOS, W. P. & KAINA, B. (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *TRENDS in Molecular Medicine.* **12**:440–450.
- SAH, H. & KIM, K. S. (2006) Improvement of interfacial protein stability by CHAPS. *Biothechnology Letters.* **28**:567–570.
- SAI, K. P. *et al.* (2001) Tigerins: novel antimicrobial peptides from the Indian frog *Rana tigerina*. *J. Biol. Chem.* **276**:2701–2707.
- SANTOS, K. C. (2007) Análise proteômica comparativa entre neutrófilos não ativados e neutrófilos ativados com PMA, um análogo do diacilglicerol. *Dissertação de*

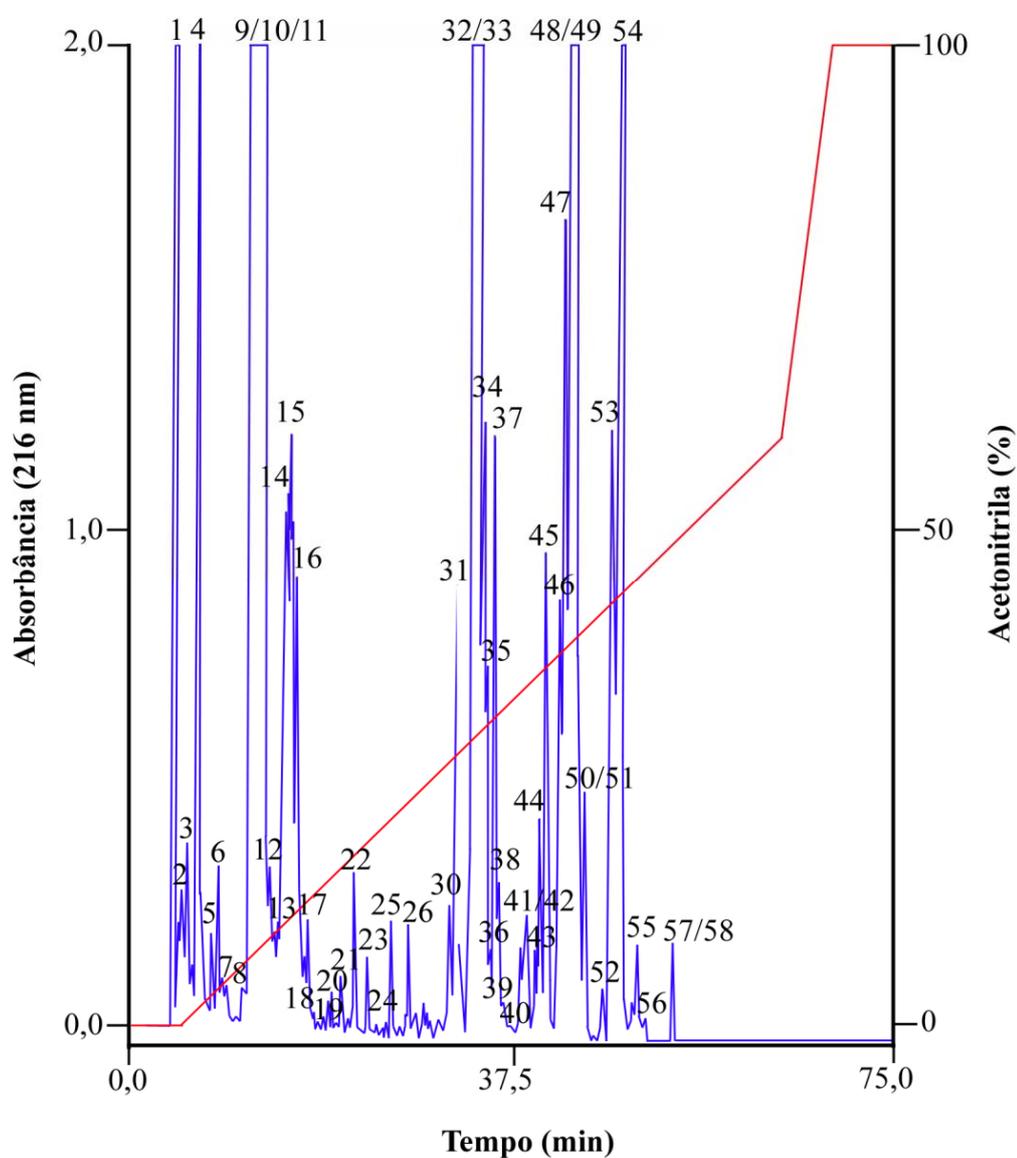
Mestrado em Patologia Molecular – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.

