



**Universidade de Brasília**

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

**Caracterização química e biológica de peptídeos  
antimicrobianos presentes na secreção cutânea dos anuros  
*Pithecopus rohdei* e *Lithobates palmipes***

**WELTHON DE SOUZA TEOTONIO**

**Brasília – DF**

**2024**



**Universidade de Brasília**

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

**Caracterização química e biológica de peptídeos  
antimicrobianos presentes na secreção cutânea dos anuros  
*Pithecopus rohdei* e *Lithobates palmipes***

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

Autor: Welthon de Souza Teotonio  
Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

**Brasília – DF**

**2024**



**Universidade de Brasília**

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

**WELTHON DE SOUZA TEOTONIO**

**Caracterização química e biológica de peptídeos  
antimicrobianos presentes na secreção cutânea dos anuros**

*Pithecopus rohdei e Lithobates palmipes*

**Comissão Examinadora:**

**Profa. Dra. Mariana S. Castro**

**Presidente**

**Universidade de Brasília**

**Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende**

**Membro Titular**

**Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Marlon Henrique Cardoso**

**Membro Titular**

**S-inova Biotec - Universidade Católica Dom Bosco**

**INBIO - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

## **Apoio Financeiro**

A dissertação de mestrado intitulada “Caracterização química e biológica de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea dos anuros *Pithecopus rohdei* e *Lithobates palmipes*” foi desenvolvida por Welthon de Souza Teotonio, sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro, teve o apoio financeiro do CNPq, da FAPDF, da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus pelo dom da vida.

Agradeço à minha família pelo suporte e amor.

À Profa. Dra. Mariana S. Castro pela oportunidade e acolhimento como aluno e pelo suporte ao longo deste processo.

Ao Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior pelo apoio e colaboração.

Ao Prof. Dr. Wagner Fontes pelo apoio e pela colaboração.

Ao Dr. Carlos José Correia de Santana pelo apoio, colaboração e suporte durante todo esse período de aprendizado, no auxílio nos experimentos e ensaios e pela paciência.

Ao Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão e às pesquisadoras Dra. Géssica Gomes Barbosa e Dra. Tulíbia Laurindo Silva pela colaboração nos estudos relacionados com o peptídeo ranateurina-2PMe.

À MSc. Gabriela Zeidan pela colaboração relacionada com a coleta do material biológico para desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas de trabalho Brunna, Natanael, Joyce, Gabriel, João e Leonardo pelo apoio, suporte e por todo o auxílio e amizade.

Aos técnicos do laboratório Jaques, Nuno e Adolfo pela ajuda e suporte técnico durante as análises por espectrometria de massas.

A todos os membros do LBQP que contribuíram de forma direta ou indiretamente para o desenvolvimento desta pesquisa.

À CAPES, pelo auxílio financeiro por concessão de bolsa de estudos.

## Resumo

O surgimento de microrganismos com resistência antimicrobiana tem crescido em todo o planeta. Uma das principais causas desse fenômeno é o uso indiscriminado dos antibióticos. Diante da ameaça da emergência de bactérias multirresistentes, a busca por novas formas terapêuticas tornou-se premente. A secreção cutânea de anuros tem se revelado uma fonte riquíssima de moléculas com propriedades farmacológicas, dentre elas os peptídeos antimicrobianos, que se destacam como uma alternativa relevante para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas. No presente trabalho, foram coletados 11 espécimes do anuro *Pithecopus rohdei*, cuja secreção cutânea foi obtida por meio de estimulação elétrica de baixa intensidade e a secreção da pele foi coletada com água Milli-Q, liofilizada e armazenada a -20 °C. Alíquotas de 15 mg da secreção cutânea liofilizada foram resuspendidas em 1 mL de TFA 0,1% em água Milli-Q. Após centrifugação, 200 µL do sobrenadante foram submetidos a RP-HPLC usando coluna C<sub>18</sub>, resultando na eluição de 20 frações cromatográficas. Tais frações foram manualmente coletadas, secas a vácuo e testadas para verificar sua atividade antimicrobiana, com diversas frações mostrando-se ativas contra bactérias patogênicas. As frações com atividade antimicrobiana foram analisadas por espectrometria de massas. Dentre elas, 4 frações (10, 14, 15 e 19) exibiram componentes com massas moleculares inéditas: 3061,567 Da; 2848,367 Da; 2849,389 Da e 1970,22 Da, respectivamente. Essas frações mostraram-se homogêneas e foram submetidas ao sequenciamento químico por degradação de Edman e, em seguida, a análises de similaridade permitindo identificar uma nova filoseptina e três novas dermaseptinas presentes nessa secreção cutânea. Também foi caracterizado no presente estudo uma nova ranateurina isolada da secreção cutânea do anuro *Lithobates palmipes*. Este estudo teve o objetivo de avançar na caracterização química e biológica do arsenal de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção da pele dos anuros *P. rohdei* e *L. palmipes*.

**PALAVRAS-CHAVES:** Anuros; *Lithobates palmipes*; *Pithecopus rohdei*; Peptídeos antimicrobianos; Propriedades biológicas; Potencial terapêutico.

## Abstract

The emergence of microorganisms with antimicrobial resistance is growing throughout the planet. One of the main causes of this phenomenon is the indiscriminate use of antibiotics. In the face of the emergence of multi-resistant bacteria, the search for new therapeutic agents is pressing again. The skin secretion of anurans has revealed a very rich source of molecules with pharmacological properties, among which are antimicrobial peptides, which stand out as a relevant alternative for the development of new antimicrobial drugs. In the present study, 11 specimens of the anuran *Pithecopus rohdei*, whose skin secretion was obtained by means of low-intensity electrical stimulation and this skin secretion was collected with Milli-Q water, freeze-dried and stored at -20 °C. Aliquots of 15 mg of freeze-dried skin secretion resuspended in 1 mL of TFA 0.1% in Milli-Q water. After centrifugation, aliquots of 200 µL of the supernatant were submitted to RP-HPLC using a C<sub>18</sub> column, resulting in elution of 20 chromatographic fractions. These fractions were manually collected, vacuum dried and tested to verify their antimicrobial activity, with several fractions showing inhibitory activity against pathogenic bacteria. The fractions with antimicrobial activity were analyzed by mass spectrometry. Four fractions (10, 14, 15 and 19) exhibited components with molecular masses of: 3061.567 Da; 2848.367 Da; 2849.389 Da and 1970.22 Da, respectively. These fractions were shown to be homogeneous and subjected to chemical sequencing by Edman degradation and, subsequently, to similar analyzes allowing the identification of one new phylloseptin and three new dermaseptins present in this skin secretion. It was also characterized in the present study a new ranatuerin isolated from the skin secretion of the anuran *Lithobates palmipes*. The aim of the present study was advancing in the chemical and biological characterization of the arsenal of antimicrobial peptides present in the skin secretion of the anurans *P. rohdei* and *L. palmipes*.

**KEYWORDS:** Anuros; *Lithobates palmipes*; *Pithecopus rohdei*; Antimicrobial peptides; Biological properties; Therapeutic potential.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Novos agentes antimicrobianos aprovados nos EUA.	4
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de compartilhamento de genes de resistência antimicrobianos.	9
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de resistência bacteriana.	11
<b>Figura 4.</b> Interação dos PAMs catiônicos com as membranas de animais multicelulares (A) e bactérias (B).	12
<b>Figura 5.</b> Estruturas comumente encontradas nos peptídeos antimicrobianos.	13
<b>Figura 6.</b> Modelo <i>barrel-stave</i> .	13
<b>Figura 7.</b> Modelo poro toroidal.	14
<b>Figura 8.</b> Modelo <i>carpet-like</i> .	14
<b>Figura 9.</b> Modelo Sai-Matzusaki-Huang.	15
<b>Figura 10.</b> Anatomia da pele de anfíbio.	16
<b>Figura 11.</b> Espécime adulto de <i>Pithecopus rohdei</i> .	22
<b>Figura 12.</b> Espécime adulto de <i>Lithobates palmipes</i> .	24
<b>Figura 13.</b> Área de distribuição de <i>Lithobates palmipes</i> na América do Sul.	25
<b>Figuras apresentadas no artigo: Characterization of antimicrobial peptides present in the skin secretion of the anurans <i>Pithecopus rohdei</i> and <i>Lithobates palmipes</i></b>	
<b>Figura 1.</b> Perfil cromatográfico do fracionamento da secreção da pele do anuro <i>Pithecopus rohdei</i> .	31
<b>Figura 2.</b> Espectro de massas da fração 10 obtida em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico).	32
<b>Figura 3.</b> Espectro de massas da fração 14 obtida em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico).	32
<b>Figura 4.</b> Espectro de massas da fração 15 obtida em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico).	33
<b>Figura 5.</b> Espectro de massas da fração 19 obtida em equipamento Sicex Triple TOF 5600 LC-MS/MS.	33
<b>Figura 6.</b> Alinhamento múltiplo do peptídeo filoseptina 1-PR isolado de <i>Pithecopus rohdei</i> com os peptídeos com maior similaridade: filoseptinas H8 e H9 de <i>Pithecopus hypochondrialis</i> e filoseptina Az4 de <i>Pithecopus azureus</i> .	34

- Figura 7.** Alinhamento múltiplo entre o peptídeo isolado a partir da fração 10 resultante do fracionamento cromatográfico da secreção cutânea do anuro *Pithecopus rohdei* com a dermaseptina 1-PR previamente isolada por SANTOS (2023) e outras dermaseptinas identificadas em buscas por similaridade. 34
- Figura 8.** Alinhamento múltiplo dos peptídeos da família das dermaseptinas identificadas na secreção cutânea do anuro *Pithecopus rohdei*. 35
- Figura 9.** Alinhamento múltiplo entre o peptídeo isolado a partir da fração 14 de resultante do fracionamento cromatográfico da secreção cutânea do anuro *Pithecopus rohdei* com outras dermaseptinas identificadas em buscas por similaridade. 35
- Figura 10.** Alinhamento múltiplo entre o peptídeo isolado a partir da fração 15 de resultante do fracionamento cromatográfico da secreção cutânea do anuro *Pithecopus rohdei* com outras dermaseptinas identificadas em buscas por similaridade. 35
- Figura 11.** Alinhamento múltiplo da ranateurina-2PMe (identificada na figura como fração 19) isolada da secreção cutânea de *L. palmipes* com outros dois peptídeos antimicrobianos descritos por Mechkarska *et al.* (2023). 35
- Figura 12.** Projeções em roda helicoidal (Schiffer Edmundons das frações 10, 14,15 e 19 do anuro *Pithecopus rohdei* e do peptídeo ranateurina-2PMe do anuro *Lithobates palmipes*. 36
- Figura 13.** Modelo tridimensional teórico das frações 10, 14,15 e 19 do anuro *Pithecopus rohdei* e do peptídeo ranateurina-2PMe do anuro *Lithobates palmipes*. 36
- Figura 14.** Atividade antimicrobiana do peptídeo ranateurina-2PMe sobre a bactéria patogênica *Acinetobacter baumannii* multirresistente. 37
- Figura 15.** Atividade antimicrobiana do peptídeo ranateurina-2PMe sobre a bactéria patogênica *Escherichia coli* ATCC 25922. 37
- Figura 16.** Atividade antimicrobiana do peptídeo ranateurina-2PMe sobre a bactéria patogênica *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. 37
- Figura 17.** Atividade antimicrobiana do peptídeo ranateurina-2PMe sobre a bactéria patogênica *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. 37
- Figura 18.** Atividade antimicrobiana do peptídeo ranateurina-2PMe sobre a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. 38
- Figura 19.** Atividade antimicrobiana do peptídeo ranateurina-2PMe sobre a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. 38
- Figura 20.** Atividade hemolítica do peptídeo ranateurina-2PMe sobre eritrócitos humanos. 38
- Figura 21.** Atividade antiproliferativa do peptídeo ranateurina-2PMe sobre linhagem celular tumoral HeLa e sobre a linhagem celular não-tumoral HaCat. 39

## Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Peptídeos descritos para a espécie de anuro *Pithecopus rohdei*. 23

**Tabelas apresentadas no artigo: Characterization of antimicrobial peptides present in the skin secretion of the anurans *Pithecopus rohdei* and *Lithobates palmipes***

**Tabela 1.** Estruturas primárias e massas moleculares dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* identificados no presente trabalho. 34

**Tabela 2.** Parâmetros físico-químicos dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* e *L. palmipes*. 36

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana (CIM,  $\mu\text{M}$ ) do peptídeo ranateurina-2PMe 38

## Lista de Siglas e Abreviações

**μL** - microlitro

**μM** - Micromolar

**ACN** - Acetonitrila

**ADN** - Ácido desoxirribonucleico

**APD** - Antimicrobial Peptide Database

**ATCC** - Coleção Americana de Culturas Típicas (Do inglês, *American Type Culture Collection*)

**AVP** – Peptídeos Antivirais

**BDPA** - Base de dados de peptídeos antimicrobianos (Do inglês, *Antimicrobial Peptide Database - APD*)

**CIM** - Concentração Inibitória Mínima

**Da** - Dalton

**EDR** - Extensivamente resistentes a medicamentos

**ESKAPE** - *Enterobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecium*

**EUA** - Estados Unidos da América

**FDA** - Food and Drug Administration

**HPD** – Peptídeos de defesa do hospedeiro

**IACS** - Infecções Associadas à Assistência à Saúde

**IHA** - Infecções Hospitalares Adquiridas

**IUCN** - União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais

**KPRC** - *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos

**LC-MS** - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (Do inglês, *Liquid chromatography–mass spectrometry*)

**MALDI-TOF** - Dessorção/ionização a laser assistida por matriz, espectrometria de massa de tempo de voo (Do inglês, *Matrix Associated Laser Desorption Ionization - Time of Flight*)

**MDR** - Multidroga resistente

**MIC** - Concentração Inibitória Mínima

**Min** - Minuto

**MS** - Espectrometria de massas

**Nm** - Nanômetro

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**PAM** – Peptídeo Antimicrobiano

**PAMP** – Padrões moleculares associados ao patógeno (Do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*)

**RAM** - Resistência Antimicrobiana

**RP-HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

**SARM** - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

**SARS-CoV-2** - Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave

**SDS** - Dodecil sulfato de sódio

**TFA** - Ácido trifluoroacético

**µm** - Micrômetro

**UTI** - Unidade de Tratamento Intensivo

**VISA** - Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*

## Índice

1. Introdução	1
1.1. Resistência antimicrobiana	1
1.2. Grupo ESKAPE	4
1.3. Peptídeos antimicrobianos	11
1.4. Anuros	15
1.5. Peptídeos antimicrobianos de anuros	16
1.6. Atividade biológica dos PAMs	18
1.7 <i>Pithecopus rohdei</i>	21
1.8 <i>Lithobates palmipes</i>	24
2. Justificativa	25
3. Objetivo Geral e Metas Estabelecidas	26
4. Resultados e Discussão	27
5. Perspectivas Futuras	44
6. Referências Bibliográficas	44

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana (RAM) é a capacidade de microrganismos exibirem resistência a antibióticos, seja pelo uso de doses abaixo do terapeuticamente recomendado ou pela exposição frequente a determinado antibiótico, onde a seleção natural atuará sobre esses microrganismos, selecionando os mais resistentes a tais drogas (JOLIVET-GOUGEON; BONNAURE-MALLET, 2014; PRESTINACI, 2015; MARSTON *et al*, 2016; MORRISON e ZEMBOWER, 2020). Os locais mais propícios para a seleção de microrganismos resistentes são hospitais, ambientes de agropecuária e agricultura, comunidade e meio ambiente (PRESTINACI, 2015).

O primeiro antibiótico, a penicilina, foi descoberto por Alexander Fleming em 1928, sendo utilizada para tratar infecções bacterianas (LOPES *et al*, 2022). Antes da comercialização e uso da penicilina, ainda em 1940 já havia sido descrita a primeira linhagem resistente a penicilina. Em 1959, passou a ser utilizada a meticilina contra penicilinasas e, em 1960, foi reportado espécimes de *Staphylococcus* resistente a meticilina. A vancomicina foi introduzida em 1958 contra linhagens resistentes à meticilina e, em 1979, foi isolada uma variedade resistente à vancomicina. Anos depois foi reportado resistência a vancomicina em *Enterococci* e, finalmente, em 1997, foi reportada uma variedade de *S. aureus* menos suscetível (vancomycin-intermediate *S. aureus*, VISA) no Japão (CHRISTAKI *et al*, 2020).

Com relação a outros antibióticos, em 1950, a tetraciclina foi introduzida e, em 1959, foi isolada uma variedade de *Shigella* resistente à tetraciclina. Em 1996, foi introduzida a levofloxacina e, no mesmo ano, foi identificado *Pneumococcus* resistente a levofloxacina (CHRISTAKI *et al*, 2020).

A emergência de resistência a antibióticos ocorre de duas formas: intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é um fenômeno que ocorre naturalmente, independente da exposição ao antibiótico previamente e, é comumente encontrada no genoma bacteriano (FRANÇA, 2017; SILVA *et al*, 2017). Pode se dar por falta de permeabilidade da membrana, expressão de bombas de efluxo não específicas ou até pela falta de alvos intracelulares para os quais os antibióticos se ligam para desempenharem sua função. A resistência antibiótica adquirida pode ser obtida pela prévia exposição a antibióticos de forma indiscriminada, ocorrendo de 2 modos, seja por mutação no DNA ou por aquisição de material genético extracelular (MORRISON e ZEMBOWER, 2020).

Dentre os mecanismos de resistência antimicrobiana, há a diminuição da permeabilidade da membrana. As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana e uma parede celular, uma interna e a outra externa, respectivamente, sendo que esta última, confere permeabilidade para antibióticos. Na parede celular há porinas, que são a via para a entrada de antibióticos hidrofílicos. A redução da expressão de porinas, é uma forma de resistir aos medicamentos antibióticos. Esse tipo de resistência é considerado de nível baixo, porém é comum bactérias apresentarem, além de mutação na expressão de porinas, um outro tipo de mecanismo. O efeito de resistência combinado, como bomba de efluxo ou enzimas degradadoras, resultam em um alto nível de resistência (CHRISTAKI et al, 2020).

Segundo estimativa de Murray *et al* (2022), o surgimento da RAM é uma questão séria de saúde pública e de grande importância e relevância como doenças como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a malária, podendo inclusive ser maior do que estas. Um grande desafio é ter conhecimento da carga global da RAM em locais onde são carecidos de vigilância e os dados são dispersos (MURRAY *et al.*, 2022).

A principal barreira enfrentada pelas grandes empresas farmacêuticas no desenvolvimento de agentes antimicrobianos é a grande quantidade de investimentos, que varia de 400 a 800 milhões de dólares. Outro desafio é o tempo necessário, em média 8 anos desde a fase I de testes clínicos até o lançamento comercial do produto (SPELLBERG, 2004; SILVA *et al*, 2017).

Em 2019, as infecções bacterianas tornaram-se a 2ª maior causa de mortes em todo o mundo. Com 33 infecções bacterianas causadas por diferentes microrganismos, sendo que apenas 5 destes foram responsáveis por mais da metade das mortes. Os 5 patógenos que mais causaram mortes foram: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (MURRAY *et al*, 2022).

Em 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentou um relatório mostrando que, se não fosse combatida, as taxas de mortes causadas por RAM poderão aumentar para 10 milhões de mortes por ano até 2050 (O'NEILL, 2014, 2016; CHRISTAKI *et al*, 2020; MURRAY *et al*, 2022; BAKER *et al*, 2023), superando as taxas de mortes causadas por diabetes, doenças cardíacas e câncer (MORRISON e ZEMBOWER, 2020).

Um estudo realizado em 2019, mostrou que mais de 1,2 milhões de pessoas morreram em todo o mundo em decorrência de infecções causadas por microrganismos resistentes. E ainda mais 4,9 milhões de mortes associadas com RAM (BRUM, 2022; BAKER *et al*, 2023).

Dados publicados em 2019 mostraram que, nos EUA, 2,8 milhões de pessoas contraem infecções por microrganismos resistentes (DA ROCHA SANTOS *et al*, 2023), resultando em 35.000 mortes e um número ainda maior de hospitalizações, acarretando custos de saúde

associados com as infecções estimados em 28 a 45 bilhões de dólares por ano (MORRISON e ZEMBOWER, 2020).

No Brasil, um país de dimensões continentais, a RAM é um dos grandes desafios do século XXI. Além do Brasil, outros países da América Latina possuem grandes taxas de resistência antimicrobiana aos patógenos de maior importância médica, em comparação com Estados Unidos da América (EUA) e Europa (ROSSI, 2011). O Brasil formalizou um plano de ação e controle à RAM somente em 2018, e ainda há carência de dados nacionais sobre as taxas de RAM no país (BRASIL, 2019; CÔRREA *et al*, 2022).

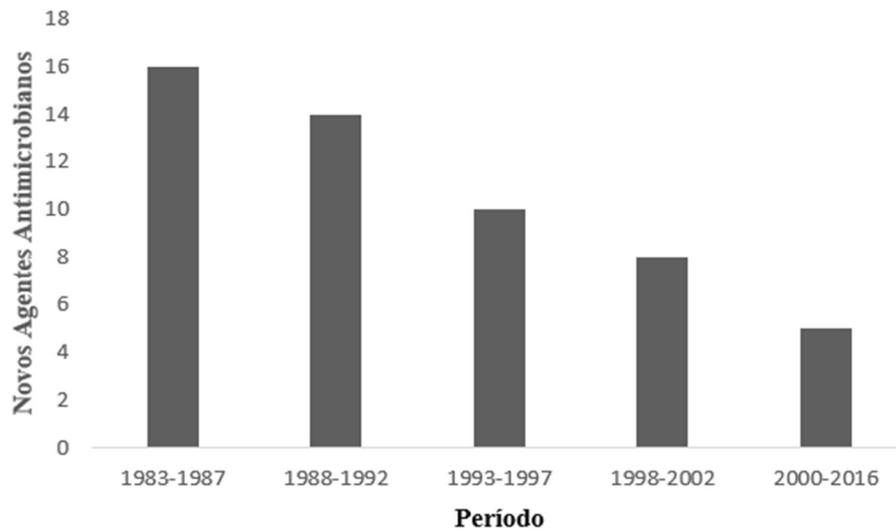
Ao analisar os programas de desenvolvimento de drogas das sete maiores companhias de biotecnologia do mundo, observa-se que de um total de 88 medicamentos que foram divulgados oficialmente como em desenvolvimento, apenas 1 (1,1%) corresponde a um novo agente antimicrobiano (SPELLBERG, 2004).