- SATO, H. & FEIX, J. B. (2006) Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758:1245–1256.
- SCHRÖDER, J. M. (1999) Epithelial Peptide Antibiotics. *Biochemical Pharmacology*. 57:121–134.
- SCHIFFER, M. & EDMUNDSON, A. B. (1967) Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J*. 7:121–135.
- SCHWARTZ, C. A. *et al.* (2007) Princípios bioativos da pele de anfíbios: panorama atual e perspectivas. In: NASCIMENTO, L. B. & OLIVEIRA, M. E. (eds) *Herpetologia no Brasil II*. Belo Horizonte: Soc. Bras. Herpetologia, 354 p.
- SHADIDI, M. & SIOUD, M. (2003) Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides. *Drug Res. Updates*. 6:363–371.
- SHAI, Y. (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1462:55–70.
- SHALEV, D. E.; MOR, A. & KUSTANOVICH, I. (2002) Structural Consequences of Carboxyamidation of Dermaseptin S3. *Biochemistry*. 41:7312–7317.
- SHARMA, S. V. (1992) Melittin resistance: a counterselection for ras transformation. *Oncogene*. 7:193–201.
- SHEPARD, D. B. & CALDWELL, J. P. (2005) From foam to free-living: ecology of larval *Leptodactylus labyrinthicus*. *Copeia*. 4:803–811.
- SITARAM, N. & NAGARAJ, R. (1999) Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1462:29–54.
- SIX, D. A. & DENNIS, E. A. (2000) The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1488:1–19.
- SOUSA, M. M. L. (2003) Análise proteômica da peçonha de *Cerodirphia speciosa* (Lepidoptera, Saturniidae). *Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular* – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.

- SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F. & LINE, S. R. P. (2001) Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. *Biomaterials*. 22:2025–2030.
- SWOFFORD, D.L., BEGLE, D.P. (1993) PAUP – Phylogenetic Analysis Using Parsimony – User’s Manual. Washington: *Smithsonian Institution*.
- TAKESHIMA, K. *et al.* (2003) Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 278:1310–1315.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
- THORBERRY, N. A. *et al.* (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme b: functional relationships established for key mediators of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 17907–17911.
- TOLEDO, R. C. & JARED, C. (1995) Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 111:1–29.
- TOZER, G. M.; KANTHOU, C. & BAGULEY, B. C. (2005) Disrupting tumour blood vessels. *Nature Reviews Cancer*. 5:423–435.
- VANCOMPERNOLLE, S. E. *et al.* (2005) Antimicrobial peptides from amphibian skin potently inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells. *J. Virol.* 79:11598–11606.
- VANHOYE, D. *et al.* (2003) Antimicrobial peptides from hylid and ranid frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *Eur. J. Biochem.* 270:2068–2081.
- WIEPRECHT, T. (1997) Modulation of membrane activity of amphipatic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. *FEBS Letters*. 417:135–140.
- WINDER, D. *et al.* (1998) Expression of antimicrobial peptide has an antitumor effect in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242:608–612.
- YEAMAN, M. R. & YOUNT, N. Y. (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55:27–55.