Entre as décadas de 60 e 80, a produção de medicamentos antibióticos foi relativamente adequada à necessidade da época. No entanto, após a década de 80, houve uma acentuada queda na produção desses medicamentos, até os dias atuais, devido ao surgimento e dispersão de novas variedades de bactérias resistentes em todo o mundo (CHRISTAKI *et al*, 2020; MILLER e ARIAS, 2024).

O número de novos agentes antimicrobianos em desenvolvimento caiu 56% de 1998 até 2002, em comparação com o período de 1983 até 1987 nos EUA.

Dos 9 agentes antibacterianos aprovados desde 1998, apenas 2 possuem novos mecanismos de ação. Drogas que apresentam o mesmo mecanismo de ação são um agravante para a seleção de resistência antimicrobiana por patógenos (SPELLBERG *et al*, 2004).

O desenvolvimento de antibióticos é inversamente proporcional ao crescente número de casos e dispersão de RAM. A demanda por novos agentes microbianos é um desafio para a ciência moderna, pois os antibióticos salvam milhões de pessoas todos os anos. Para o período de 2000 até 2016 apenas 5 novos antibióticos foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA (MARSTON, 2016) (Figura 1).



**Figura 1.** Novos agentes antimicrobianos aprovados nos EUA pelo FDA (SPELLBERG, 2004; MARSTON, 2016). Fonte: AUTOR.

Em bactérias Gram-negativas, que possuem uma proteção mais resistente conferida pela parede celular, o fato de possuir baixa permeabilidade da membrana e bombas de efluxo, o desafio de lidar com infecções destes microrganismos é ainda maior (TEIXEIRA, *et al*, 2012; LIU, 2017; SANTANA, 2020).

Biofilme é uma matriz composta de polissacarídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico (ADN) extracelular, uma estrutura desenvolvida pelas próprias bactérias, que as protege do estresse do ambiente, ataques externos e da baixa disponibilidade de nutrientes. A formação de biofilme proporciona um ambiente com menor risco de sofrer com agentes antimicrobianos. O biofilme pode formar uma superfície biológica, como, por exemplo, em instrumentos usados em hospitais, o que pode ocasionar infecções nos seres humanos. Estima-se que dois terços de infecções adquiridas em ambientes hospitalares são causadas por biofilmes. (DOSTERT et al, 2019).

Como a formação de biofilme confere uma superfície de proteção, infecções causadas por colônias de bactérias que criaram biofilme, são um desafio ainda maior no combate desses micróbios, já que, além da resistência com as drogas mais utilizadas, existem ainda uma barreira física de proteção. Estudos voltados para essa finalidade terapêutica ainda são baixos. Novas terapias, inclusive o uso de o uso de peptídeos antimicrobianos para lidar com biofilmes, são promissoras como possíveis medicamentos a serem desenvolvidos (DOSTERT et al, 2019).

## 1.2. Grupo ESKAPE

Os patógenos conhecidos como grupo ESKAPE, acrônimo para o grupo formado pelas bactérias *Enterobacter* spp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter*

*baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecium*, são micróbios oportunistas e causam coinfeções em pacientes em estado grave de hospitalização, como observado durante a pandemia do SARS-CoV-2 em 2019 (SILVA *et al*, 2017; ALOKE e ACHILONU, 2023). Esses patógenos causam infecções associadas à assistência à saúde (IACS). Os microrganismos desse grupo apresentam mecanismos que os permitem se desenvolver em ambientes hospitalares, como a formação de biofilme comumente relatada em *P. aeruginosa* e resistência a desinfetantes como reportado para *A. baumannii* (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

As infecções hospitalares adquiridas (IHA) são infecções contraídas em ambientes hospitalares, sendo o grupo ESKAPE o principal causador dessas infecções. Tal grupo representa um grande desafio para a medicina moderna, devido ao grande aumento no número de casos e variados níveis de resistência exibidos por esses micróbios. A OMS colocou esse grupo de patógenos em uma lista de prioridade para o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas para combater estas infecções (ALÓKE e ACHILONU, 2023; LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

*Acinetobacter baumannii* é uma bactéria oportunista Gram-negativa e a linhagem resistente a carbapenêmicos foi incluída pela OMS na lista de microrganismos que ameaçam a saúde humana, enfatizando que seja priorizada a busca e o desenvolvimento de fármacos e novos tratamentos para tratar infecções por esse patógeno. Sua incidência mundial é de 100.000.000 casos anualmente, sendo 50% resistentes a carbapenema. Possui a habilidade de prosperar na superfície de ambientes inertes, devido à formação de biofilme e são resistentes a várias drogas (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

Durante a pandemia, pacientes hospitalizados em tratamento para o novo coronavírus, tiveram coinfeções por microrganismos oportunistas do grupo ESKAPE. Casos de pneumonia adquirida em ambiente hospitalar ocorreram na faixa de 40 a 95% e os casos de mortalidade relacionados com tais infecções de 45 a 85%. Os casos de pneumonia chegaram a 79,9%, sendo que as 3 regiões com maior prevalência foram América Central e Latina, Caribe e Europa Ocidental (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

*A. baumannii* possui habilidade intrínseca de exibir resistência antimicrobiana às penicilinas e pode adquirir genes de resistência a praticamente todos os antibióticos empregados atualmente para tratar infecções causadas por bactérias Gram-negativas. A primeira escolha para tratar infecções seria inicialmente carbapenema, no entanto, a ocorrência de mecanismos de ação contra os antibióticos como a falta de expressão de porinas, produção de bombas de efluxo e produção de carbapenemase foram relatadas (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

A bomba de efluxo é o mecanismo de resistência mais comum e expelindo muitas famílias de antibióticos, inclusive os  $\beta$ -lactâmicos, sendo este um mecanismo que também ocorre com

frequência neste microrganismo. A polimixina é um medicamento indicado para tratar infecções por este patógeno (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

*Enterobacterales* é uma ordem subdividida em sete famílias, são elas: *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* e *Budiviciaceae*. *Enterobacterales* é uma grande e diversa ordem de microrganismos Gram-negativos anaeróbicos facultativos. Apresentam forma de bacilo e podem ser móveis com flagelos peritríquios ou não. Não possuem a habilidade de formar endósporos ou microcistos, nem são resistentes a ácidos. As bactérias dessa ordem estão associadas com meningite, abscessos cerebrais, infecções de pneumonias adquiridas em ambientes hospitalares, ocorrendo até sepse e a morte (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

Segundo estimativas da OMS são responsáveis por promoverem mais de 4.5 milhões de infecções na Europa, ocasionando por volta de 37.000 mortes anuais. São patógenos de grande importância devido a sua alta incidência de infecções da corrente sanguínea, do trato urinário associadas a cateter e de sítio cirúrgico. As infecções causadas por bactérias resistentes como *Klebsiella spp.* e *E. coli* possuem taxas de mortalidade por volta de 50% dos casos. Nos últimos 30 anos, *K. pneumoniae* esteve associada com a disseminação mundial de genes de resistência de  $\beta$ -lactamase em ambiente hospitalar. Observa-se que pacientes com infecções causadas por *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos (KPRC) correm um risco quatro vezes maior de morte se comparado com as variantes suscetíveis. Em um estudo onde foram coletados isolados de *Enterobacterales* de 39 países por laboratórios de vigilância entre 2012 e 2017, foram comprovadas variantes com resistência a meropenem em 2666 das amostras (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

As *Enterobacterales* são um grande desafio pela rápida disseminação de genes de resistência. Surto de infecções causadas por esses microrganismos em ambientes hospitalares têm sido notificados na última década. A resistência aos antibióticos carbapenêmicos normalmente é ocasionada pela expressão de carbapenemases. As espécies principais que carregam as carbapenemases são *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.* e *E. coli*. Além da produção das carbapenemases, ocorre também expressão de genes que alteram a produção de porinas, reduzindo assim a concentração de antibióticos, podendo ocasionar resistência. A hipótese inicial era que os genes de resistência estariam no cromossomo, até que foi encontrado o primeiro gene de resistência a colistina em plasmídeo em 2015. Além desses genes, outros foram encontrados contra polimixina nas espécies do grupo como *E. coli*, *Klebsiella spp.* e outras (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

Enterobactérias produtoras de carbapenemase são um grande problema de saúde pública que se disseminou por todo o mundo. Essa explosão de dispersão está associada com variantes de alto risco. Dentro do gênero *Klebsiella*, *K. pneumoniae* possui maior interesse médico (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

*P. aeruginosa* é uma espécie de bactéria Gram-negativa com morfologia de bacilo e são aeróbicas, catalase e oxidase positiva. Apresentam alto fator de virulência com genes de resistência antimicrobiana contidos em seu genoma, possuindo assim a capacidade de se adequar a uma grande variedade de condições ambientais incluindo o sistema imune inato dos hospedeiros (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

Este microrganismo está associado com IACS, sendo considerado um patógeno oportunista capaz de causar altas taxas de morbidade e mortalidade. É um problema grave nas unidades de tratamento intensivo (UTI). Promovem infecções associadas com o trato respiratório e também faz parte da lista de prioridades da OMS para o desenvolvimento de novas terapias. Possui fatores intrínsecos como alto fator de virulência e sinalizadores que propiciam grande capacidade de resistência (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

Infecções causadas pelo microrganismo *P. aeruginosa* resistentes têm aumentado em todo o mundo. As variedades multidroga resistente (MDR) aumentam os níveis de infecções e contribuem para sua dispersão e prevalência, principalmente em ambientes hospitalares. Um estudo realizado na Espanha, onde diversos isolados foram coletados em diferentes regiões, 26% apresentaram MDR e 65% foram classificados como extensivamente resistente a medicamentos (EDR). Nas coinfeções causadas por superbactérias em pacientes internados com COVID-19, *P. aeruginosa* foi o terceiro patógeno mais comum (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

Este microrganismo possui diversos métodos de RAM, incluindo mecanismos intrínsecos no próprio cromossomo e dispositivos de adaptação ao ambiente. Possuem a capacidade de produzir cefalosporinase, bombas de efluxo e baixa permeabilidade da parede externa, conferindo alto grau de resistência por apresentar mais de um mecanismo. Alguns antibióticos como aminopenicilina e cefoxitina promovem a produção de enzimas que degradam tais drogas. Nesta espécie é conhecida a expressão de  $\beta$ -lactamases e também foi observada resistência a imipenem. A alta mutabilidade de certo gene que expressa bombas de efluxo gera uma dessensibilização para fluoroquinolonas e todos o  $\beta$ -lactâmicos (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

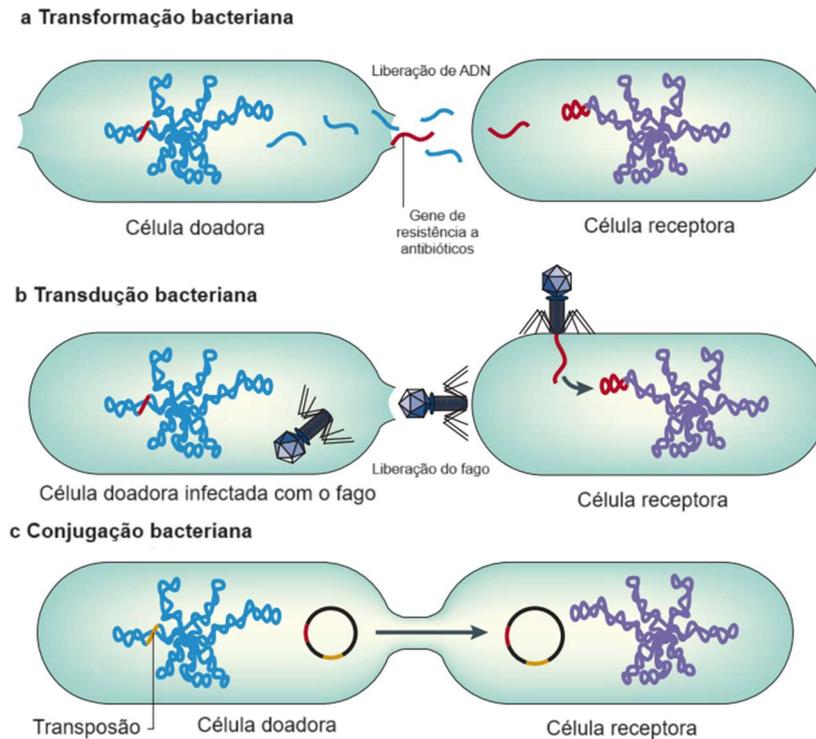
*S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, com 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, que possui alta tolerância para salinidade presente no ambiente, não tem motilidade, não forma esporos, é aeróbica facultativa, catalase e coagulase ativa, oxidase negativa e é fermentadora de manitol. Nesta espécie ocorre a produção de substâncias como fibrina e fibrinogênio que são utilizadas na

formação de biofilme, o que aumenta o fator de RAM (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

É uma bactéria oportunista e comensal que vive em 30% de pacientes saudáveis, residindo em diferentes partes dos corpos humanos. Tal microrganismo está presente em cerca de 15% da população, vivendo junto com os microrganismos da pele. Nos seres humanos pode colonizar pele, tecidos moles e a corrente sanguínea. Está associada com diversas doenças relacionadas ao sistema digestório e é adquirida normalmente por alimentos contaminados. Pode causar infecções superficiais na pele, sendo que muitos pacientes com várias condições diferentes de saúde estão suscetíveis a serem infectadas por *S. aureus*. Pode ser transmitida diretamente de uma pessoa a outra ou por qualquer objeto que possa carregar este microrganismo (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

Frequentemente causam bacteremia, quando se tem a presença de bactérias no sangue por determinado tempo, tendo alta incidência de mortalidade acima de 25% dos casos. Há uma variedade de *S. aureus* resistente à meticilina (SARM). SARM pode ser encontrado em vários locais do globo. No México ocorre a incidência de 24 a 80% na população. Esta espécie está associada com infecções concomitantes com pandemias virais, como em 1918 e 2009, além da pandemia de COVID-19. Dos pacientes hospitalizados durante a pandemia de COVID-19, com as variedades resistentes e suscetíveis, 76,5% adquiriram coinfeções após a hospitalização. *S. aureus* é um dos principais microrganismos causadores de alta morbidade e mortalidade, dentro ou fora do ambiente hospitalar, afetando crianças, além de adultos também (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

O patógeno *S. aureus* apresenta diversos mecanismos de troca de material genético entre bactérias. Por troca horizontal de transferência de genes, que ocorre entre espécies de bactérias não relacionadas entre si, como bacteriófagos, plasmídeos, transposons, ilhas de patogenicidade e cromossomos cassete estafilocócicos. São conhecidas troca de genes por conjugação, transdução e, principalmente, transformação (FURUYA e LOWY, 2006; LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023) (Figura 2).



**Figura 2.** Mecanismos de compartilhamento de genes de resistência antimicrobianos. a) A transformação bacteriana ocorre quando o ADN da lise celular é liberado e captado por outra bactéria. b) A transdução bacteriana ocorre quando o gene de resistência é compartilhado entre bactérias por meio de um fago. c) A conjugação bacteriana acontece quando há contato direto entre duas bactérias, formando um canal onde ocorre a transferência de plasmídeo. Também é possível ocorrer transferência de transposons que contêm genes de resistência (FURUYA e LOWY, 2006).

O grupo dos *Enterococci* são de grande importância médica em ambientes hospitalares. Estão presentes em quase todos os ambientes, solo, água, comida e resíduos de água. As bactérias desse gênero fazem parte da microbiota gastrointestinal natural do ser humano e de animais. São descritas atualmente mais de 30 espécies, sendo que dentre elas, as mais abundantes no ser humano são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Em ambientes hospitalares são a terceira colocada nas infecções adquiridas e estão associadas com diversos tipos de infecções. Observou-se que, entre os anos 1997 a 2006 em toda a América, Europa e Pacífico da Ásia, os microrganismos deste gênero, em particular *E. faecalis* e *E. faecium*, foram responsáveis por 64,7% e 29% das infecções, respectivamente (LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

As duas espécies citadas acima são conhecidas por apresentarem resistência intrínseca contra antibióticos, são naturalmente resistentes a vários dos medicamentos  $\beta$ -lactâmicos. São conhecidos dois métodos de resistência, a produção de  $\beta$ -lactamases, o que não é frequente, e a expressão de proteínas de ligação das penicilinas (PLP), as quais implicam na síntese de peptidoglicanos que fazem parte da parede celular, alvo do anel  $\beta$ -lactâmico (ROSSOLINI *et al*,

2017; LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

*K. pneumoniae* é uma espécie de bactéria Gram-negativa que habita naturalmente o trato gastrointestinal, a pele e a faringe nasal (TZOUVELEKIS *et al*, 2012). É uma bactéria Gram-negativa em forma de bacilo, sendo comum apresentar-se encapsulada e faz parte da família *Enterobacteriaceae*. Nos últimos anos passaram a expressar uma grande variedade de enzimas contra o anel  $\beta$ -lactâmico, conferindo resistência contra penicilinas, cefalosporina e carbapenema. Ocorre também a perda de porinas na parede celular, diminuindo o fluxo de antibiótico para dentro da bactéria. Existem variedades que expressam bombas de efluxo que lançam para fora da bactéria substância nocivas (SANTAJIT e INDRAWATTANA 2016).

Dentro do gênero *Klebsiella* existem outras variedades patogênicas, no entanto nos casos clínicos nos ambientes de cuidado com a saúde, em 85% dos casos, os isolados são de *K. pneumoniae* (MILLER e ARIAS, 2024).

Devido ao fato das carbapenemas serem utilizadas frequentemente para tratar infecções por bactérias Gram-negativas, esta espécie passou a exibir com o tempo resistência ao antibiótico, sendo denominadas *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KPRC) (SANTAJIT e INDRAWATTANA 2016).

Mesmo que a espécie *Escherichia coli* não seja membro do grupo dos patógenos ESKAPE, há uma preocupação crescente frente à seleção de resistência antimicrobiana nesse microrganismo (MILLER e ARIAS, 2024).

*E. coli* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete que pertence à família *Enterobacteriaceae*. É uma bactéria que habita normalmente o intestino de seres humanos, porém pode viver e contaminar os ambientes onde os seres humanos estejam presentes como comida, solo e água. Multiplicam-se rapidamente, sendo que em cerca de 20 minutos é capaz de dobrar em quantidade (JANG *et al*, 2017).

Apesar de *E. coli* habitar naturalmente o intestino dos seres humanos, esta pode causar doenças, principalmente gastrointestinais. Esse microrganismo mata cerca de 2 milhões de pessoas por ano em todo o mundo. É considerada um organismo modelo, sendo a bactéria mais estudada (JANG *et al*, 2017).

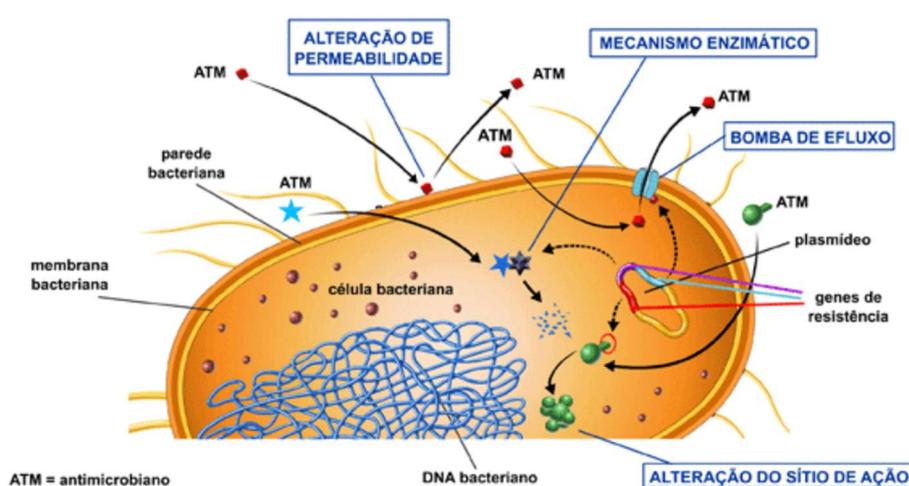
Esse microrganismo vive de forma comensal no intestino do ser humano, estando sujeito ao contato frequente com medicamentos antibióticos, o que promove seleção para a maioria dos medicamentos utilizados para tratar infecções. Tal espécie tem a notável habilidade de adquirir material genético por via horizontal (LEIMBACH *et al*, 2013; JANG *et al*, 2017).

*E. coli* causa enteretite, infecções do trato urinário, septicemia e outras infecções clínicas, como a meningite neonatal. Também está frequentemente associada com episódios de diarreia

em animais. Há um crescimento notável de resistência antimicrobiana nesta espécie. Existe ocorrência de variantes resistentes na Europa, sendo que em países europeus, *E. coli* é a espécie Gram-negativa mais invasiva na população (ALLOCATI et al, 2013).

Possui resistência intrínseca contra penicilinas G, além de serem resistentes a várias outras classes de drogas antibióticas, inclusive com variados mecanismos de ação. A *E. coli* possui resistência contra os medicamentos  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos (ALLOCATI et al, 2013).

A figura 3 ilustra os principais mecanismos de resistência observados em bactérias patogênicas.

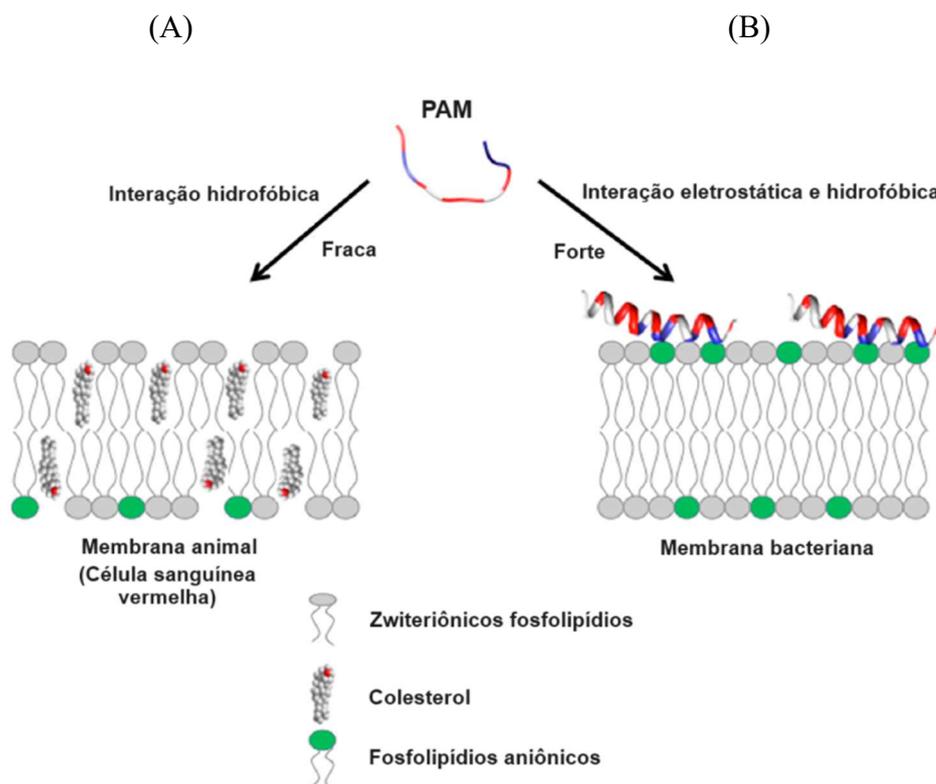


**Figura 3.** Mecanismos de resistência bacteriana. Fonte: Anvisa, 2007.

### 1.3. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas que fazem parte do sistema imune inato de animais e plantas contra patógenos, são a primeira linha de defesa desses organismos (CONLON e MECHKARSKA, 2014; 2023; ZHANG *et al*, 2021). São peptídeos compostos por cerca de 10 a 50 resíduos de aminoácidos. Geralmente apresentam estrutura em alfa-hélice anfipática e carga líquida positiva (TEIXEIRA *et al*, 2012; SANTANA *et al*, 2020).

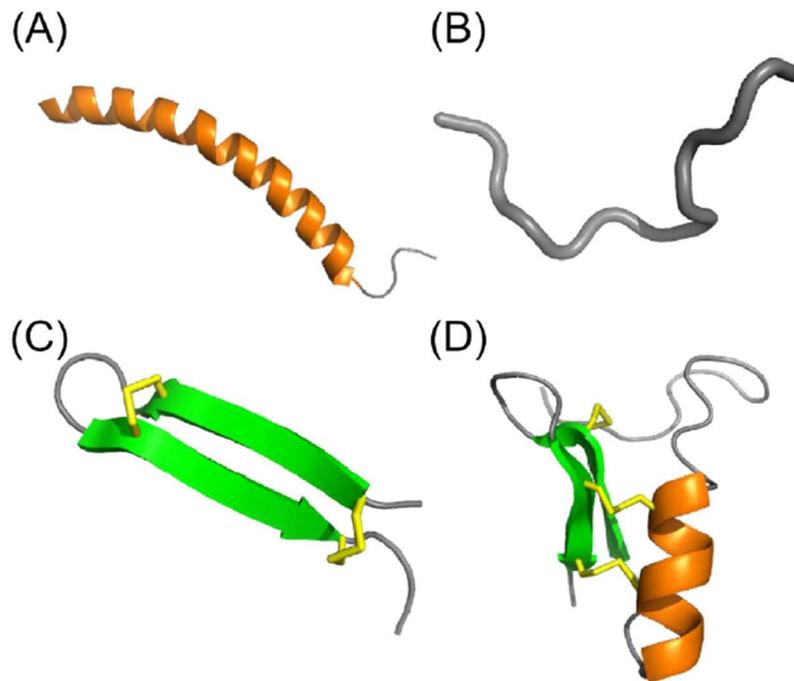
Os PAMs por apresentarem essas características, agem de forma não convencional, com potencial uso terapêutico, pois interagem com as membranas das bactérias, que são aniônicas devido a presença de fosfolípidos como fosfatidilglicerol e cardiolipina. Diferentemente dos eucariotos, que possuem em suas membranas fosfolípidos neutros como esfingomiélna e fosfatidilcolina (ZASLOFF, 2002; SANTANA *et al*, 2020) (Figura 4).



**Figura 4.** Interação dos PAMs catiônicos com as membranas de animais multicelulares (A) e bactérias (B). As interações com a membrana bacteriana são mais fortes devido as interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Fonte: KUMAR *et al*, 2018.

Diferentemente do mecanismo de ação dos medicamentos antibióticos tradicionais, que agem principalmente em alvos intracelulares, como os medicamentos que possuem anel  $\beta$ -lactâmico, que são suscetíveis ao desenvolvimento das enzimas  $\beta$ -lactamases, os PAMs agem na membrana celular, interagindo, perturbando e desintegrando-a (CORAM *et al*, 2023).

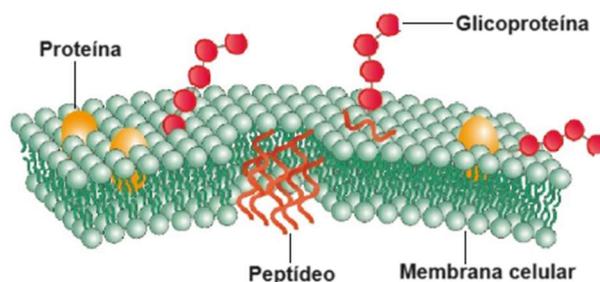
Através do estudo dos peptídeos antimicrobianos, foi possível elucidar o conhecimento da estrutura dessas moléculas. Os peptídeos antimicrobianos podem ser classificados em quatro categorias, de acordo com sua estrutura secundária: 1. Peptídeos que assumem conformação em  $\alpha$ -hélice. 2. Peptídeos em folha- $\beta$  estabilizados por pontes dissulfeto. 3. Peptídeos em forma estendida e 4. Peptídeos em forma mista (LAI e GALLO, 2009; BIN HAFEEZ, 2021; JI *et al*, 2024) (Figura 5).



**Figura 5.** Estruturas comumente encontradas nos peptídeos antimicrobianos. (A) estrutura em alfa-hélice adota pelo peptídeo LL-37. (B) estrutura estendida como Indocilina. (C) conformação de folha-beta e estabilizada pela presença de pontes dissulfeto como em  $\beta$ -hairpin (D) estrutura mista como na defensina de inseto CS $\alpha\beta$  (KOEHBACH e CRAIK, 2019).

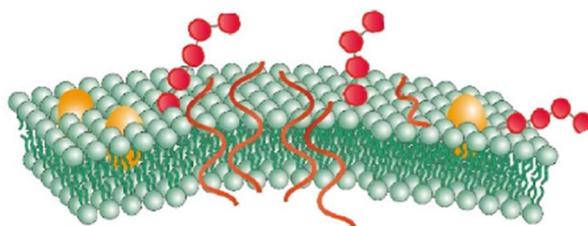
O conhecimento das formas dos PAMs ajuda a esclarecer como estes agem em contato com os microrganismos. Além de compreender o mecanismo de ação, é possível utilizar esta informação para otimizar o uso como medicamentos, por meio de desenho racional de drogas e medicamentos (WIMLEY e HRISTOVA, 2011; SANTANA, 2022).

Foram propostos quatro principais métodos de ação dos PAMs para interagir com as bactérias (Figuras 6, 7 e 8). O primeiro é denominado *barrel-stave*, neste modelo, os peptídeos, ao entrarem em contato com a membrana plasmática se alinham de forma perpendicular e formam poros ou canais através da membrana. Os peptídeos se arranjam de forma que a face hidrofóbica do peptídeo interaja com o centro hidrofóbico da membrana e as faces hidrofílicas voltadas para dentro (BROGDEN, 2005; TRAVKOVA et al, 2017; FREITAS, 2020) (Figura 6).



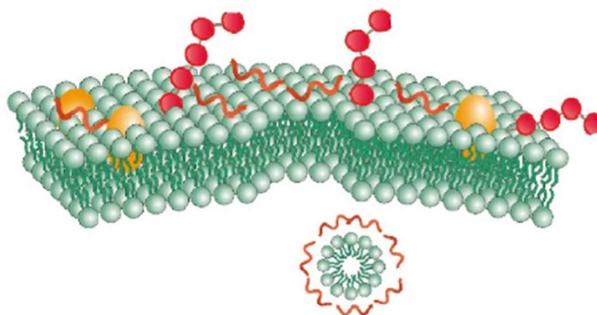
**Figura 6.** Modelo *barrel-stave* (JI et al, 2024).

Outro modelo proposto é o poro toroidal, onde as faces hidrofóbicas dos peptídeos se agrupam de forma perpendicular à membrana plasmática, de forma que ao atingir o limiar de concentração, os peptídeos se inserem na membrana plasmática, fazendo com que a membrana se dobre para dentro, formando um poro (BROGDEN, 2005; TRAVKOVA et al, 2017; FREITAS, 2020) (Figura 7).



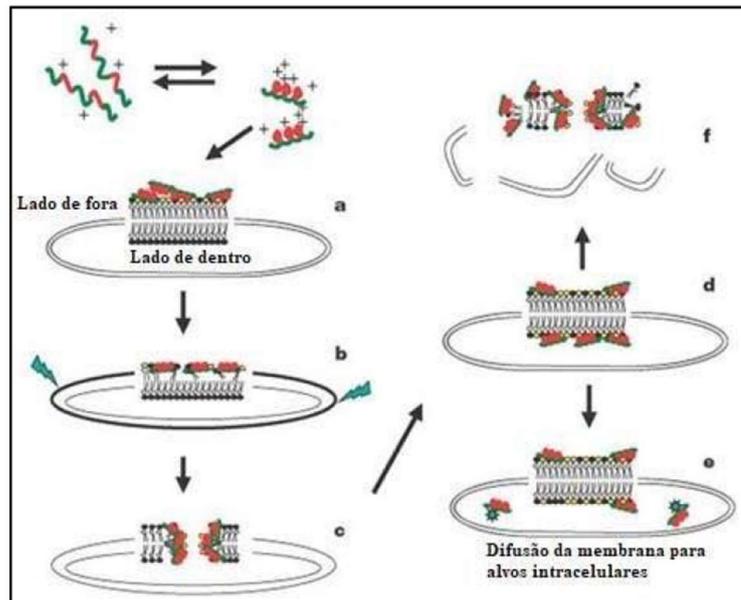
**Figura 7.** Modelo poro toroidal (JI et al, 2024).

O terceiro modelo é o tapete (*carpet-like*), acontece quando os peptídeos interagem de forma perpendicular à membrana da bactéria, ao cobrir determinada parte da superfície da membrana da bactéria, os peptídeos permeiam a membrana levando a desintegração e a formação de micelas (BROGEN, 2005; TRAVKOVA et al, 2017; FREITAS, 2020) (Figura 8).



**Figura 8.** Modelo *carpet-like* (JI et al, 2024).

Há ainda o modelo Shai-Matsuzaki-Huang (Figura 9), onde ocorre a formação de tapete e de poro na membrana plasmática, os peptídeos adentram a célula pelos poros formados e interagem com alvos intracelulares (SHAI, 1999; FREITAS, 2020). Supõe-se que esse modelo seja o modo de ação da maioria dos PAMs, um dos motivos para acreditar nesse modelo é o fato de permitir que os peptídeos adentrem a célula (ZASLOFF, 2002; RINALDI, 2002).



**Figura 9.** Modelo Sai-Matzusaki-Huang. (a) formação de carpete. (b) integração do peptídeo com a membrana, causando o afinamento e a expansão da membrana externa, em relação a membrana interna. (c) fase de transição e formação de buracos. (d) transponte de lipídeos e peptídeos para a membrana interna. (e) difusão de peptídeos para alvos intracelulares. (f) disrupção da membrana plasmática. (ZASLOFF, 2002).

Muitos peptídeos antimicrobianos foram identificados e descritos na literatura científica, um total de 2.619 PAMs, em maior parte de origem animal, com 1972 do total. Desse total de PAMs de origem animal, 38% foram identificados na pele de anfíbios. (WANG *et al*, 2016). Dos peptídeos identificados, em sua maioria pertencentes a ordem dos Anuros (KÖNIG *et al*, 2015).

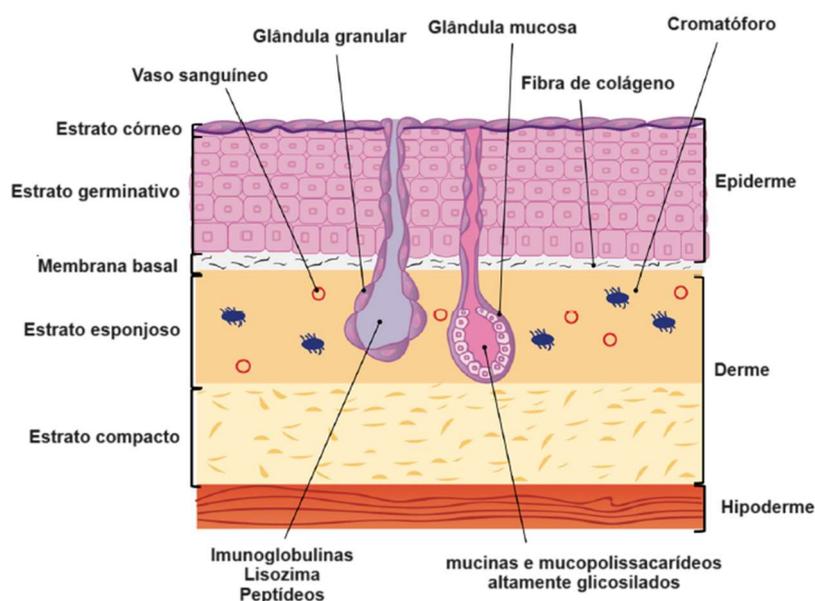
#### 1.4. Anuros

Os anuros são animais tetrápodes que possuem duas fases de vida, sendo uma larval, na água, e outra terrestre, quando adulto. Mesmo assim, esses animais vivem próximo às regiões com um corpo de água, como lagos, rios e florestas. A ordem Anura é a mais abundante da classe Anfíbia, com 7636 espécies. São característicos desses animais a pele permeável, sendo responsável também pelas trocas gasosas (NASCIMENTO *et al*, 2003; HICKMAN, 2016; DEMORI *et al*, 2019; FROST, 2023).

A pele dos anuros desempenham um papel importante na manutenção da homeostase do animal. Podem ser listadas como funções do tegumento dos anuros, proteção contra abrasão, respiração cutânea, osmorregulação, termorregulação e secreção rica em substâncias bioativas que o protegem tanto contra patógenos quanto predadores (NASCIMENTO *et al*, 2003;

NACIF-MARÇAL *et al*, 2015; MECHKARSKA *et al*, 2023).

Os anfíbios possuem glândulas em sua pele com funções distintas. Existem dois tipos, as glândulas mucosas que produzem e liberam mucinas, que auxiliam na lubrificação da pele, deixando-a úmida. E as glândulas serosas, que produzem uma diversidade maior de compostos, entre eles: peptídeos, esteroides, aminas, biogênicos, bufadienolídeos, proteínas e alcalóides. Apresentam uma variedade de funções biológicas, sendo de grande interesse farmacológico (NASCIMENTO *et al*, 2003; BRUNETTI, 2016; SANTANA *et al*, 2020) (Figura 10).



**Figura 10.** Anatomia da pele de anfíbio. A epiderme é composta por uma camada de estrato córneo com células queratinizadas, seguida por uma camada de estrato germinativo. A membrana basal com fibras de colágeno separa a epiderme da derme. A derme é composta pelo estrato esponjoso e o estrato compacto. As glândulas serosas e mucosas estão no estrato esponjoso (DEMORI *et al*, 2019).

### 1.5. Peptídeos antimicrobianos em anuros

Os estudos de peptídeos antimicrobianos presentes na pele de anfíbios são recentes, embora o primeiro peptídeo antimicrobiano descoberto, a bombinina, tenha sido isolado de *Bombina variegata* em 1969, com atividade antimicrobiana e hemolítica, mas os estudos voltados ao seu isolamento, somente ganhou impulso a partir da década de 1990 (XIAO, 2011).

As glândulas serosas responsáveis por produzir, armazenar e liberar um verdadeiro coquetel de moléculas com as mais variadas atividades biológicas. As glândulas serosas possuem adrenoreceptores ao seu redor, assim que ocorre alguma forma de estímulo nocivo ou estresse, é liberada epinefrina e/ou norepinefrina que faz essas células mioepiteliais se contraírem, liberando o conteúdo da glândula (DEMORI *et al*, 2019).

Os anuros possuem uma grande variedade de PAMs. A classe Amphibia possui mais de 8.000 espécies de animais divididas nas 3 ordens, Gymnophiona, Caudata e Anura. Sendo que somente a ordem Anura possui 7577 espécies (FROST, 2023). Com a variedade de espécies desta ordem, há uma abundância tanto de PAMs quanto de outras moléculas com potencial atividade biológica.

Os PAMs têm se revelado uma opção promissora para lidar com a ameaça constante e crescente representada pela resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos atualmente disponíveis. De acordo com o banco de sequências, o banco de dados de peptídeos antimicrobianos BDPA (do inglês, *Antimicrobial Peptide Database*, APD, <https://aps.unmc.edu/>, acessado em 26 de fevereiro 2024), existem dados de 1.117 entradas referentes a peptídeos antimicrobianos de anuros (WANG *et al*, 2016).

Em uma revisão realizada em 2015, foi apontada a existência de mais de 100 famílias de peptídeos com 2000 peptídeos descritos em anfíbios (XU e LAI, 2015; DEMORI *at al*, 2019). Apesar deste número ser grande, ainda existem muitas espécies que se quer tiveram sua secreção cutânea explorada do ponto de vista farmacológico.

Os PAMs oriundos da secreção cutânea dos anuros podem ser classificados em família, sendo a principal forma de classificação baseada em sua sequência de aminoácidos (MANGONI e CASCIARO, 2020). Além das propriedades antimicrobianas serem bastante avaliadas nos anuros, existem uma grande diversidade de outras funções biológicas, mostrando-se ativos contra doenças como diabetes e câncer (CONLON *et al*, 2019).

Cada vez mais os PAMs têm demonstrado uma variedade de efeitos biológicos, tornando-os mais atrativos para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas. Existem peptídeos que, em ensaios biológicos, mostraram resultados em menor tempo, se comparados a certos antibióticos usados atualmente na prática clínica, o que implica em uma redução na resistência bacteriana, já que o microrganismo permanece um menor tempo em contato com o peptídeo (MANGONI e CASCIARO, 2020).

Diversos estudos mostrando as mais variadas funções biológicas desempenhadas por PAMs, além da atividade microbicida, há uma grande variedade ensaios que os PAMs se mostram promissores. Em um estudo realizado por Antony *et al* (2024), peptídeos antimicrobianos encontrados no tegumento de anuros exibiram resultados satisfatórios contra células cancerosas. A avaliação de outras propriedades biológicas está crescendo em relação aos PAMs, atualmente cerca de 84,50% exibiram atividade antimicrobiana, 36,56% são antifúngicos e 7,69% com atividade anticancerígena (ANTONY *et al*, 2024).

Além das propriedades antimicrobianas, que são as mais estudadas, as outras funções biológicas dos PAMs estão sendo exploradas, como antifúngica, antiviral, antiparasitária, antiproliferativa, cicatrizante, imunomodulatória e outras (ZASLOFF, 2002; DE AMARAL e IENES-LIMA, 2022).

Existem mais de 178 famílias de peptídeos antimicrobianos identificados na pele de anfíbios. Algumas delas são ranaturinas, filoseptinas, brevininas, temporinas, dermaseptinas, megaininas, esculetinas e outras. Estudos realizados mostram que alguns peptídeos mostram atividade antiviral como o vírus HIV e foi explorada atividade contra o vírus da SARS-CoV-2. Alguns estudos realizados mostraram que um peptídeo chamado lectina semelhante a defensina-5, foi capaz de bloquear uma enzima que é utilizada na infecção das células humanas para a entrada do vírus (DE AMARAL e IENES-LIMA, 2022).

### **1.6 Atividade biológica dos PAMs**

O sistema imunológico dos vertebrados é composto por moléculas e células que têm por objetivo proteger o organismo de invasores, como patógenos e corpos estranhos, sendo sua ativação e funcionamento coordenado chamado de resposta imune. É um sistema complexo que envolve desde barreiras físicas que protegem contra invasão mecânica, quanto à identificação e destruição mediada pelos antígenos presentes nos invasores (LEVINSON, 2010; DELVES *et al*, 2013; ABBAS *et al*, 2019).

O sistema imunológico é classificado em sistema imune inato e sistema imune adaptativo. O sistema imune inato é composto por moléculas e células que estão presentes no organismo desde o seu desenvolvimento, como a pele, células efectoras e moléculas. Por ser a primeira barreira de defesa, tem ação imediata, logo após a entrada de microrganismos ou corpos estranhos, com ação nas primeiras horas e dias. O sistema imunológico adaptativo é adaptável, composto por células que identificam os antígenos presentes nos microrganismos e assim produz anticorpos para combatê-los. Esse sistema confere uma memória, ou seja, se ocorrer uma infecção ou invasão pelo mesmo microrganismo ou corpo estranho, as células já possuirão anticorpos (LEVINSON, 2010; DELVES *et al*, 2013; ABBAS *et al*, 2019).