- YEDGAR, S.; COHEN, Y. & SHOSEYOV, D. (2006) Control of phospholipase A₂ activities for the treatment of inflammatory conditions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1761:1373–1382.
- YIP, D. *et al.* (1999) Matrix metalloproteinase inhibitors: applications in oncology. *Investigational New Drugs*. 17:387–399.
- ZAFFARONI, N. *et al.* (2001) Cell growth inhibition, G2M cell cycle arrest and apoptosis induced by the imidazoacridinone C1311 in human tumour cell lines. *European Journal of Cancer*. 37:1953–1962.
- ZAIRI, A. *et al.* (2005) Spermicidal activity of dermaseptins. *Contraception*. 72:447–453.
- ZASLOFF, M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:5449–5453.
- ZASLOFF, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 415:389–395.
- ZELEZETSKY, I. *et al.* (2005) Controlled alteration of the shape and conformational stability of α -helical cell-lytic peptides: effect on mode of action and cell specificity. *Biochem. J.* 390:177–188.
- ZHENG, H. *et al.* (2005) A computational approach for peptidomic analysis in taxonomic study of amphibian species. *IEE Transactions on Nanobioscience*. 4:241–247.
- ZHU, Q.; DONG, B. R.; Uttamchandani, M. & YAO, S. Q. (2003) Facile synthesis of 7-Amino-4-carbamoylmethylcoumarin (ACC)-containing solid supports and their corresponding fluorogenic protease substrates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 13:1033–1036.
- ZHU, Z. & WITTE, L. (1999) Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor. *Investigational New Drugs*. 17:195–212.
- ZINA, J. & HADDAD, C. F. B. (2005) Reproductive activity and vocalizations of *Leptodactylus labyrinthicus* (Anura: Leptodactylidae) in southeastern Brazil. *Biota Neotropica*. 5:1–11.

ANEXOS



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

Anexo 2. Tabela com as massas moleculares $[M+H]^+$ dos peptídeos observados nas frações obtidas por RP-HPLC em coluna C_{18} (Vydac 218TP54). Todas as frações foram plaqueadas com matriz HCCA e AS antes de serem analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF nas faixas m/z 500–4000 Da e 4–20 kDa.

Fração	Massa molecular $[M + H]^+$					
1	530,079	560,005	772,766			
2	509,199	525,173	711,209			
4	917,127					
10	537,195	557,372	765,221	1.745,456	1.751,352	
11	598,042	614,168	634,151	650,135	656,129	765,255
	825,169	845,127	879,053	891,000		
12	862,325	880,337	977,328	995,366	1.009,363	1.124,389
	1.239,401					
13	890,980	1.124,495	1.239,546	1.368,499		
14	636,202	1.497,452	5590,358			
15	956,290	981,267	1.054,599	1.382,387	1.479,358	1.497,542
	1.553,422					
16	1.461,456	14.79,479	1.501,487			
18	1.461,605	1.479,550	2.284,063			
19	1.461,746					
20	785,276					
22	670,201	818,598	834,600			
23	624,095	833,542	891,032	1.254,861	5.835,737	7.041,452
24	506,379	624,276	1.255,218			
25	506,210	711,410	751,350	767,349	891,011	917,474
	1.018,850	1.024,700				
26	1.148,427					