O neutrófilo é o leucócito polimorfonuclear mais abundante, originado das células hematopoiéticas mieloides da medula óssea. É a principal célula branca presente na circulação sanguínea e é a menor célula da imunidade inata. Apresenta núcleo multilobulado e possui muitos grânulos (ABBAS *et al*, 2019). Os microrganismos aderem à superfície do neutrófilo pela interação com os padrões moleculares associados ao patógeno ou PAMP (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*). Por meio de pseudópodes, englobam o corpo estranho,

formando um fagossomo, onde os grânulos celulares se fundem com o fagossomo, destruindo o microrganismo pela ação microbicida do conteúdo dos grânulos (LEVINSON, 2010; DELVES *et al*, 2013).

Os peptídeos antimicrobianos possuem uma variedade de funções, incluindo sua atuação como imunomoduladores. Suas atividades relacionadas não apenas com a capacidade de agir ativando as respostas imunes inata e adaptativa, mas também como potencial uso em doenças autoimunes têm sido alvo de estudos nos últimos anos. No entanto, seu emprego traz preocupações adicionais, já que podem afetar os mecanismos de transdução de sinal, podendo induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (PAVLICEVIC *et al*, 2022).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs), também conhecidos como peptídeos de defesa do hospedeiro (HDPs) são peptídeos produzidos por todos os seres vivos (DRAYTON *et al*, 2021). Os PAMs com atividade imunomoduladora agem principalmente na resposta imune inata, atraindo moléculas e células do organismo. A relação dos PAMs com modulação da resposta imune adaptativa ainda não é muito bem compreendida, apesar de haver evidências que confirmam tal relação (PANTIC *et al*, 2017; KUMAR *et al*, 2018).

As funções biológicas dos PAMs vão além da atividade antimicrobiana, sendo efetiva também contra fungos, parasitas, vírus. A atividade imunomodulatória de HPDs envolvem a modulação da resposta pro- e anti-inflamatória, alterando novas rotas de sinalização, de forma direta ou indireta, atuando no recrutamento de várias células do sistema imune ativando a maturação e diferenciação celular, cicatrizando feridas e, também, induzindo a morte celular (MANSOUR *et al*, 2014; SHI *et al*, 2023).

Em um estudo realizado com anuros da região de caatinga no Brasil, foram realizados ensaios biológicos com a finalidade de testar a atividade imunomodulatória dos extratos da pele de anuros da região. Em um ensaio realizado para avaliação da inibição da produção de óxido nítrico (NO), o extrato da pele do anuro *Chaunus rubescens* foi capaz de inibir em mais de 90% a produção de NO (SÁ *et al*, 2007). Em outro ensaio utilizando esplenócitos de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*, o extrato da pele de *C. rubescens* causou inibição da linfoproliferação das células, demonstrando uma atividade inibitória de 100% na concentração de 1000 µM/mL. Também foi observada citotoxicidade máxima de 30% para o extrato da pele do anuro *Leptodactylus ocellatus* (SÁ *et al*, 2007).

As infecções causadas por fungos patogênicos ocorrem em todo o mundo e sua distribuição acontece de acordo com uma série de variáveis, como clima, desenvolvimento social e geografia da localidade, por exemplo. A OMS classificou diversos fungos de acordo com dados epidemiológicos. Tal classificação é feita com base na capacidade de causar infecções, no entanto,

fungos de importância médica não foram classificados de maneira adequada, como ocorre, por exemplo, no Brasil com o fungo *Sporothrix brasiliensis* (CHECHI *et al*, 2023).

No ano de 2019, nos Estados Unidos da América, os gastos com doenças fúngicas foram cerca de 7,5 bilhões de dólares. No ano de 2021 ocorreram 7.199 mortes causadas por esses patógenos, havendo um aumento durante a pandemia de COVID-19 chegando a 13.121 mortes. Em todo o globo, os casos de mortes em decorrência de doenças fúngicas atingem cerca de 1,7 milhões (CHECHI *et al*, 2023; GOLD *et al*, 2023).

Dados apontam crescimento da incidência de doenças fúngicas e seu impacto em todo o mundo, além da emergência de fungos que apresentam resistência adquirida aos medicamentos utilizados no tratamento dessas doenças, como *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*. Também existem variedades que apresentam resistência inata aos medicamentos convencionais como *Candida auris* e fungos da ordem *Mucorales* (DU *et al*, 2020; CHECHI *et al*, 2023).

Conlon e colaboradores, em 2019, realizaram um estudo de análise peptidômica com a finalidade de identificar novos peptídeos com propriedades terapêuticas na pele de anfíbios. Peptídeos naturais identificados e seus análogos apresentaram atividade contra o fungo patogênico *C. albicans* (CONLON *et al*, 2019).

Os vírus apresentam material genético envolto em uma cápsula proteica chamada de capsídeo e são tão pequenos que só podem ser observados através de microscopia eletrônica, sendo parasitas intracelulares obrigatórios (TORTORA *et al*, 2017).

O desenvolvimento em larga escala de medicamentos, vacinas e terapias antivirais têm auxiliado o combate aos vírus, no entanto, mesmo com todo o desenvolvimento dessas tecnologias é crescente os casos de resistências virais. A possibilidade de utilizar peptídeos antimicrobianos tem chamado a atenção de pesquisadores e os peptídeos antimicrobianos identificados na pele dos anuros são fortes candidatos a medicamentos antivirais (VILAS BOAS *et al*, 2019).

Os primeiros antivirais desenvolvidos e utilizados como medicamentos não apresentavam boa especificidade e causavam uma série de reações adversas indesejadas. Os peptídeos antimicrobianos que apresentam atividade antiviral, são também chamados de peptídeos antivirais (AVP). Podem atuar inibindo o vírus ou competindo com o alvo de ligação da proteína na membrana das células hospedeiras. As características estruturais dos PAMs também favorecem a interação com a cápsula viral por meio de um mecanismo semelhante ao observado com as bactérias (VILAS BOAS *et al*, 2019).

O uso de peptídeos como medicamentos antivirais possuem vantagens como baixa massa molecular, menor toxicidade, efeitos adversos reduzidos e maior eficiência (QURESHI *et al*,

2014). A magainina é um peptídeo composto por 23 resíduos de aminoácidos identificado na pele do anuro *Xenopus laevis*, sendo a magainina II um inativador relativamente eficaz de vírions pelo mecanismo de ação *carpet-like*. Foi demonstrada a atividade antiviral do peptídeo magainina contra os vírus herpes simplex tipo 1 (HSV1) e 2 (HSV2) (MATANIC e CASTILLA, 2014)

Protozoários são microrganismos unicelulares que podem habitar a água e o solo e se alimentam de bactérias ou pequenas partículas nutrientes. Existem milhares de espécies, mas poucas espécies podem causar doenças nos seres humanos. A malária, por exemplo, é uma doença parasitária causada por um protozoário do gênero *Plasmodium*, sendo a quarta causa mais comum de morte no continente Africano (LEVINSON, 2010; TORTORA *et al*, 2017).

É conhecido que peptídeos da família das dermaseptinas e filoseptinas possuem atividade antiparasitária contra protozoários do gênero *Leishmania*. Em estudo realizado para verificar atividade contra este protozoário, o peptídeo DRS-H10, uma dermaseptina identificada na pele do anuro *Phyllomedusa nordestina*, mostrou efetividade comparável ao medicamento anfotericina B contra este microrganismo (BRAND *et al*, 2013)

### **1.7. *Pithecopus rohdei***

O anuro *Pithecopus rohdei*, anteriormente classificado como *Phyllomedusa rohdei*, foi reclassificado, após uma revisão utilizando dados moleculares de genes nucleares e mitocondriais, além de caracteres morfológicos. Foi constatado que estes organismos eram mais aparentados com o gênero *Pithecopus*, sendo assim foram reclassificados como pertencentes à espécie *Pithecopus rohdei* (FAIVOVICH *et al*, 2005).

Os hilídeos da subfamília *Phyllomedusinae* são conhecidos por apresentarem em sua pele um grande arsenal de moléculas como os peptídeos antimicrobianos (ERSPAMER, 1985). O PAM mais recente de *P. rohdei* identificado é uma dermaseptina, nomeada de dermaseptina PR-1 (SANTOS, 2023). Sendo este peptídeo o único PAM identificado nesta espécie até o momento.

*Pithecopus rohdei* (Figura 11) é uma espécie de anuro endêmico da região de Mata Atlântica. Vive em ambientes aquáticos de águas paradas, como poças de água nas épocas de chuva. Está distribuído pela costa de São Paulo até a região sul da Bahia. Nesta espécie é consenso a presença de grande quantidade de peptídeos bioativos em sua pele (ERSPAMER, 1985; DE PAULA LIMA, 2010; FAIVOVICH *et al*, 2010; RAMOS *et al*, 2018) (Tabela 1).



**Figura 11.** Espécime adulto de *Pithecopus rohdei*. Foto de Gabriel Rodrigues, disponível em SBH, 2023.

**Tabela 1.** Peptídeos descritos para a espécie de anuro *Pithecopus rohdei*.

<b>Peptídeo</b>	<b>Massa molecular (Daltons)</b>	<b>Estrutura primária</b>	<b>Referência bibliográfica</b>
<b>Phyllokinin</b>	1337	RPPGFSPFRIY	ANASTASE <i>et al</i> , 1961
<b>Dermophin</b>	900,40	YAFPGYPS	MOTECUCCHI <i>et al</i> , 1981
<b>Tryptophyllin 4</b>	535,21	EPWM	MOTECUCCHI <i>et al</i> , 1985
<b>Tryptophyllin 5</b>	658,35	FPPWL	MOTECUCCHI <i>et al</i> , 1985
<b>Tryptophyllin 7</b>	798,41	VPPLGWM	MOTECUCCHI <i>et al</i> , 1985
<b>Tryptophyllin 13</b>	1644,8	QEKPYWPPPIYPM	MOTECUCCHI <i>et al</i> , 1985
<b>Rohdei litorin</b>	1090	QLWATGHFM	BARRA <i>et al</i> , 1985
<b>Antioxidin 1</b>	1543,69	TWYFITPYIPDK	BARBOSA <i>et al</i> , 2018
<b>Dermaseptina 1-PR</b>	3080,66	GLWKMLAKGAGKVLGHVASKFLGSQGPES	SANTOS <i>et al</i> , 2023

### 1.8. *Lithobates palmipes*

*Lithobates palmipes* é um anuro da família Ranidae, a qual compreende 455 espécies descritas, com ocorrência principalmente entre o sul dos Estados Unidos da América e México. No entanto possui baixa ocorrência na América do Sul e na Austrália. O gênero *Lithobates* possui 51 espécies, sendo que apenas duas ocorrem no Brasil, *Lithobates palmipes*, que é a espécie de ocorrência natural, denominada rã do rio Amazonas, e a *Lithobates catesbeianus* que foi introduzida na fauna brasileira. A espécie *L. palmipes* é encontrado em vários países da América Latina (Figura 12) (RODRIGUES *et al*,2013; MECHKARSKA *et al*, 2023; FROST, 2023).

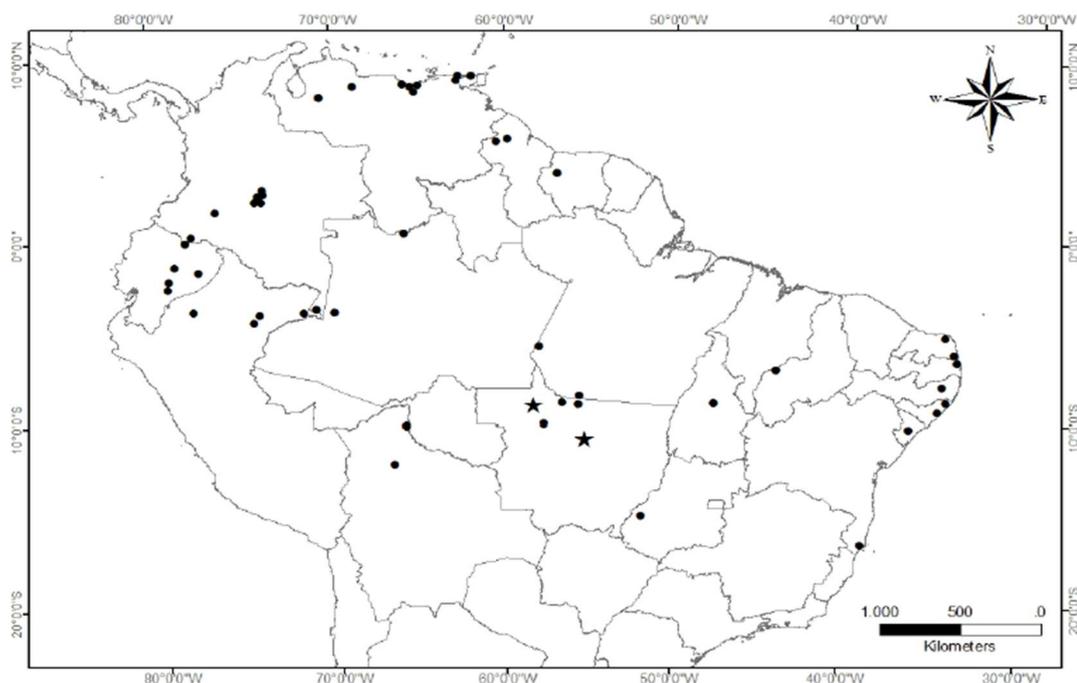
É uma rã de tamanho grande e um pouco robusta, podendo alcançar o tamanho de até 92 milímetros. Possui cor verde na parte dorsal, marrom nos flancos e ponta dos membros e com manchas escuras e ventre na cor amarela. Apresenta pele lisa e membrana interdigital (Figura 12). É uma espécie preferencialmente noturna que vive próximo às águas permanentes como riachos, lagos e estanques. (DUELLEMAN, 1978; HILLIS e DE SÁ, 1988).



**Figura 12.** Espécime adulto de *Lithobates palmipes*. Foto de Santiago R. Ron, disponível em [amphibiaweb](http://amphibiaweb.org), 2022.

Esta espécie pode ser encontrada na região norte nos estados do Acre, Tocantins, Amazonas e Pará; na região central, nos estados de Mato Grosso e Goiás; e na região nordeste nos estados de Alagoas, Bahia, Sergipe, Piauí, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (Figura 13).

*L. palmipes* não é uma espécie ameaçada de extinção de acordo com a Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) (RODRIGUES *et al*,2013; MECHKARSKA *et al*, 2023).



**Figura 13.** Área de distribuição de *Lithobates palmipes* na América do Sul. Os círculos indicam os velhos registros e as estrelas os novos registros de ocorrência (RODRIGUES 2013).

Com o crescente aumento de casos de resistência antimicrobiana e a escassez de medicamentos e ferramentas terapêuticas, torna-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos antibióticos para atender à sociedade, inclusive, com o desenvolvimento de medicamentos com novos mecanismos de ação, com o objetivo de desacelerar a seleção de mecanismos de resistência. Muitos estudos vêm sendo feitos, identificando peptídeos antimicrobianos na secreção da pele de anuros e um número maior de peptídeos com atividade terapêutica têm sido avaliados com resultados positivos.

## 2. JUSTIFICATIVA

A capacidade dos microrganismos de exibir resistência aos tratamentos antimicrobianos vem crescendo e, como causadores dessa adaptação, pode-se incluir o uso indiscriminado de medicamentos antimicrobianos. Somado à característica inata de exibir resistência contra determinadas drogas, emergem as bactérias multirresistentes (PRESTINACI *et al*, 2015; SANTANA *et al*, 2020). Os mecanismos de resistência bacteriana ocorrem principalmente pela utilização de medicamentos antibióticos de forma indevida, expondo as bactérias a doses abaixo da necessária para causar sua morte, levando à seleção de bactérias que apresentam plasmídeos, estrutura de ADN circular livre no citoplasma da célula, com genes que garantem resistência aos antibióticos, geralmente enzimas que atuam hidrolisando as moléculas dos fármacos.

Desenvolver métodos ou terapias que visem agir nesses microrganismos por outras vias que não seja intracelular pode ser uma vantagem para combater essas superbactérias. Muitos dos PAMs agem principalmente na membrana plasmática das bactérias, sendo este método mais difícil de promover a seleção de resistência.

O surgimento e dispersão de microrganismos resistentes a antibióticos requer o desenvolvimento de novos medicamentos ou alternativas terapêuticas para lidar com o iminente risco causado por RAM (DE OLIVEIRA *et al*, 2020). Como a emergência de resistência antimicrobiana é um fato inevitável, o estudo e a descoberta de novas drogas e tratamentos são prementes. Assim, estudos envolvendo a identificação e a caracterização de PAMs se apresenta como uma possibilidade de identificar novos agentes antibióticos, baseados nos peptídeos encontrados naturalmente na secreção da pele de anuros (MARSTEN, 2016). Somando a isso, é possível realizar o desenho racional de novos fármacos bioinspirados nessas moléculas e produzir novos antibióticos como alternativa aos medicamentos convencionais para lidar com a resistência antimicrobiana (TEIXEIRA, 2002).

Diante dessas situações, o desenvolvimento de novos fármacos, medicamentos ou ferramentas terapêuticas se faz necessária para proporcionar melhores tratamentos para a população, com a possibilidade de utilização de PAMs como opções terapêuticas (ZASLOFF, 2002).

### **3. OBJETIVO GERAL E METAS ESTABELECIDAS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

O presente projeto tem por objetivo geral a caracterização química e biológica de peptídeos inéditos presentes na secreção cutânea dos anuros *Pithecopus rohdei* e *Lithobates palmipes*.

#### **3.2. METAS ESTABELECIDAS**

**3.2.1.** Coleta de animais e extração da secreção cutânea de *P. rohdei* por estimulação elétrica.

**3.2.2.** Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea do anuro *P. rohdei*, por RP-HPLC.

**3.2.3.** Identificação das frações cromatográficas com atividade antimicrobiana.

**3.2.4.** Purificação cromatográfica dos peptídeos com atividade antimicrobiana.

**3.2.5.** Determinação das massas moleculares dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* por espectrometria de massas.

**3.2.6.** Determinação das estruturas primárias dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* por sequenciamento automático empregando-se degradação de Edman.

**3.2.7.** Buscas por similaridade entre os peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* e *L. palmipes* e peptídeos já descritos empregando métodos computacionais.

**3.2.8.** Alinhamento múltiplo dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* e *L. palmipes* com os peptídeos com maior similaridade usando a ferramenta Clustal Ômega.

**3.2.9.** Predição de roda helicoidal dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* e *L. palmipes* (projeções de Schiffer-Edmundson) com o uso da ferramenta NetWheels.

**3.2.10.** Projeção da estrutura tridimensional dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* e *L. palmipes* com a ferramenta Pep-Fold-4.

**3.2.11.** Determinação das concentrações inibitórias mínimas (MIC) da ranaturina-2PMe de *L. palmipes* sobre bactérias patogênicas.

**3.2.12.** Determinação das propriedades hemolíticas da ranaturina-2PMe de *L. palmipes* sobre eritrócitos humanos.

**3.2.13.** Determinação das propriedades antiproliferativas da ranaturina-2PMe de *L. palmipes* sobre linhagens celulares tumorais e não-tumorais.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A metodologia, os resultados e a discussão estão apresentados em formato de artigo científico, empregando o *template* da revista *Biomolecules* (<http://www.mdpi.com/journal/biomolecules>). Optou-se por apresentar o artigo científico ainda em língua portuguesa, com exceção do título e *abstract*, porém, oportunamente será feita a tradução total para a língua inglesa e a consequente submissão do artigo.



# Characterization of antimicrobial peptides present in the skin secretion of the anurans *Pithecopus rohdei* and *Lithobates palmipes*

Welthon de Souza Teotonio<sup>1,2</sup>, Gécica Gomes Barbosa<sup>3</sup>, Carlos José Correia de Santana<sup>1,2</sup>, Tulíbia Laurindo Silva<sup>3</sup>, Gabriela Calvi Zeidan<sup>1,4</sup>, Osmindo Rodrigues Pires Júnior<sup>2</sup>, Thiago Henrique Napoleão<sup>3</sup>, Wagner Fontes<sup>2</sup> and Mariana S. Castro<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Toxinology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70.910-900, Brazil; welthon91@gmail.com (W.S.T.); carlosjcsantana@gmail.com (C.J.C.S.); gabizeidan@hotmail.com (G.C.Z.); osmindo@unb.br (O.R.P.J.); mscastro@unb.br (M.S.C.)

<sup>2</sup>Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70.910-900, Brazil; wagnerf@unb.br (W.F.)

<sup>3</sup>Protein Biochemistry Laboratory, Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, 50670-901, Brazil; gessica.gomes@ufpe.br (G.G.B.); tulibia.silva@ufpe.br (T.L.S.); thiago.napoleao@ufpe.br (T.H.N.)

<sup>4</sup>Institute of Agriculture Sciences, Federal University of Viçosa, *campus* Florestal, MG, 35690-000, Brazil; gabizeidan@hotmail.com (G.C.Z.)

\*Correspondence: mscastro@unb.br (M.S.C.)

## Abstract:

The emergence of microorganisms with antimicrobial resistance is growing throughout the planet. One of the main causes of this phenomenon is the indiscriminate use of antibiotics. In the face of the emergence of multi-resistant bacteria, the search for new therapeutic agents is pressing again. The skin secretion of anurans has revealed a very rich source of molecules with pharmacological properties, among which are antimicrobial peptides, which stand out as a relevant alternative for the development of new antimicrobial drugs. In the present study, 11 specimens of the anuran *Pithecopus rohdei*, whose skin secretion was obtained by means of low-intensity electrical stimulation and this skin secretion was collected with Milli-Q water, freeze-dried and stored at -20 °C. Aliquots of 15 mg of freeze-dried skin secretion resuspended in 1 mL of TFA 0.1% in Milli-Q water. After centrifugation, aliquots of 200 µL of the supernatant were submitted to RP-HPLC using a C<sub>18</sub> column, resulting in elution of 20 chromatographic fractions. These fractions were manually collected, vacuum dried and tested to verify their antimicrobial activity, with several fractions showing inhibitory activity against pathogenic bacteria. The fractions with antimicrobial activity were analyzed by mass spectrometry. Four fractions (10, 14, 15 and 19) exhibited components with molecular masses of: 3061.567 Da; 2848.367 Da; 2849.389 Da and 1970.22 Da, respectively. These fractions were shown to be homogeneous and subjected to chemical sequencing by Edman degradation and, subsequently, to similar analyzes allowing the identification of one new phylloseptin and three new dermaseptins present in this skin secretion. It was also characterized in the present study a new ranateurin isolated from the skin secretion of the anuran *Lithobates palmipes*. The aim of the present study was advancing in the chemical and biological characterization of the arsenal of antimicrobial peptides present in the skin secretion of the anurans *P. rohdei* and *L. palmipes*.

**Keywords:** Anurans; *Lithobates palmipes*; *Pithecopus rohdei*; Antimicrobial peptides; Biological properties; Therapeutic potential.

## 1. Introdução

A resistência antimicrobiana (RAM) refere-se à capacidade dos microrganismos de resistirem aos efeitos dos antibióticos, fenômeno exacerbado pelo uso inadequado dessas drogas (PRESTINACI, 2015; MARSTON *et al*, 2016; MORRISON e ZEMBOWER, 2020). A emergência da RAM representa uma séria ameaça à saúde pública global, com estimativas indicando que, se não controlada, poderá causar até 10 milhões de mortes anuais até 2050, superando doenças como câncer e diabetes (O'NEILL, 2014, 2016; MORRISON e ZEMBOWER, 2020; MURRAY *et al*, 2022). O desenvolvimento de novos antibióticos tem diminuído significativamente desde a década de 1980, enquanto o número de infecções resistentes tem aumentado, resultando em um grande desafio para a ciência moderna. O grupo de patógenos ESKAPE, que inclui

*Enterobacter spp*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecium*, é responsável por infecções oportunistas graves em ambientes hospitalares. Reconhecendo a gravidade da situação, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu esses patógenos em uma lista de prioridade para o desenvolvimento de novas terapias, a fim de combater essas infecções resistentes e reduzir seu impacto na saúde global (ALOKE e ACHILONU, 2023; LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) apresentam características físico-químicas que os tornam eficazes na interação com microrganismos, como a presença predominante de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, carga líquida positiva, além de assumir conformação em alfa-hélice anfipática em ambiente apolar. Essas características permitem que tenham ação principalmente na membrana celular dos microrganismos, levando à desestabilização e rompimento da membrana celular (TEIXEIRA *et al*, 2012; CORAM *et al*, 2023; JI *et al*, 2024).

Os PAMs têm se revelado uma opção promissora para lidar com a ameaça constante e crescente representada pela resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos atualmente disponíveis e a secreção cutânea de anuros representa uma rica fonte dessas moléculas.. De acordo com o banco de dados de peptídeos antimicrobianos BDPA (*Antimicrobial Peptide Database*, APD, <https://aps.unmc.edu/>), acessado em fevereiro de 2024, existem 1.117 entradas referentes a peptídeos antimicrobianos de anuros.

O presente estudo descreve a caracterização química e biológica de peptídeos inéditos presentes na secreção cutânea dos anuros *Pithecopus rohdei* e *Lithobates palmipes*.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Coleta dos espécimes e extração da secreção cutânea

Foram coletados 11 exemplares machos adultos de *P. rohdei* em Santa Teresa no estado de Minas Gerais – Brasil, sob licença do ICMBIO (SISBIO no. 71054-1). A secreção cutânea foi obtida por estimulação elétrica de baixa intensidade e a secreção liberada foi coletada com água Milli-Q, congelada, liofilizada e armazenada em -20 °C até o uso. O procedimento de coleta da secreção foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso Animal da Universidade de Brasília.

### 2.2. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de *P. rohdei*

Alíquotas de 15 mg foram resuspendidas em 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% em água Milli-Q (solvente A), centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos, coletado o sobrenadante, a amostra foi filtrada, e foram injetados 200 microlitros, utilizando-se coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (Shimadzu Shim-pack CLC ODS 6,0 ID x 150 mm, 5 µm). Foi utilizado gradiente linear de TFA 0,1% em acetonitrila (ACN) (solvente B) nas seguintes proporções: 0 a 16% de solvente B em 5 minutos; 16% a 26% de solvente B em 10 minutos; 26% a 42% de solvente B em 16 minutos; 42% a 52% de solvente B em 10 minutos; 52% a 60% de solvente B em 8 minutos. A eluição das frações foi monitorada nos comprimentos de onda de 216 nm e 280 nm, sendo coletadas manualmente, secas a vácuo e armazenadas a -20 °C.

### 2.3. Screening de atividade antimicrobiana

Para verificar previamente a atividade antimicrobiana das frações cromatográficas coletadas, um ensaio antimicrobiano qualitativo foi realizado contra *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Foi utilizado o meio de cultivo caldo Mueller Hinton, para cultivo dos microrganismos, que foram incubados a 37 °C sob agitação. O experimento foi realizado em triplicata técnica na proporção de 50 µL de inóculo e 50 µL de amostras das frações cromatográficas para cada poço, totalizando 100 µL em cada poço. No controle positivo foi utilizado 50 µL de inóculo e 50 µL de formaldeído 0,4% (v/v) e no controle negativo 50 µL de inóculo e 50 µL de água Milli-Q. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e a quantificação do crescimento microbiano foi realizado por meio da leitura espectrométrica no comprimento de onda de 620 nm (Multiskan FC, Thermo Scientific, San Jose, CA).

### 2.4. Análises por espectrometria de massas

As frações cromatográficas com atividade antimicrobiana foram analisadas por MALDI-TOF/TOF modelo Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para análise das massas moleculares dos componentes presentes e o grau de homogeneidade das amostras, as frações foram resuspendidas em TFA 0,1% em 50 % ACN (v/v) e, em seguida, aplicadas em placa de aço inoxidável junto com uma matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 10 µg/µL em TFA 1% (v/v) em ACN na proporção de (1:1). O equipamento

foi calibrado utilizando o kit padrão “Pepmix”. A análise foi feita em modo positivo refletido e na faixa de 600 a 4000 m/z.

Também foram realizadas análise por LC/MS em equipamento Sciex Triple TOF 5600 LC-MS/MS.

### 2.5. Sequenciamento químico

Para se determinar a estrutura primária dos peptídeos purificados a partir da secreção cutânea de *P. rohdei*, os peptídeos identificados foram sequenciados pelo processo de degradação de Edman, utilizando um sequenciador de peptídeos e proteínas automático modelo PSSQ 33A (Shimadzu, Japão). A calibração do equipamento foi realizada com uma mistura padrão PTH-aminoácidos.

### 2.6. Síntese química do peptídeo ranateurina-2PMe da secreção cutânea de *Lithobates palmipes*

O peptídeo ranateurina-2PMe identificado na secreção cutânea de *L. palmipes* foi produzido por síntese química em fase sólida por estratégia Fmoc pela empresa especializada Genone (<https://www.genone.com.br/>).

### 2.7. Análises computacionais

Os bancos de dados utilizados para as buscas de similaridades foram BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e APD (<http://aps.unmc.edu/AP/>). Para o alinhamento das sequências, foi utilizada a ferramenta Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), NetWheels (<http://tools.alanmol.com.br/NetWheels/>) (MOR; CASTRO; FONTES, 2018), Pep-Fold 4 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD4/>), além de várias ferramentas disponíveis em <https://www.expasy.org/>, que foram utilizadas para obter as propriedades físico-químicas do peptídeos, projeções em alfa-hélices e predições de estrutura tridimensional (GASTEIGER et al., 2005).

### 2.8. Quantificação empregando espectroscopia UV

Amostras do peptídeo ranateurina-2PMe foram quantificadas com o emprego de espectroscopia UV nos comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm como descrito por AITKEN e LEARMONTH (1996) em espectrofotômetro (UV-M51, Bel Photonics, Brazil). Os peptídeos foram alíquotados, secos em concentrador à vácuo (SpeedVac Modelo SC100, Savant) e armazenados a -20 °C até o momento de sua utilização.

### 2.9. Atividade antimicrobiana do peptídeo ranateurina-2PMe

Para avaliar a atividade antimicrobiana do peptídeo ranateurin 2-PMe, foi testada a atividade contra as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e isolados clínicos resistentes de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, *Acinetobacter baumani* multirresistente, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina). Foram utilizados 200 µL de inóculo para em 7 mL do meio de cultura caldo Muller-Hinton, foram incubadas a 37 °C, sob agitação pelo período de 24 horas. Após o período de incubação, foi feita a leitura no comprimento de onda na faixa de 625 nm (UV-VIS SPECTROPHOTOMETER UV-MS1) para análise da densidade óptica. A suspensão foi diluída até 0,08 e 0,1 de absorvância. O inóculo foi diluído em 1:200 para cada variedade de bactéria testada. Para a avaliação da concentração mínima inibitória mínima (CIM) foram utilizadas 50 µL dos peptídeos na concentração inicial de 256 µM. As amostras foram diluídas em série e incubadas com 50 µL do inóculo de bactérias (faixa de concentração final empregada de 128 µM a 0,0625 µM) pelo período de 24 horas a 37 °C. A leitura das placas foram feitas a 620 nm em leitora de placas (Multiskan FC, Thermo Scientific, San Jose, CA).

### 2.10. Atividade citolítica em eritrócitos humanos do peptídeo ranateurina-2PMe

Para avaliar a atividade hemolítica do peptídeo sobre eritrócitos humanos foram utilizadas hemácias de um doador humano saudável, a amostra foi centrifugada e lavada quatro vezes com solução tampão Tris-HCl na concentração de 10 mM em pH 7,4 contendo 15 mM (Tampão-salina) para remover totalmente o plasma. Após, foi preparada uma suspensão 1% (v/v) de eritrócitos. Foram utilizadas alíquotas de 100 µL do peptídeo em suspensão em tampão-salina na concentração inicial de 256 µM e foram diluídos em série em tubos de 1,5 mL (faixa de concentração final empregada de 128 µM a 0,0625 µM). Foram incubados 100 µL de amostra de eritrócitos por 60 minutos a temperatura ambiente. Após o período de incubação os tubos foram centrifugados a 2.000 x g por 3 minutos. Alíquotas do sobrenadante de cada amostra foram transferidas para placa de 96 poços de fundo chato e foi feita a leitura a 405 nm em uma leitora de microplacas Multiskan FC

(Thermo Scientific, San Jose, CA). Foi utilizado 100 µL da suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) incubada com 100 µL de Triton X-100 1%(v/v) como controle de 100% de hemólise e 100 µL suspensão de eritrócitos a 1% incubada com 100 µL de tampão-salina como referência de 0% de hemólise Os resultados obtidos foram expressos em media ± DP. A porcentagem de hemólise foi calculada a partir da fórmula abaixo.

$$\% \text{ Hemólise} = 100 (A_{\text{peptídeo}} - A_{\text{Tris-salina}}) / (A_{\text{Triton}} - A_{\text{Tris-salina}})$$

Utilizando o programa GraphPad Prism v.5.04, foi possível calcular as concentrações capazes de promover 50% de hemólise e obter o gráfico resultante do experimento.

Todo procedimento adotado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

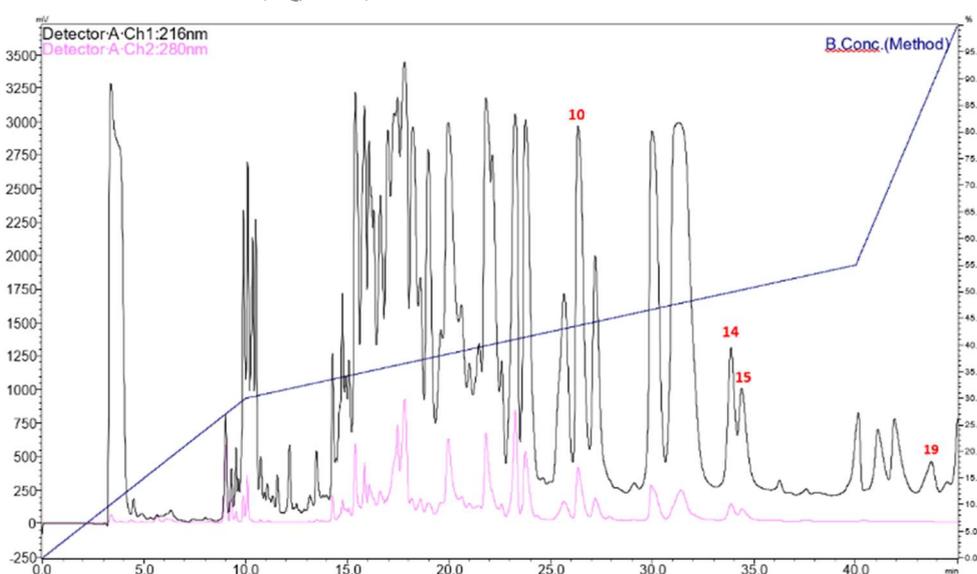
### 2.11. Atividade citotóxica do peptídeo ranateurina-2PMe

A atividade citotóxica da ranateurina-2PMe foi avaliada em queratinócitos humanos imortalizados, derivados de pele adulta HaCat e células de adenocarcinoma cervical humano HeLa (ATCC CCL-2). As linhagens celulares foram semeadas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo meio completo (meio Eagle modificado por Dulbecco suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e mantidas em uma incubadora a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram semeadas em uma densidade de 5 × 10<sup>3</sup>/poço em microplacas de 96 poços com meio completo durante a noite. Em seguida, as células foram tratadas com ranateurina-2PMe em diferentes concentrações e incubadas por 24 h a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. Para avaliação da atividade citotóxica, diluições do peptídeo foram feitas para obter concentrações de 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 e 0,5 µM. Após o período de incubação, alíquotas de 15 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Oregon, EUA) a 5 mg/mL em PBS, pH 7,4, e 135 µL de meio completo foram adicionados aos poços e incubados por 3 h. Os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), e o sinal de absorvância a 595 nm foi medido usando um leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). A concentração inibitória máxima (IC<sub>50</sub>) foi calculada usando o software GraphPad Prism (versão 5.04).

## 3. Resultados

### 3.1. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de *Pithecopus rohdei*

Esse estudo visou a caracterização química e biológica de peptídeos inéditos da secreção cutânea de *Pithecopus rohdei*. A secreção bruta de *P. rohdei* foi fracionada em RP-HPLC empregando-se uma coluna C<sub>18</sub> resultando na eluição de 20 frações cromatográficas que foram coletadas a partir do tempo de retenção correspondente a 30% de acetonitrila (Figura 1).



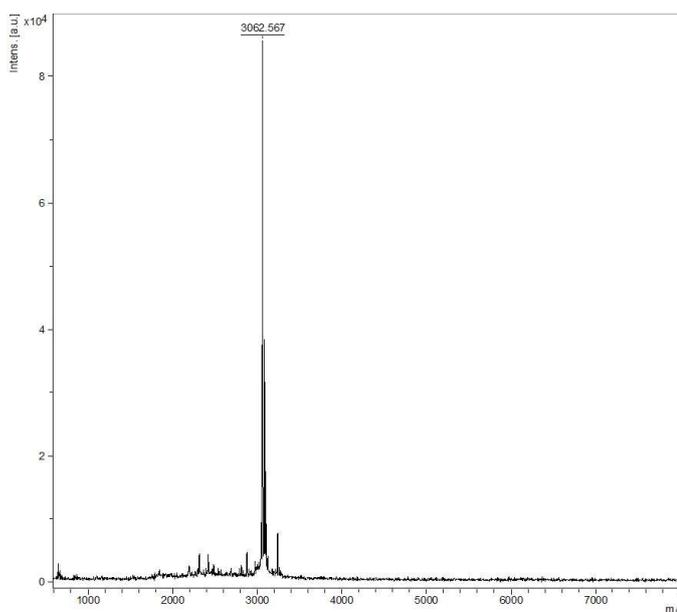
**Figura 1.** Perfil cromatográfico do fracionamento da secreção da pele do anuro *Pithecopus rohdei*. As frações cromatográficas indicadas em números em vermelho são as frações com atividade antimicrobiana identificadas no presente estudo.

### 3.2. Screening antimicrobiano das frações cromatográficas

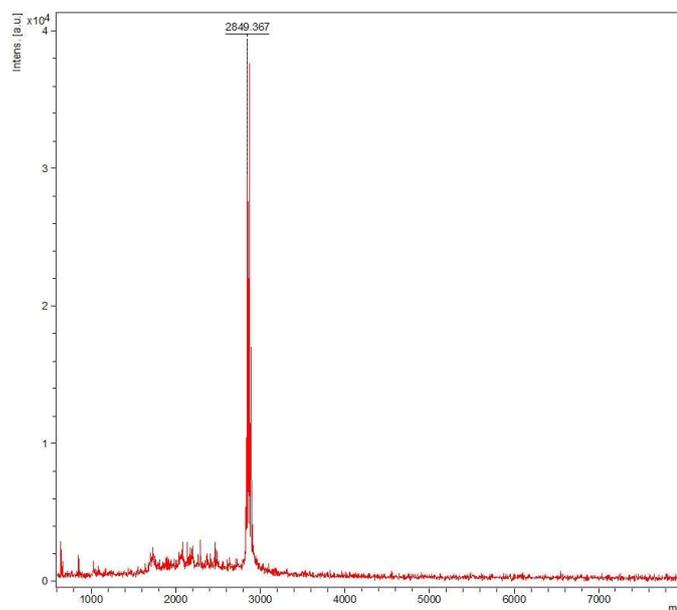
O screening antimicrobiano com os microrganismos *E. coli* e *S. aureus* permitiu identificar 10 frações cromatográficas com capacidade de inibir o crescimento bacteriano acima de 90%. Dentre as frações ativas, as frações 10, 14, 15 e 19 foram alvo do presente estudo por apresentarem maior grau de pureza e solubilidade.

### 3.3. Espectrometria de massas de frações cromatográficas ativas

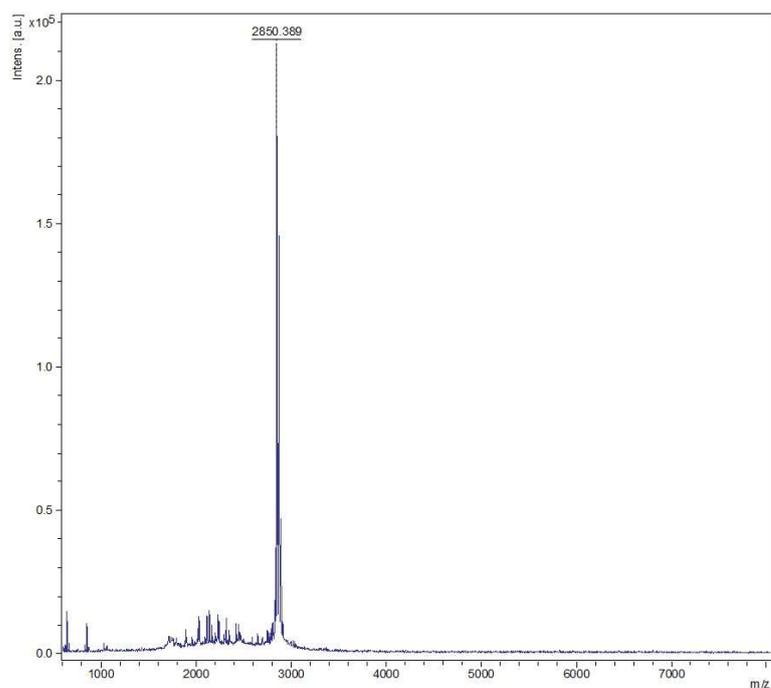
As frações cromatográficas 10, 14, 15 e 19 exibiram atividade antimicrobiana sobre os patógenos *E. coli* e *S. aureus* e mostraram-se homogêneas quando submetidas à análise por espectrometria de massas (Figuras 2 a 5).



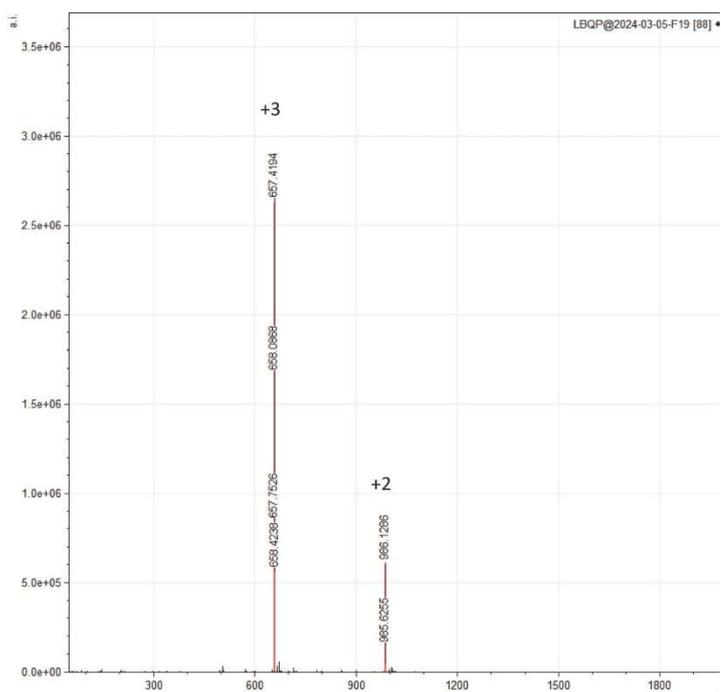
**Figura 2.** Espectro de massas da fração 10 obtida em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico).



**Figura 3.** Espectro de massas da fração 14 obtida em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico).



**Figura 4.** Espectro de massas da fração 15 obtida em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico).



**Figura 5.** Espectro de massas da fração 19 obtida em equipamento SiceX Triple TOF 5600 LC-MS/MS.

### 3.4. Determinação das estruturas primárias dos peptídeos ativos

As frações 10, 14, 15 e 19 apresentaram atividade antimicrobiana no *screening* e exibiram um maior grau de homogeneidade e foram submetidas ao sequenciamento químico por degradação de Edman, resultando em seqüências não ambíguas apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1.** Estruturas primárias e massas moleculares dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* identificados no presente trabalho.