27	623,983 4.592,452	890,895 5.053,202	1.017,549 5.203,752	1.101,999	4.093,377	4.576,338
28	550,683 4.589,558	891,002 5.053,154	1.033,460 5.203,752	1.196,743	4.073,489	4.571,798
29	917,397 5.203,752	1.310,609	4.073,489	4.571,798	4.589,558	5.053,154
30	601,341 1.180,832 1.826,012	619,265 1.259,053 1.842,361	633,939 1.272,817 4.428,115	676,266 1.294,458 4.558,192	795,449 1.310,832	1.043,079 1.564,256
31	619,273 1.563,898	623,996 1.688,054	676,290 1.825,985	795,445 1.938,175	890,909 2.086,039	1.294,508
32	591,264 862,362 1.272,401 1.482,713	611,393 925,486 1.294,536 1.563,960	640,353 1.032,681 1.310,506 1.587,797	661,566 1.081,609 1.328,441	676,326 1.104,599 1.334,500	755,289 1.258,626 1.377,630
33	658,374 998,310 1.199,781 1.334,584 1.546,086 1.938,226	676,384 1.090,847 1.249,558 1.354,712 1.564,093 1.963,300	734,387 1.104,717 1.272,620 1.377,694 1.585,032 2.178,720	755,474 1.144,503 1.294,612 1.456,918 1.698,105 4.165,335	862,442 1.166,553 1.310,621 1.482,828 1.784,286 4.179,920	918,470 1.182,559 1.328,585 1.496,040 1.823,200
34	619,326 1.272,528 8.029,962	676,349 1.294,590 8.101,209	862,392 1.310,537 8.156,505	891,011 6.266,710 9.379,169	1.166,492 6.804,843 9.507,558	1.182,455 7.616,806
35	825,092 1.543,063 9.386,262	1.166,665 6.268,642	1.182,569 6.809,626	1.276,726 7.112,554	1.294,708 8.034,064	1.310,606 8.143,283
36	1.276,511 1.748,086	1.292,572 1.938,232	1.359,830 2.259,322	1.455,959 4.119,382	1.512,917 6.807,864	1.563,995 7.106,894
37	1.563,990	1.765,967	2.177,454	7.109,981		
38	672,213	1.101,582	1.299,704	1.938,130	6.345,215	
39	695,330 852,560 6.345,458	703,546 2.009,082 7.103,293	719,276 2.025,118 7.145,530	760,574 4.089,863	794,535 6.148,911	818,642 6.208,632

40	1.954,325	2.009,198	2.025,215	7.099,950		
41	825,190	1.578,101	1.938,329	4.274,349	7.085,560	7.145,014
42	1.923,374	1.938,219	6.367,839	7.146,562		
43	1.500,967	1.655,051	1.688,001	1.712,077	1.727,128	1.769,280
	1.783,156	1.814,125	1.938,311	1.963,358	1.984,368	4.036,959
	5.009,915	6.229,808	7.126,714	7.144,241		
44	930,625	966,716	1.421,995	1.479,005	1.500,864	1.654,959
	1.748,061	1.835,125	1.954,444	1.968,244	4.383,962	4.463,923
	4.715,680	4.926,255	5.012,291	5.104,084	6.154,894	6.212,961
	6.316,809	6.352,022	6.367,595			
45	894,639	908,523	964,543	1.020,463	1.969,333	4.365,597
	5.742,644	6.367,108				
46	634,109	825,096	845,049	930,677	1.592,034	4.446,408
	5.103,866					
47	634,107	825,048	845,005	930,560	1.033,988	1.520,817
	1.592,104	1.613,739	2.193,014	2.209,440	4.073,294	4.442,949
	5.003,438	5.210,798	5.228,654	5.736,172		
48	1.536,008	2.547,587	2.563,619	4.703,116	5.066,224	5.211,899
	5.441,933	5.648,921	5.738,902			
49	1.307,746	1.364,766	1.421,779	2.172,107	2.188,116	2.547,274
	2.563,317	4.703,116	5.066,224	5.211,899	5.441,933	5.648,921
	5.738,902					
50	1.251,048	1.649,044	1.670,676	1.726,720	2.004,776	2.547,973
	4.703,116	4.978,863	5.066,224	5.093,844	5.211,899	5.441,933
	5.648,921	5.738,902				
51	1.043,545	1.100,501	1.157,517	1.214,524	1.556,552	1.577,786
	1.626,576	1.670,627	1.686,664	4.892,049	4.948,552	5.287,951
	5.654,426					
52	1.817,624	2.103,780	2.511,007	2.527,885	2.532,979	4.110,965
	4.232,360	4.901,657	5.304,828			
53	1.761,706	1.805,701	2.541,460	5.284,180	5.560,746	
54	1.761,705	5.085,789	5.286,176	5.562,794		

55	1.761,985	1.932,085	5.084,702	7.652,799	15.282,877	
56	509,591	634,160	668,044	825,087	878,955	890,864
	5.084,702	7.652,799	15.282,877			
57	959,105	5.083,007	7.558,334	15.100,478		
58	2.601,044	2.617,093	4.298,320			