Fração cromatográfica	Estrutura primária	Massa molecular calculada (Da)	Massa molecular observada (Da)
10	GLWKILAKGAGKVLGHVASKFLGSQGQPES	3062,7	3061,567
14	GLWKSLLKNVGVAAGKAALNAVTDIVNQ	2849,61	2848,367
15	ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLGAV	2850,6	2849,389
19	FLSLLPSIVSGAVSLVKKL	1970,22	1970,22

A massa molecular calculada e a massa molecular observada estão expressas na forma desprotonada.

### 3.5. Análises de similaridade dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei*

A sequência de resíduos de aminoácidos obtida com o sequenciamento químico da fração 19 (<sup>1</sup>FLSLLPSIVSGAVSLVKKL<sup>20</sup>) foi analisada na ferramenta *Compute pI/Mw* ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)), evidenciando ponto isoelétrico igual a 10.00 e massa monoisotópica 1970,22 Da., confirmando a massa observada nas análises de espectrometria de massa.

A busca por similaridade para esse peptídeo foi realizada pela ferramenta Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências encontradas com maior similaridade foram alinhadas com o emprego do algoritmo Clustal Ômega disponível em <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo> (Figura 6). Tal peptídeo foi denominado filoseptina-1PR.

Filoseptina-Az4	FLSLLPSIVSGAVSLAKKL	19
Filoseptina-H9	FLGLLPSIVSGAVSLVKKL	19
Filoseptina-1PR	FLSLLPSIVSGAVSLVKKL	19
Filoseptina-H8	FLSLLPSLVSGAVSLVKKL	19
	**.*****:*****.***	

**Figura 6.** Alinhamento múltiplo do peptídeo filoseptina-1PR isolado de *Pithecopus rohdei* com os peptídeos com maior similaridade: filoseptinas H8 e H9 de *Pithecopus hypochondrialis* e filoseptina Az4 de *Pithecopus azureus*. O símbolo “ \* ” representa resíduos de aminoácidos idênticos e “ : ” identifica regiões conservativas. As cores dos resíduos de aminoácidos representam suas propriedades físico-químicas: vermelho = apolar; verde = polar sem carga; rosa = básico; azul = ácido.

A fração 10 (<sup>1</sup>GLWKILAKGAGKVLGHVASKFLGSQGQPES<sup>30</sup>) corresponde a um análogo natural do peptídeo dermaseptina-1PR previamente isolada por SANTOS (2023), onde se observa apenas a substituição de um resíduo de metionina na posição 5 no peptídeo dermaseptina-1PR por um resíduo de isoleucina no peptídeo descrito nesse trabalho (Figura 7). As demais frações cromatográficas (frações 14 e 15) corresponderam a peptídeos da família das dermaseptinas, após buscas feitas com Blast, e os alinhamentos múltiplos estão exibidos nas figuras 8 a 10.

Fração 10	GLWKILAKGAGKVLGHVASKFLGSQGQPES	30
Dermaseptina-1PR	GLWKMLAKGAGKVLGHVASKFLGSQGQPES	30
Dermaseptina-S11	ALWKTLLKGAGKVFVGHVAKQFLGSQGQPES	30
Dermaseptina-3.1TR	GLFKTLIKGAGKMLGHVAKQFLGSQGQPES	30
Dermaseptina-3.2TR	GLFKTLIKGAGKMLGHVAKQFLGSQGQPES	30
	*:* * *****:***** :*****	

**Figura 7.** Alinhamento múltiplo entre o peptídeo isolado a partir da fração 10 resultante do fracionamento cromatográfico da secreção cutânea do anuro *Pithecopus rohdei* com a dermaseptina-1PR previamente isolada por SANTOS (2023) e outras dermaseptinas identificadas em buscas por similaridade. O asterisco (\*) indica resíduos idênticos e dois pontos (:) indica substituição conservativa. As cores dos resíduos de aminoácidos representam suas propriedades físico-químicas: vermelho = apolar; verde = polar sem carga; rosa = básico; azul = ácido.

Fração 10	GLWKILAKGAGKVLGHVASKFLGSQGQPES	30
Fração 14	GLWKSLLKNVGVAAAGKAALNAVTDIVNQ--	28
Fração 15	ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLAGAV-	29
	*** : * * * * :	

**Figura 8.** Alinhamento múltiplo dos peptídeos da família das dermaseptinas identificadas na secreção cutânea do anuro *Pithecopus rohdei*. O asterisco (\*) indica resíduos idênticos e dois pontos (:) indica substituição conservativa. As cores dos resíduos de aminoácidos representam suas propriedades físico-químicas: vermelho = apolar; verde = polar sem carga; rosa = básico; azul = ácido.

Dermaseptina-J9	GLWKSLLKNVGVAAAGKAALNAVTDIMVNQS	29
Dermaseptina-J8	GLWKSLLKNVGVAAAGKAALNAVTDIMVNQA	29
Fração 14	GLWKSLLKNVGVAAAGKAALNAVTDIVNQ-	28
Dermaseptina-H1	GLWKSLLKNVGVAAAGKAALNAVTDIMVNQ-	28
	***** *****:***	

**Figura 9.** Alinhamento múltiplo entre o peptídeo isolado a partir da fração 14 resultante do fracionamento cromatográfico da secreção cutânea do anuro *Pithecopus rohdei* com outras dermaseptinas identificadas em buscas por similaridade. O asterisco (\*) indica resíduos idênticos e dois pontos (:) indica substituição conservativa. As cores dos resíduos de aminoácidos representam suas propriedades físico-químicas: vermelho = apolar; verde = polar sem carga; rosa = básico; azul = ácido.

Fração 15	ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLAGAV-	29
Dermaseptina-6TR	ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLVGA--	28
Dermaseptina-DI4	ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLVGAES	30
Dermaseptina-B3	ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLVGAE-	29
	***** ***** **	

**Figura 10.** Alinhamento múltiplo entre o peptídeo isolado a partir da fração 15 resultante do fracionamento cromatográfico da secreção cutânea do anuro *Pithecopus rohdei* com outras dermaseptinas identificadas em buscas por similaridade. O asterisco (\*) indica resíduos idênticos e dois pontos (:) indica substituição conservativa. As cores dos resíduos de aminoácidos representam suas propriedades físico-químicas: vermelho = apolar; verde = polar sem carga; rosa = básico; azul = ácido.

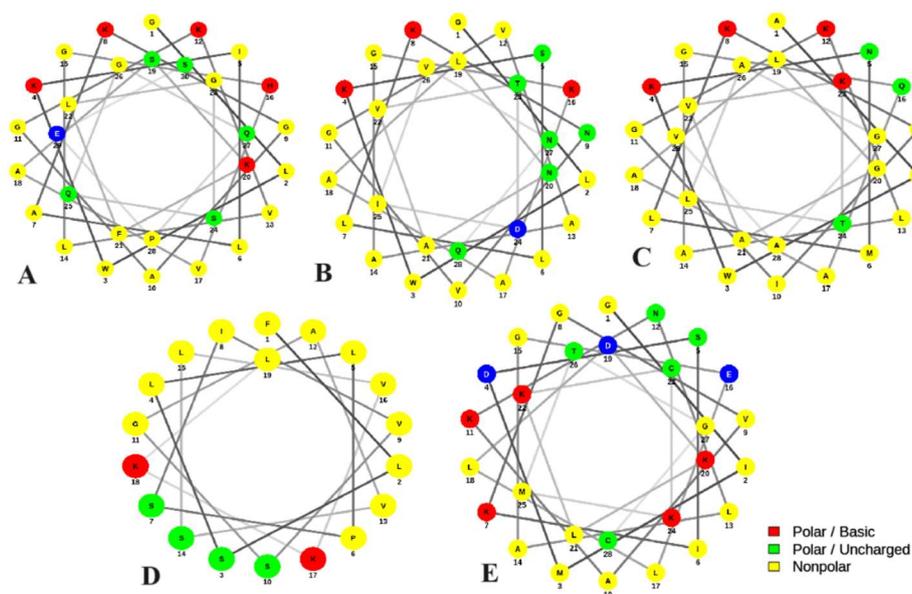
### 3.6. Caracterização das propriedades físico-químicas dos peptídeos de *P. rohdei* e de *L. palmipes*

O peptídeo ranateurina 2-PMe foi previamente isolado por BARBOSA (2024, resultados não publicados) a partir da secreção cutânea do anuro *Lithobates palmipes* e possui em sua estrutura 28 resíduos de aminoácidos (<sup>1</sup>GIMDSIKGVAKNLAGELLDKLCCKMTGC<sup>28</sup>), tendo na porção C-terminal a presença de dois resíduos de cisteína unidos por uma ponte dissulfeto o que caracteriza a família das ranateurinas. A figura 11 exibe o alinhamento da ranateurina 2-PMe com outras duas ranateurinas recentemente identificadas na secreção dessa mesma espécie por Mechkarska *et al* (2023).

Ranateurina-2PMc	GIMDSIKGVAKNLAGQLLDKLCCKITGC	28
Fração 19	GIMDSIKGVAKNLAGELLDKLCCKMTGC	28
Ranateurina-2PMd	GIMDSIKGVAKNLAGELLDKLCCKITGC	28
	***** *****:***	

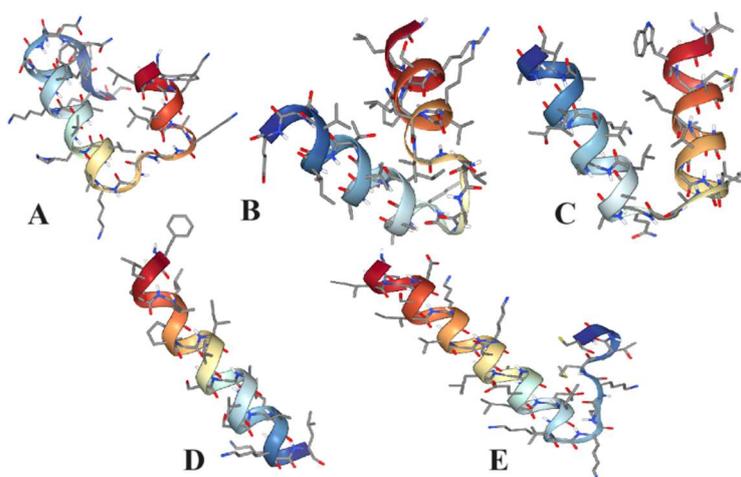
**Figura 11.** Alinhamento múltiplo da ranateurina 2-PMe (identificada na figura como fração 19) isolada da secreção cutânea de *L. palmipes* com outros dois peptídeos antimicrobianos descritos por MECHKARSKA *et al* (2023). O asterisco (\*) indica resíduos idênticos e dois pontos (:) indica substituição conservativa. As cores dos resíduos de aminoácidos representam suas propriedades físico-químicas: vermelho = apolar; verde = polar sem carga; rosa = básico; azul = ácido.

As análises das projeções em roda helicoidal revelaram que os peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* e *L. palmipes* tendem a formar  $\alpha$ -hélices anfipáticas (Figura 12). Os peptídeos antimicrobianos analisados apresentaram cargas líquidas variando de +2 a +4, sendo elas, a fração 15 com carga líquida +4, a fração 10 com carga positiva +3, enquanto as frações 14, peptídeo filoseptina-1PR e o peptídeo ranateurina 2-PMe mostraram carga líquida +2 (Tabela 2). É possível verificar que todos os peptídeos apresentam uma face hidrofóbica, representada pela cor amarela, em oposição a uma face hidrofílica (Figura 12).



**Figura 12.** Projeções em roda helicoidal (projeções de Schiffer-Edmundson) dos peptídeos presentes nas frações cromatográficas 10 (A), 14 (B), 15 (C), 19 (D) e do peptídeo ranaturina 2-PMe (E). Resíduos básicos na cor vermelha; ácidos na cor azul; polares sem carga na cor verde e apolares na cor amarela.

A predição da estrutura tridimensional foi realizada utilizando o programa Pep-Fold 4 e possibilitou verificar que todos os peptídeos antimicrobianos estudados apresentam estruturas secundárias similares (Figura 13), com uma tendência à formação de  $\alpha$ -hélices.



**Figura 13.** Modelo tridimensionais teóricos dos peptídeos presentes nas frações cromatográficas 10 (A), 14 (B), 15 (C), 19 (D) e do peptídeo ranaturina 2-PMe (E). A região em vermelho mais eletronegativa (N-terminal) e região em azul mais eletropositiva (C-terminal).

**Tabela 2.** Parâmetros físico-químicos dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* e *L. palmipes*

Peptídeo	PI <sup>a</sup>	Carga líquida	GRAVY <sup>b</sup>	Razão hidrofóbica	Face hidrofóbica
Fração 10	10,00	+3	-0,010	40%	VAPWFL
Fração 14	9,70	+2	0,454	54%	WAALIA
Fração 15	10,48	+4	0,697	59%	AIAWAALLA
Fração 19	10,00	+2	1,458	58%	FLALVVLVP
Ranaturina 2-PMe	8,79	+2	0,150	46%	LACMLA

<sup>a</sup>PI – Ponto isoelétrico

<sup>b</sup>GRAVY – Índice médio de hidropaticidade.

### 3.7. Caracterização das propriedades biológicas da ranateurina-2PMe

A atividade antimicrobiana da ranateurina-2PMe foi avaliada contra as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e isolados clínicos resistentes de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*). Os gráficos retratando a relação dose-resposta do peptídeo sobre as bactérias testadas estão apresentados nas figuras 14 a 19 e os valores de CIM determinados para essas bactérias estão apresentados na tabela 3.

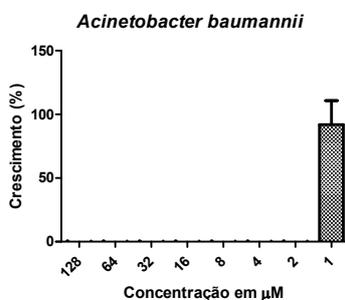


Figura 14. Atividade antimicrobiana do peptídeo ranateurina-2PMe sobre a bactéria patogênica *Acinetobacter baumannii* multirresistente.

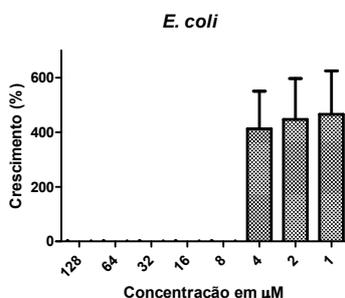


Figura 15. Atividade antimicrobiana do peptídeo ranateurina-2PMe sobre a bactéria patogênica *Escherichia coli* ATCC 25922.

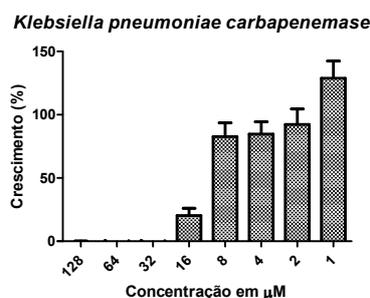


Figura 16. Atividade antimicrobiana do peptídeo ranateurina-2PMe sobre a bactéria patogênica *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

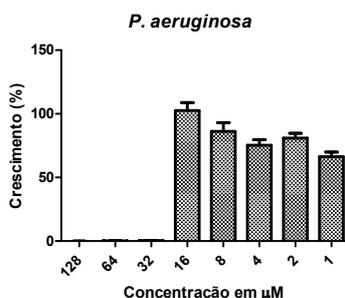
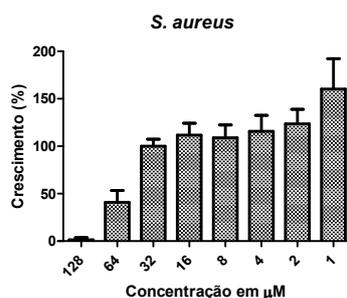
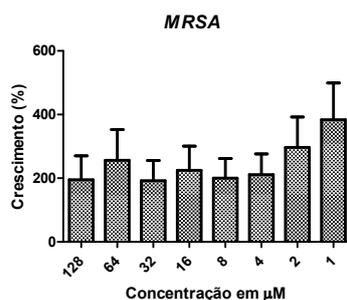


Figura 17. Atividade antimicrobiana do peptídeo ranateurina-2PMe sobre a bactéria patogênica *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.



**Figura 18.** Atividade antimicrobiana do peptídeo ranaturina-2PMe sobre a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



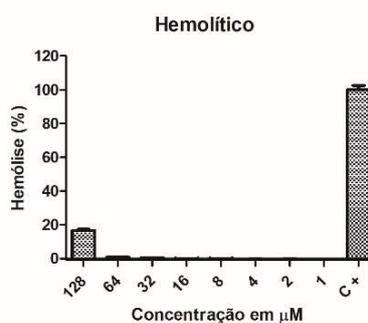
**Figura 19.** Atividade antimicrobiana do peptídeo ranaturina-2PMe sobre a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina.

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana (CIM, µM) do peptídeo ranaturina-2PMe.

Microrganismo	Ranaturina-2PMe
<i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente	2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase	32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	128
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina	NA

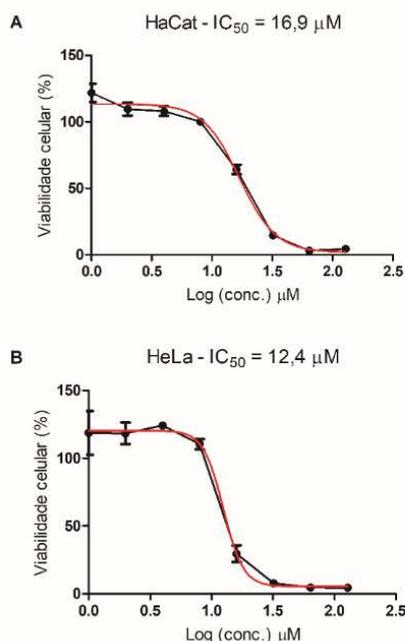
NA: O peptídeo não foi capaz de inibir o crescimento do patógeno mesmo na maior concentração empregada (128 mM).

Também foi avaliada a atividade hemolítica da ranaturina-2PMe sobre eritrócitos humanos resultando em uma baixa atividade hemolítica mesmo na maior concentração empregada, (128 µM) com taxa de hemólise abaixo de 16% (Figura 20).



**Figura 20.** Atividade hemolítica do peptídeo ranaturina-2PMe sobre eritrócitos humanos. C+ = controle positivo Triton X-100 1%(v/v).

Finalmente foi feita a avaliação dos efeitos citotóxicos da ranaturina-2PMe sobre a linhagem tumoral adenocarcinoma cervical humano HeLa e sobre a linhagem não-tumoral de queratinócitos humanos imortalizados HaCat com valores de IC<sub>50</sub> iguais a 12,4 µM e 16,9 µM, respectivamente (Figura 21).



**Figura 21.** Atividade antiproliferativa do peptídeo ranaturina-2PMe sobre linhagem celular tumoral HeLa e sobre a linhagem celular não-tumoral HaCat.

#### 4. Discussão

Em virtude da acentuada emergência de microrganismos que apresentam mecanismos de resistência aos antibióticos convencionais atualmente disponíveis, faz-se necessário a busca e o desenvolvimento de novas drogas com efetiva atividade antimicrobiana. Além da necessidade de novos medicamentos, é necessário que sejam desenvolvidas drogas com novos mecanismos de ação, uma vez que a utilização de drogas com o mesmo mecanismo de ação é um agravante para a emergência de resistência antimicrobiana.

As bactérias Gram-negativas são um desafio ainda maior ao se tratar de bactérias resistentes às drogas, pois além da presença de uma membrana plasmática, estas possuem uma parede celular e a presença de lipopolisacarídeos ancorados nessa estrutura (GAUBA e RAHMAN, 2023).

O presente estudo abrangeu a caracterização de peptídeos antimicrobianos de anuros que são endêmicos da fauna brasileira, espécies animais que precisam ser protegidas, tanto do ponto de vista da preservação da biodiversidade, quanto em virtude de sua importância científica na busca de novas drogas terapêuticas, em função de uma secreção cutânea riquíssima em compostos bioativos (CHEN *et al*, 2006).

A espécie de anuro *Pithecopus rohdei* começou a ser estudada há algumas décadas, no entanto, nos estudos iniciais, a coleta do material biológico era feita abatendo-se o animal, retirando-se sua pele e fazendo um extrato para a obtenção dos compostos ativos. Atualmente, a metodologia mais utilizada é por meio da aplicação de estímulos elétricos de baixa intensidade no animal com a consequente coleta da secreção liberada, sem dano persistente ao animal (CHEN *et al*, 2006). Por meio do fracionamento da secreção cutânea da pele de anuros são obtidas potenciais moléculas com atividade antimicrobiana com elevado grau de pureza. Muitos PAMs já foram descritos dentre as espécies das famílias Hylidae e Ranidae, que são bastante extensas e amplamente distribuídas (CONLON, 2011).

Dentre os peptídeos identificados no presente estudo, as filoseptinas compõem uma grande família de peptídeos antimicrobianos encontrada em espécies dos gêneros *Pithecopus* e *Phyllomedusa* da família Hylidae. Essa família de peptídeos é composta por PAMs que foram identificados na secreção cutânea de anuros da subfamília *Phyllomedusinae*, com algumas características similares, como alto grau de conservação na região N-terminal, sequência de aminoácidos com cerca de 19-21 resíduos e a presença comum de amidação na região

C-terminal, além de exibirem estrutura em alfa-hélice em ambiente hidrofóbico (LIU *et al*, 2017).

Essa família de peptídeos exibe atividade antibacteriana significativa contra várias cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de atividade antiparasitária contra protozoários, como *Trypanosoma cruzi*. As filoseptinas têm uma estrutura anfipática e catiônica, características que facilitam sua interação com as membranas celulares dos patógenos, promovendo a desestabilização e a lise das células. A eficácia desses peptídeos, juntamente com sua baixa toxicidade para células humanas, sugere seu potencial como agentes terapêuticos contra infecções bacterianas e protozoárias (LEITE *et al*, 2005).

O peptídeo filoseptina 1-PR apresentou 90% de similaridade com os peptídeos phylloseptin-H8; phylloseptin-Az4 e phylloseptin-H9 (termos utilizados no banco de dados UniProt), exibindo uma substituição de um resíduo de serina por glicina, na posição 3 em phylloseptina-H9, outra substituição de uma isoleucina por leucina, na posição 8 em phylloseptina-H8 e, por fim, uma substituição de uma valina por alanina na posição 16 na phylloseptina-Az4.

As frações correspondentes às 3 dermaseptinas identificadas nesse estudo ainda não foram sinterizadas até o momento e, portanto, não tiveram suas atividades biológicas avaliadas. A caracterização da atividade biológica desses peptídeos será feita posteriormente.

As dermaseptinas são peptídeos antimicrobianos caracterizados por sua estrutura anfipática e catiônica, o que lhes confere uma forte interação com as membranas celulares dos patógenos. Estruturalmente, as dermaseptinas possuem de 24 a 34 resíduos de aminoácidos, formando uma alfa-hélice quando em ambientes hidrofóbicos, como membranas celulares. A porção N-terminal das dermaseptinas é geralmente carregada positivamente, facilitando a atração eletrostática com as membranas negativamente carregadas dos microrganismos. Essa conformação helicoidal anfipática permite que as dermaseptinas se insiram nas membranas celulares, promovendo a desestabilização e a lise das células-alvo, um mecanismo crucial para sua atividade antimicrobiana. Além disso, a diversidade de sequência entre diferentes dermaseptinas contribui para sua ampla gama de atividades biológicas contra bactérias, fungos e parasitas (NICOLAS & EL AMRI, 2009).

No banco de dados UniProt existem 188 entradas de peptídeos classificados como dermaseptinas. As dermaseptinas fazem parte de uma grande família de peptídeos antimicrobianos, sendo o principal conjunto de moléculas na subfamília *Phyllomedusinae*, especula-se que é uma família que ocorre apenas nesse grupo taxonômico.

Um dos objetivos adicionais deste trabalho foi o de avaliar os efeitos biológicos do peptídeo ranateurina-2PMe identificado na espécie *Lithobates palmipes* sobre patógenos de importância médica e sobre células de mamíferos.

A classificação taxonômica da espécie *L. palmitis* adotada neste estudo foi proposta por FROST *et al* (2006), no entanto, YUAN *et al* (2016), mostrou que essa classificação causava divergência com outros clados, tendo assim determinando que *Lithobates* é um subgênero dentro do grupo *Rana* (YUAN *et al*, 2016). As características físico-química da molécula, como sua estrutura primária apresentando um resíduo do aminoácido cisteína na região C-terminal e outra na posição 22, formam uma alça de um hexapeptídeo (PARK *et al*, 1995; GORAYA *et al*, 1998).

O peptídeo ranateurina-2PMe teve sua atividade biológica testada contra alguns patógenos de interesse médico, em especial, microrganismos integrantes do grupo ESKAPE. As bactérias testadas foram: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), *Acinetobacter baumannii* multirresistente e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA).

Os resultados obtidos no ensaio antimicrobiano revelaram que esse peptídeo possui maior efetividade contra microrganismos Gram-negativos, apresentando os seguintes valores de CIM: *P. aeruginosa* MR 32 µM, *E. coli* 8 µM, KPC 32 µM, *A. baumannii* MR 2 µM, *S. aureus* 128 µM e não apresentou atividade sobre MRSA.

O peptídeo mostrou atividade biológica antimicrobiana em uma baixa concentração, que é muito interessante do ponto de vista farmacológico. Dentro do gênero *Acinetobacter*, *A. baumannii* é a espécie de maior importância médica e o mais patogênico no grupo das infecções adquiridas em ambientes hospitalares. Estima-se que 20% das infecções dentro de UTIs são causadas por esse microrganismo (OYEJOBI *et al*, 2022). Como observado na tabela 3, a bactéria *Acinetobacter baumannii* multirresistente teve sua CIM em 2 µM, que é uma concentração baixa. Em um estudo realizado por Conlon *et al* foi observado valores de CIM próximos para peptídeos derivados de anuros (CONLON *et al*, 2011).

Helbing e colaboradores testaram a atividade antimicrobiana de 6 peptídeos, sendo 2 deles peptídeos inéditos. No entanto, os peptídeos testados, HP3 e HP5 identificados na pele de *Rana [Lithobates] catesbeiana*, não apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*. Já para o outro microrganismo testado, *Mycobacterium smegmatis*, o peptídeo HP3 apresentou CIM de 4-14  $\mu\text{M}$ , semelhante ao valor de CIM do peptídeo HP/Ranateurina-1, que é de 2-12  $\mu\text{M}$ . Já o peptídeo HP5 apresentou CIM de 66  $\mu\text{M}$  (HELHING *et al*, 2019).

No caso de peptídeos testados contra *S. aureus*, a ranateurina 1 mostrou valor de CIM de 50  $\mu\text{M}$ , as ranateurinas 2 e 3 apresentaram valor de 60  $\mu\text{M}$ , a ranateurina 4, 55  $\mu\text{M}$  e a ranateurina 6, 100  $\mu\text{M}$  todos valores abaixo dos obtidos no presente estudo. Já os peptídeos ranateurina 7 mostrou CIM de 200  $\mu\text{M}$  e ranateurinas 8 e 9 mostraram valores de 130  $\mu\text{M}$ . O CIM de ranateurina 5 foi superior a 200  $\mu\text{M}$  (GORAYA *et al*, 1998).

A avaliação dos efeitos citotóxicos da ranateurina-2PMe sobre a linhagem tumoral HeLa e sobre a linhagem não-tumoral HaCat revelou efeitos citotóxicos, mas sem especificidade. Em relação à atividade hemolítica, o peptídeo mostrou-se não-hemolítico.

Todas os peptídeos caracterizados no presente estudo exibem, na projeção em roda helicoidal, uma face hidrofóbica em oposição a uma face hidrofílica, cumprindo requisitos importantes para a interação dos PAMs com a membrana plasmática das bactérias (DUONG *et al*, 2021).

O peptídeo ranateurina-2PMe mostrou atividade antibacteriana contra microrganismos Gram-negativos, o que é uma propriedade relevante dada a capacidade dessas bactérias em resistir a agentes antimicrobianos. Pode-se destacar sua efetividade contra microrganismos *A. baumannii* e *E. coli*, onde observou-se valores de CIM de 2  $\mu\text{M}$  e 8  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Também constatou-se que, nessas concentrações, o peptídeo mostrou-se não ser hemolítico, o que é relevante devido ao fato de não ser exibir toxicidade contra as células do hospedeiro, neste caso, o ser humano. A ranateurina-2PMe pode ser um candidato no desenvolvimento de drogas para o tratamento de infecções causadas por esses patógenos.

*A. baumannii* causa uma variedade de infecções, na pele, tecidos moles, infecções de feridas, bacteremia, endocardite, infecções no trato urinário, meningite e pneumonia. A infecção nosocomial mais frequente é a pneumonia, associada com pacientes com respiração mecânica, podendo chegar a taxa de 70% de ocorrência. A mortalidade por infecções sanguíneas por este microrganismo varia entre 28 a 43%. Sua incidência mundial é de cerca de 100.000.000 de casos de infecções ao ano e, deste valor, 50% são de variedades resistentes aos carbapenêmicos, sendo este o primeiro medicamento para tratar infecções por esta bactéria. (IBRAHIM *et al*, 2021; LOYOLA-CRUZ *et al*, 2023).

*E. coli* é um microrganismo que habita de forma comensal a microbiota intestinal dos seres humanos. No entanto, é capaz de causar infecções tanto fora quanto dentro do sistema digestório. Por ser uma bactéria que vive no lúmen gastrointestinal, está suscetível ao contato frequente com medicamentos antibióticos e, conseqüentemente, exposto ao uso de antibióticos de forma indevida, propiciando a seleção de mecanismos de RAM (RILEY, 2020). Seu rápido tempo de reprodução, cerca de 20 minutos, associado com a eficaz capacidade de adquirir material genético extracelular, torna a *E. coli* um microrganismo de notável importância médica (TORTORA *et al*, 2017). É o microrganismo mais comum a causar infecções na corrente sanguínea (LEIMBACH *et al*, 2013; JANG *et al*, 2017). Também tem se mostrado capaz de desenvolver biofilme (KOBAYASHI *et al*, 2021). Grande parte das infecções em seres humanos é causada por bactérias formadoras de biofilmes e os PAMs podem ser uma opção eficaz para lidar com o biofilme, já que apresentam atividade bactericida de amplo espectro (SHAHROUR *et al*, 2019).

De acordo com as análises estruturais do peptídeo ranateurina-2PMe é possível verificar que esse peptídeo tem tendência a adotar conformação em alfa-hélice, organização adotada para os demais peptídeos avaliados no presente estudo.

## 5. Conclusão

No presente estudo, foi realizada a purificação e a caracterização química de quatro peptídeos antimicrobianos identificados do anuro endêmico da Mata Atlântica *Pithecopus rohdei*, sendo um dos peptídeos pertencente à família das filoseptinas e os outros três peptídeos incluídos na família das dermaseptinas. O presente estudo não abrangeu à caracterização biológica dessas moléculas que será feita posteriormente.

A ranateurina-2PMe é um peptídeo inédito que foi isolado do anuro *Lithobates palmipes*. Foi realizada a caracterização da sua atividade biológica sobre bactérias patogênicas mostrando-se mais efetivo contra

bactérias Gram-negativas das espécies *A. baumannii* e *E. coli*. Também exibiu potencial citotóxico sobre células HeLa e HaCat, mas sem especificidade. O ensaio hemolítico realizado mostrou baixa atividade sobre eritrócitos humanos, o que é interessante do ponto de vista farmacológico, devido à possibilidade de desenvolvimento de fármacos que não sejam prejudiciais ao organismo hospedeiro.

Assim, foi possível avançar na caracterização química e biológica do arsenal de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção da pele dos anuros *P. rohdei* e *L. palmipes*, destacando-se os efeitos do peptídeo ranateurina-2PMe sobre microrganismos patogênicos do grupo ESKAPE e sua atividade citotóxica sobre a linhagem de células tumorais HeLa.

## 6. Referências

- AITKEN, A., LEARMONTH, M. The Protein Protocols Handbook. Molecular Biotechnology, v. 4, p. 17-24, 1996.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 10<sup>a</sup>. ed. 2018.
- ALOKE, C., ACHILONU, I. Coping with the ESKAPE pathogens: Evolving strategies, challenges and future prospects. **Microb Pathog.**, v. 175, p. 105963, 2023.
- CHEN, T., ZHOU, M., GAGLIARDO, R., WALKER, B., SHAW, C. Elements of the granular gland peptidome and transcriptome persist in air-dried skin of the South American orange-legged leaf frog, *Phyllomedusa hypocondrialis*. **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2129-2136, 2006.
- CONLON, J. M. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 68, p. 2303–2315, 2011.
- DUONG, L., GROSS, S. P., SIRYAPORN, A. Developing antimicrobial synergy with AMPs. **Front Med Technol.**, v. 3, p. 640981, 2021.
- FROST, D. R., GRANT, T., FAIVOCIH, J., BAIN, R. H., CÉLIO, HAAS, A., HADDAD, C. F. B., DE SÁ, R. O., CHANNING, A., WILKINSON, M., DONNELLAN, S. C., RAXWORTHY, C. J., CAMPBELL, J, A. BLOTTO, B. L., MOLER, P., DREWES, R. C., NUSSBAUM, R. A., LYNCH, J. D., GREEN, D. M., WHEELER, W. C. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 297, p. 1-291, 2006.
- GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTIKER, A., WILKINS, M. R., APPEL, R. D., BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In The Proteomics Protocols Handbook; Walker, J.M., Ed.; Springer Protocols Handbooks; Humana Press: Totowa, NJ, USA, p. 571–607, 2005.
- GAUBA, A., RAHMAN, K. M. Evaluation of antibiotic resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. **Antibiotics (Basel)**, v. 12, p. 1590, 2023.
- GORAYA, J., KNOOP, F. C., CONLON, J. M. Ranatuerins: antimicrobial peptides isolated from the skin of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 250, n. 3, p. 589-592, 1998.
- HELBING, C. C, HAMMOND, S. A., JACKMAN, S. H., HOUSTON, S., WARREN, R. L. CAMERON, C. E., BIROL, I. Antimicrobial peptides from *Rana [Lithobates] catesbeiana*: Gene structure and bioinformatic identification of novel forms from tadpoles. **Sci Rep.**, v. 9, p. 1529, 2019.
- IBRAHIM, S., AL-SARYI, N., AL-KADMY, I. M. S., AZIZ, S. N. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. **Mol Biol Rep.**, v. 48, p. 6987-6998, 2021.
- KOBAYASHI, T., IKEDA, M., OKADA, Y., HIGURASHI, Y., OKUGAWA, S., MORIYA, K. Clinical and microbiological characteristics of recurrent *Escherichia coli* bacteremia. **Microbiol Spectr.**, v. 9, p. e0139921, 2021.
- JANG, J., HUR, H. G., SADOWSKY, M. J., BYAPPANAHALLI, M. N., YAN, T., ISHII, S. Environmental *Escherichia coli*: Ecology and public health implications-a review. **J Appl Microbiol.**, v. 123, p. 570-581, 2017.
- LEIMBACH, A., HACKER, J., DOBRINDT, U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v. 358, p. 3-32, 2013.
- LEITE, J. R., SILVA, L. P., RODRIGUES, M. I., PRATES, M. V., BRAND, G. D., LACAVA, B. M., AZEVEDO, R. B., BOCCA, A. L., ALBUQUERQUE, S., BLOCH, C. Jr. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti- protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides**, v. 26, n. 4, p. 565-573, 2005.
- LIU, J., WU, Q., LI, L., XI, X., WU, D., ZHOU, M., CHEN, T., SHAW, C., WANG, L. (2017). Discovery of phylloseptins that defense against Gram-positive bacteria and inhibit the proliferation of the non-small cell lung

cancer cell line, from the skin secretions of Phyllomedusa frogs. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1428, 2017.

LOYOLA-CRUZ, M. Á., GONZALEZ-AVILA, L. U., MARTÍNEZ-TREJO, A., SALDAÑA-PADILLA, A., HERNÁNDEZ-CORTEZ, C., BELLO-LÓPEZ, J. M., CASTRO-ESCARPULLI, G. ESKAPE and beyond: The burden of coinfections in the COVID-19 pandemic. **Pathogens**, v. 12, n. 5, p. 743, 2023.

MARSTON, H. D., DIXON, D. M., KNISELY, J. M., PALMORE, T. N., FAUCI, A. S. Antimicrobial resistance. **JAMA**, v. 316, n. 11, p. 1193–1204, 2016.

MECHKARSKA, M., BARRAN, G., KOLODZIEJEK, J., COQUET, L., LEPRINCE, J., JOUENNE, T., NOWOTNY, N., CONLON, J. M. Peptidomic analysis of the host-defense peptides in skin secretions of the Amazon River frog *Lithobates palmipes* (Ranidae). **Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics**, v. 46, p. 101069, 2023.

MORRISON, L., & ZEMBOWER, T. R. Antimicrobial resistance. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 619–635, 2020.

MURRAY, C et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. **Lancet**. v.399, n. 10325, p.629–655, 2022.

Nicolas, P., & EL AMRI, C. The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1788, n. 8, p. 1537-1550, 2009.

O'NEILL, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. Disponível em: <[https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)>. 2014.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Disponível em: <<https://apo.org.au/sites/default/files/resource-files/2016-05/apo-nid63983.pdf>>. 2016.

OYEJOBI, G. K., OLANIYAN, S. O., YUSUF, N. A., OJEWANDE, D. A., AWOPETU, M. J., OYENIRAN, G. O., KHAN, F. M., DARE, P. A., ADEGBITE-BADMUS, M. K. *Acinetobacter baumannii*: More ways to die. **Microbiol Res**. v. 261, p. 127069, 2022.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 7, p. 309, 2015.

RILEY, L. W. Distinguishing pathovars from nonpathovars: *Escherichia coli*. **Microbiol Spectr.**, v. 8, p. 10.1128, 2020.

SHAHROUR, H., FERRER-ESPADA, R., DANDACHE, I., BÁRCENA-VARELA, S., SÁNCHEZ-GÓMEZ, S., CHOKR, A., MARTINEZ-DE-TEJADA, G. AMPs as anti-biofilm agents for human therapy and prophylaxis. **Adv Exp Med Biol.**, v. 1117, p. 257-279, 2019.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 12ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

YUAN, Z. Y., ZHOU, W. W., CHEN, X., POYARKOV, N. A. Jr., CHEN, H. M., JANG-LIAW, N. H., CHOU, W. H., MATZKE, N. J., IIZUKA, K., MIN, M. S., KUZMIN, S. L., ZHANG, Y. P., CANNATELLA, D. C., HILLIS, D. M., CHE, J. Spatiotemporal diversification of the true frogs (Genus *Rana*): A historical framework for a widely studied group of model organisms. **Syst Biol.**, v. 65, n. 5, p. 824-842, 2016.

## 5. Perspectivas Futuras

O presente trabalho tem como perspectivas futuras:

- ✓ Produzir por síntese química os peptídeos antimicrobianos identificados na secreção cutânea do anuro *P. rohdei*.
- ✓ Avaliar os efeitos antimicrobianos dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* em microrganismos resistentes pertencentes ao grupo ESKAPE e seus possíveis efeitos sinérgicos com antibióticos comercialmente disponíveis.
- ✓ Avaliar os efeitos hemolíticos dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei*.
- ✓ Avaliar as propriedades imunomodulatórias como a produção de EROs, indução de fagocitose e indução de NETs, assim como, indução de citocinas pré e pro-inflamatórias dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* e da ranaturina-2PMe.
- ✓ Avaliar o comportamento dose-resposta de indução de quimiotaxia de neutrófilos humanos dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* e da ranaturina-2PMe.
- ✓ Avaliar os efeitos sobre protozoários de interesse médico e veterinário, como *Leishmania* sp., *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum* dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* e da ranaturina-2PMe.
- ✓ Avaliar os efeitos antiproliferativos e citotóxicos sobre linhagens de células tumorais e não tumorais de mamíferos dos peptídeos antimicrobianos de *P. rohdei* e da ranaturina-2PMe.

## 6. Referências Bibliográficas

- ABBAS, A. K., PILLAI, S., LICHTMAN, A. H. (2019). **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- ALLOCATI, N., MASULLI, M., ALEXEYEV, M. F., DI ILIO, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health*, 10(12): 6235-54. doi: 10.3390/ijerph10126235.
- ALOKE, C., ACHILONU, I. (2023). Coping with the ESKAPE pathogens: Evolving strategies, challenges and future prospects. *Microb Pathog.*, 175: 105963. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105963.
- ANASTASI, A., BERTACCINI, G., ERSPAMER, V. (1996). Pharmacological data on phyllokinin (bradykinyl-isoleucyl-tyrosine o-sulphate) and bradykinyl-isoleucyl-tyrosine. *Br J Pharmacol Chemother*, 27(3): 479–485. doi: 10.1111/j.1476-5381.1966.tb01859.x.

ANTONY, A., PURAYIL, A.K., OLAKKARAN, S., DHANNURA, S., SHEKH, S., GOWD, K. H., GURUSHANKARA, H. P. (2024). Antimicrobial and antitumor properties of anuran peptide temporin-SHf induce apoptosis in A549 lung cancer cells. *Amino Acids*, 56: 12. <https://doi.org/10.1007/s00726-023-03373-3>.

BAKER, K. S., JAUNEIKAITE, E., NUNN, J. G., MIDEGA, J. T., ATUN, R., HOLT, K. E., WALIA, K., HOWDEN, B. P., TATE, H., OKEKE, I. N., CARATTOLI, A., HSU, L. Y., HOPKINS, K. L., MULOI, D. M., WHEELER, N. E., AANENSEN, D. M., MASON, L. C. E., RODGUS, J., HENDRIKSEN, R. S., ESSACK, S. Y., EGYIR, B., HALPIN, A. L., MACCANNELL, D. R., CAMPOS, J., SRIKANTIAH, P., FEASEY, N. A., PEACOCK, S. J., SEDRIC. (2023). Genomics surveillance working group. evidence review and recommendations for the implementation of genomics for antimicrobial resistance surveillance: Reports from an international expert group. *Lancet Microbe*, S2666-5247(23)00281-1. doi: 10.1016/S2666-5247(23)00281-1.

BARBOSA, E. A., OLIVEIRA, A., PLÁCIDO, A., SOCODATO, R., PORTUGAL, C. C., MAFUD, A. C., OMBREDANE, A. S., MOREIRA, D. C., VALE, N., BESSA, L. J., JOANITTI, G. A., ALVES, C., GOMES, P., DELERUE-MATOS, C., MASCARENHAS, Y. P., MARANI, M. M., RELVAS, J. B., PINTADO, M., LEITE, J. R. S. A. (2017). Structure and function of a novel antioxidant peptide from the skin of tropical frogs. *Free Radic Biol Med.*, 115: 68-79. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.001.

BARRA, D., FALCONIERI ERSPAMER, G., SIMMACO, M., BOSSA, F., MELCHIORRI, P., ERSPAMER, V. (1985). Rohdei-litorin: a new peptide from the skin of *Phyllomedusa rohdei*. *FEBS Lett.*, 182(1): 53-6. doi: 10.1016/0014-5793(85)81152-2.

BIN HAFEEZ, A., JIANG, X., BERGEN, P. J., ZHU, Y. (2021). Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *Int J Mol Sci.*, 22(21): 11691. doi: 10.3390/ijms222111691.

BRAND, G. D., SANTOS, R. C., ARAKE, L. M., SILVA, V. G., VERAS, L. M., COSTA, V., COSTA, C. H., KUCKELHAUS, S. S., ALEXANDRE, J. G., FEIO, M. J., LEITE, J. R. (2013). The skin secretion of the amphibian *Phyllomedusa nordestina*: A source of antimicrobial and antiprotozoal peptides. *Molecules*, 18(6): 7058-70. doi: 10.3390/molecules18067058.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. (2019). Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR). Brasília - Distrito Federal.

BRÖTZ, H., BIERBAUM, G., LEOPOLD, K., REYNOLDS, P. E., SAHL, H. G. The

lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. (1998). *Antimicrob Agents Chemother.*, 42(1): 154-60. doi: 10.1128/AAC.42.1.154.

BRUM, G. (2022). Estudo mostra que 1,2 milhão de pessoas morreram por superbactérias. **Rádio Agência.** Brasília, 27 de Janeiro de 2022. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/radioagencia-nacional/saude/audio/2022-01/estudo-mostra-que-12-milhao-de-pessoas-morreram-por-superbacterias>>. Acesso em 15 de novembro de 2023.

BRUNETTI, A. E., HERMIDA, G. N., IURMAN, M. G., FAIVOVICH, J. (2016). Odorous secretions in anurans: morphological and functional assessment of serous glands as a source of volatile compounds in the skin of the treefrog *Hypsiboas pulchellus* (Amphibia: Anura: Hylidae). *J Anat.*, 228(3): 430-42. doi: 10.1111/joa.12413.

CHECHI, J. L., DA COSTA, F. A. C., FIGUEIREDO, J. M., DE SOUZA, C. M., VALDEZ, A. F., ZAMITH-MIRANDA, D., CAMARA, A. C., TABORDA, C. P., NOSANCHUK, J. D. (2023). Vaccine development for pathogenic fungi: current status and future directions. *Expert Rev Vaccines*, 22(1): 1136-1153. doi: 10.1080/14760584.2023.2279570.

CHEN, T., ZHOU, M., GAGLIARDO, R., WALKER, B., SHAW, C. (2006). Elements of the granular gland peptidome and transcriptome persist in air-dried skin of the South American orange-legged leaf frog, *Phyllomedusa hypocondrialis*. *Peptides*, 27(9): 2129-2136. doi: 10.1016/j.peptides.2006.04.006.

CHEN, X., ZHANG, L., MA, C., ZHANG, Y., XI, X., WANG, L., ZHOU, M., BURROWS, J. F., CHEN, T. (2018). A novel antimicrobial peptide, Ranatuerin-2PLx, showing therapeutic potential in inhibiting proliferation of cancer cells. *Biosci Rep.*, 38(6): BSR20180710. doi: 10.1042/BSR20180710.

CHRISTAKI, E., MARCOU, M., & TOFARIDES, A. (2020). Antimicrobial resistance in bacteria: Mechanisms, evolution, and persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1): 26–40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>

CONLON, J. M. (2011). Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. *Cell. Mol. Life Sci.*, 68: 2303–2315. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0720-8>.

CONLON, J. M., MECHKARSKA, M. (2014). Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family pipidae. *Pharmaceuticals*, 7(1): 58-77. doi: 10.3390/ph7010058.

CONLON, J. M., MECHKARSKA, M., LEPRINCE, J. (2019). Peptidomic analysis in the discovery of therapeutically valuable peptides in amphibian skin secretions. *Expert Review of*

*Proteomics*, 16(11–12): 897–908. <https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1693894>.

CORRÊA, J. S., ZAGO, L. F., SILVA-BRANDÃO, R. R. D., OLIVEIRA, S. M., FRACOLLI, L. A., PADOVEZE, M. C., CURREA, G. C. C. (2022). Antimicrobial resistance in Brazil: an integrated research agenda. *Rev Esc Enferm USP*, 56: e20210589. doi: 10.1590/1980-220X-REEUSP-2021-0589.

DA ROCHA SANTOS, L. M. B., DE PAULA RAMOS, L., SANTOS, C. E. R., MIRANDA, D. G., GIMENEZ, M. G., MECCATTI, V.M., ABU HASNA, A., DOS SANTOS OLIVEIRA, M., NETO, M. B., DIAS DE OLIVEIRA, L. (2023). Saliva culture as a predictive indicator for current blood infections and antimicrobial resistance in the ICU setting. *Sci Rep.*, 13(1): 20317. doi: 10.1038/s41598-023-47143-3.

DELVES, P. J. MARTIN, S. J.; BRUTON, D. R.; ROITT, I. M. (2013). **Fundamentos de Imunologia**. 12ª Edição. Editora Guanabara Koogan.

DE AMARAL, M., IENES-LIMA, J. (2022). Anurans against SARS-CoV-2: A review of the potential antiviral action of anurans cutaneous peptides. *Virus Res.*, 315: 198769. doi: 10.1016/j.virusres.2022.198769.

DE PAULA LIMA, J. E., ROEDDER, D., SOLE, M. (2010). Diet of two sympatric *Phyllomedusa* (Anura: Hylidae) species from a cacao plantation in southern Bahia, Brazil. *North-Western Journal of Zoology*, 6(1): 13-24.

DEMORI, I., RASHED, Z. E., CORRADINO, V., CATALANO, A., ROVEGNO, L., QUEIROLO, L., SALVIDIO, S., BIGGI, E., ZANOTTI-RUSSO, M., CANESI, L., CATENAZZI, A., GRASSELLI, E. (2019). Peptides for skin protection and healing in amphibians. *Molecules*, 24(2): 347. doi: 10.3390/molecules24020347. PMID: 30669405; PMCID: PMC6359409.

DOSTERT, M., BELANGER, C. R. HANCOCK, R.E.W. (2019). Design and assessment of anti-biofilm peptides: Steps toward clinical application. *J Innate Immun.*, 11(3): 193-204. doi: 10.1159/000491497.

DRAYTON, M., DEISINGER, J. P., LUDWIG, K. C., RAHEEM, N., MÜLLER, A., SCHNEIDER, T., STRAUS, S. K. (2021). Host defense peptides: Dual antimicrobial and immunomodulatory action. *Int J Mol Sci.*, 22(20): 11172. doi: 10.3390/ijms222011172.

DUELLMAN, W. E. (1978). The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. *Miscellaneous Publications of the University of Kansas* 65: 1-352.

DU, H., BING, J., HU, T., ENNIS, C. L., NOBILE, C. J., HUANG, G. (2020). *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathog.*, 16(10): e1008921. doi: 10.1371/journal.ppat.1008921.

ERSPAMER, V., MELCHIORRI, P., FALCONIERI ERSPAMER, G., MONTECUCCHI, P. C., DE CASTIGLIONE, R. (1985). Phyllomedusa skin: a huge factory and store-house of a variety of active peptides. *Peptides*, 6 Suppl 3:7-12. doi: 10.1016/0196-9781(85)90343-2. PMID: 3868775.

FAIVOVICH, J., HADDAD, C. F. B., BAËTA, D., JUNGFER, K. H., ÁLVARES, G. F. R., BRANDÃO, R. A., SHEIL, C., BARRIENTOS, L. S., BARRIO-AMORÓS, C. L., CRUZ, C. A. G., WHEELER, W. C. (2010). The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs, Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). *Cladistics*, 26: 227-261. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2009.00287.x>.

FAIVOVICH, J., HADDAD, C. F. B., GARCIA, P. C. A., FROST, D. R., CAMPBELL, J. A., WHEELER, W. C. (2005). Systematic review of the frog family Hylidae with special reference to Hyalinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 2005(294): 1-240.

FRANÇA, M. S. S. (2017). **Resistência bacteriana em bacilos Gram-negativos: A importância dos testes fenotípicos**. Natal. 49p. TCC – Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

FREITAS, G. G., BARBOSA, J. M., SANTANA, C. J. C., MAGALHÃES, A. C. M., MACEDO, K. W. R., SOUZA, J. O., CASTRO, J. S., VASCONCELOS, I. A., SOUZA, A. A., FREITAS, S. M., BÁO, S. N., COSTA, S. R., BRAND, G. D., CHAVES, I. M., COSTA, V. V., FONTES, W., PIRES JÚNIOR, O. R., & CASTRO, M. S. (2023). Purification and biological properties of raniseptins-3 and -6, two antimicrobial peptides from *Boana raniceps* (Cope, 1862) skin secretion. *Biomolecules*, 13(3): 576. <https://doi.org/10.3390/biom13030576>.

FROST, D. R., GRANT, T., FAIVOVICH, J., BAIN, R. H., CÉLIO, HAAS, A., HADDAD, C. F. B., DE SÁ, R. O., CHANNING, A., WILKINSON, M., DONNELLAN, S. C., RAXWORTHY, C. J., CAMPBELL, J. A., BLOTTO, B. L., MOLER, P., DREWES, R. C., NUSSBAUM, R. A., LYNCH, J. D., GREEN, D. M., WHEELER, W. C. (2006). The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297: 1-291.

FROST, D. R. (2023). Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.2. Electronic Database accessible at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibian/index.html>. *American Museum of Natural History*, New York, USA. Acesso em 15/09/2023.

FURUYA, E. Y., LOWY, F. D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol.*, 4(1): 36-45. doi: 10.1038/nrmicro1325.

GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTIKER, A., WILKINS, M. R., APPEL, R. D., BAIROCH, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The*

Proteomics Protocols Handbook; Walker, J.M., Ed.; Springer Protocols Handbooks; Humana Press: Totowa, NJ, USA, p. 571–607.

GAUBA, A., RAHMAN, K. M. (2023). Evaluation of antibiotic resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Antibiotics (Basel)*, 12(11): 1590. doi: 10.3390/antibiotics12111590.

GOLD, J. A. W., AHMAD, F. B., CISEWSKI, J. A., ROSSEN, L. M., MONTERO, A. J., BENEDICT, K., JACKSON, B. R., TODA, M. (2023). Increased deaths from fungal infections during the coronavirus disease 2019 pandemic-national vital statistics system, United States, January 2020-December 2021. *Clin Infect Dis.*, 76(3): e255-e262. doi: 10.1093/cid/ciac489.

GORAYA, J., KNOOP, F. C., CONLON, J. M. (1998). Ranatuerins: antimicrobial peptides isolated from the skin of the American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 250(3): 589-92. doi: 10.1006/bbrc.1998.9362.

HELBING, C. C., HAMMOND, S. A., JACKMAN, S. H., HOUSTON, S., WARREN, R. L. CAMERON, C. E., BIROL, I. (2019). Antimicrobial peptides from *Rana [Lithobates] catesbeiana*: Gene structure and bioinformatic identification of novel forms from tadpoles. *Sci Rep.*, 9: 1529. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38442-1>.

HICKMAN, J. R., ROBERTS, L.S. LARSON, A. (2016). *Principios Integrados de Zoologia*, 16 ed. Editora Guanabara Koogan, RJ.

HILLIS, D. M. e DE SÁ, R. (1988). Phylogeny and taxonomy of the *Rana palmipes* group (Salientia: Ranidae). *Herpetological Monographs*, 2: 46023.

JANG, J., HUR, H. G., SADOWSKY, M. J., BYAPPANAHALLI, M. N., YAN, T., ISHII, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: Ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol.*, 123(3): 570-581. doi: 10.1111/jam.13468.

JI, S., AN, F., ZHANG, T., LOU, M., GUO, J., LIU, K., ZHU, Y., WU, J., WU, R. (2024). Antimicrobial peptides: An alternative to traditional antibiotics, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 265: 116072. doi: 10.1016/j.ejmech.2023.

JOLIVET-GOUGEON, A., BONNAURE-MALLET, M. (2014). Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. *Drug Discov Today Technol.*, 11: 49-56. doi: 10.1016/j.ddtec.2014.02.003.

K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3): 238–250. doi:10.1038/nrmicro1098.

KÖNIG, E., BININDA-EMONDS, O. R., SHAW, C. (2015). The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides*, 63: 96-117. doi: 10.1016/j.peptides.2014.11.003.

KUMAR, P., KIZHAKKEDATHU, J. N., STRAUS, S. K. (2018). Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in

vivo. *Biomolecules*, 8(1), pii: E4. doi: 10.3390/biom8010004.

LAI, Y., GALLO, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.*, 30(3): 131-41. doi: 10.1016/j.it.2008.12.003.

LEITE, J. R., SILVA, L. P., RODRIGUES, M. I., PRATES, M. V., BRAND, G. D., LACAVA, B. M., AZEVEDO, R. B., BOCCA, A. L., ALBUQUERQUE, S., BLOCH, C. Jr. (2005). Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides*, 26(4): 565-573. doi: 10.1016/j.peptides.2004.11.002.

LEIMBACH, A., HACKER, J., DOBRINDT, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 358: 3-32. doi: 10.1007/82\_2012\_303.

LEVINSON, W. (2010). **Microbiologia médica e imunologia**. 10ª Edição. Editora Jones & Bartlett.

LIU, J., WU, Q., LI, L., XI, X., WU, D., ZHOU, M., CHEN, T., SHAW, C., WANG, L. (2017). Discovery of phylloseptins that defense against Gram-positive bacteria and inhibit the proliferation of the non-small cell lung cancer cell line, from the skin secretions of *Phyllomedusa* frogs. *Molecules*, 22(9): 1428. doi: 10.3390/molecules22091428.

LIU, Y., SHI, D., WANG, J., CHEN, X., ZHOU, M., XI, X., CHENG, J., MA, C., CHEN, T., SHAW, C., WANG, L. (2020). A novel amphibian antimicrobial peptide, phylloseptin-PV1, exhibits effective anti-Staphylococcal activity without inducing either hepatic or renal toxicity in mice. *Front Microbiol.*, 11: 565158. doi: 10.3389/fmicb.2020.565158.

LOPES, B. S., HANAFIAH, A., NACHIMUTHU, R., MUTHUPANDIAN, S., MD NESRAN, Z. N., PATIL, S. (2022). The role of antimicrobial peptides as antimicrobial and antibiofilm agents in tackling the silent pandemic of antimicrobial resistance. *Molecules*, 27(9): 2995. doi: 10.3390/molecules27092995.

LOYOLA-CRUZ, M. Á., GONZALEZ-AVILA, L. U., MARTÍNEZ-TREJO, A., SALDAÑA-PADILLA, A., HERNÁNDEZ-CORTEZ, C., BELLO-LÓPEZ, J. M., CASTRO-ESCARPULLI, G. (2023). ESKAPE and beyond: The burden of coinfections in the COVID-19 pandemic. *Pathogens*, 12(5): 743. doi: 10.3390/pathogens12050743.

MANDEL, S. M. S. (2008). **Prospecção de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de anfíbios do gênero *Phyllomedusa***. Brasília, 85p. *Dissertação* (Mestrado) – Biologia Animal, Universidade de Brasília.

MANGONI, M. L., CASCIARO, B. (2020). Development of antimicrobial peptides from amphibians. *Antibiotics*, 9(11): 772. doi: 10.3390/antibiotics9110772.

MANSOUR, S. C., PENA, O. M., HANCOCK, R. E. (2014). Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends Immunol.*, 35(9): 443-450. doi: 10.1016/j.it.2014.07.004.

MARSTON, H. D., DIXON, D. M., KNISELY, J. M., PALMORE, T. N., FAUCI, A. S. (2016). Antimicrobial resistance. *JAMA*, 316(11): 1193–1204. doi: 10.1001/jama.2016.11764.

MATANIC, V. C. A., CASTILLA, V. (2004). Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *Int J Antimicrob Agents*. 23(4): 382-9. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2003.07.022.

MCMILLAN K. A. M., COOMBS, M. R. P. (2020). Review: Examining the natural role of amphibian antimicrobial peptide magainin. *Molecules*, 25(22): 5436. doi: 10.3390/molecules25225436.

MECHKARSKA, M., BARRAN, G., KOLODZIEJEK, J., COQUET, L., LEPRINCE, J., JOUENNE, T., NOWOTNY, N., CONLON, J. M. (2023). Peptidomic analysis of the host-defense peptides in skin secretions of the Amazon River frog *Lithobates palmipes* (Ranidae). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 46:101069. doi: 10.1016/j.cbd.2023.101069.

MILLER, W. R., ARIAS, C. A. (2024). ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nat Rev Microbiol*. doi: 10.1038/s41579-024-01054-w.

MORRISON, L., & ZEMBOWER, T. R. (2020). Antimicrobial resistance. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 30(4): 619–635. doi: 10.1016/j.giec.2020.06.004.

MONTECUCCHI, P. C., De CASTIGLIONE, R., ERSPAMER, V. (1981). Identification of dermorphin and Hyp6-dermorphin in skin extracts of the Brazilian frog *Phyllomedusa rhodei*. *Int J Pept Protein Res.*, 17(3): 316-21. doi: 10.1111/j.1399-3011.1981.tb01997.x.

MONTECUCCHI, P. C. (1985). Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins. *Peptides*, 6 Suppl 3: 187-195. doi: 10.1016/0196-9781(85)90373-0.

MURRAY, C.J., IKUTA, K.S., SHARARA, F., SWETSCHINSKI, L., AGUILAR, G.R., GRAY, A., HAN, C., BISIGNANO, C., RAO, P., Wool, E., *et al.* (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet*, 399: 629–655. doi: 10.1016/ S0140-6736(21)02724-0.

NACIF-MARÇAL, L., PEREIRA, G. R., ABRANCHES, M. V., COSTA, N. C., CARDOSO, S. A., HONDA, E. R., DE PAULA, S. O., FEIO, R. N., OLIVEIRA, L. L. (2015). Identification and characterization of an antimicrobial peptide of *Hypsiboas semilineatus* (Spix,

1824) (Amphibia, Hylidae). *Toxicon*, 99: 16-22. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.03.006.

NASCIMENTO, A. C., FONTES, W., SEBEN, A., & CASTRO, M. S. (2003). Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein and Peptide Letters*, 10(3), 227-238. doi: 10.2174/0929866033478933.

NICOLAS, P., & EL AMRI, C. (2009). The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(8): 1537-1550. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.09.006.

O'NEILL, J. (2014). Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. Disponível em: <[https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)>. Acesso em 10/06/2024.

O'NEILL, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Disponível em: <<https://apo.org.au/sites/default/files/resource-files/2016-05/apo-nid63983.pdf>>. Acesso em 10/06/2024.

OYEJOBI, G. K., OLANIYAN, S. O., YUSUF, N. A., OJEWANDE, D. A., AWOPETU, M. J., OYENIRAN, G. O., KHAN, F. M., DARE, P. A., ADEGBITE-BADMUS, M. K. (2022). *Acinetobacter baumannii*: More ways to die. *Microbiol Res.* 261: 127069. doi: 10.1016/j.micres.2022.127069.

PANTIC, J. M., JOVANOVIĆ, I. P., RADOSAVLJEVIĆ, G. D., ARSENIJEVIĆ, N. N., CONLON, J. M., LUKIĆ, M. L. (2017). The potential of frog skin-derived peptides for development into therapeutically-valuable immunomodulatory agents. *Molecules*, 22(12): 2071. doi: 10.3390/molecules22122071.

PATOCKA, J., NEPOVIMOVA, E., KLIMOVA, B., WU, Q., KUČA, K. (2019). Antimicrobial peptides: Amphibian host defense peptides. *Curr Med Chem.*, 26(32): 5924-5946. doi: 10.2174/0929867325666180713125314.

PAVLICEVIĆ, M., MARMIROLI, N., MAESTRI, E. (2022). Immunomodulatory peptides-A promising source for novel functional food production and drug discovery. *Peptides*, 148: 170696. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170696.

PRESTINACI, F., PEZZOTTI, P., & PANTOSTI, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109(7): 309–318. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030.

QURESHI, A., THAKUR, N., TANDON, H., KUMAR, M. (2014). AVPdb: a database of experimentally validated antiviral peptides targeting medically important viruses. *Nucleic Acids*

Res., 42(Database issue): D1147-53. doi: 10.1093/nar/gkt1191.

RAMOS, E. K. S., MAGALHÃES, R. F., MARQUES, N. C. S., BAËTA, D., GARCIA, P. C. A., SANTOS, F. R. (2019). Cryptic diversity in Brazilian endemic monkey frogs (Hylidae, Phyllomedusinae, *Pithecopus*) revealed by multispecies coalescent and integrative approaches. *Mol Phylogenet Evol.*, 132: 105-116. doi: 10.1016/j.ympev.2018.11.022.

ROSSI, F. (2011). The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis.*, 52(9): 1138-43. doi: 10.1093/cid/cir120.

ROSSOLINI, G. M., ARENA, F., GIANI, T. (2017). Mechanisms of antibacterial resistance. *Infectious Diseases*, 1181–1196.e1. doi:10.1016/b978-0-7020-6285-8.00138-6.

SÁ, M. S., JUNCÁ, F. A., CARVALHO, L. P. C., SANTOS, R., SOARES, M. B. P. (2007). Avaliação da atividade imunomoduladora de extratos de peles e glândulas parotóides de anuros do semi-árido brasileiro. *SITIENIBUS série Ciências Biológicas*, 7: 410-415.

SANTAJIT, S., INDRAWATTANA, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res Int.*, 2016:2475067. doi: 10.1155/2016/2475067.

SANTANA, C. J. C., MAGALHÃES, A. C. M., DOS SANTOS JÚNIOR, A. C. M., RICART, C. A. O., LIMA, B. D., ÁLVARES, A. D. C. M., FREITAS, S. M., PIRES, O. R. Jr., FONTES, W., CASTRO, M. S. (2020). Figainin 1, a novel amphibian skin peptide with antimicrobial and antiproliferative properties. *Antibiotics*, 9(9): 625. doi: 10.3390/antibiotics9090625.

SANTANA, C. J. C., MAGALHÃES, A. C. M., PRÍAS-MÁRQUEZ, C. A., FALICO, D. A., DOS SANTOS JÚNIOR, A. C. M., LIMA, B. D., RICART, C. A. O., DE PILGER, D. R. B., BONOTTO, R. M., MORAES, C. B., FREITAS-JÚNIOR, L. H., ÁLVARES, A. D. C. M., FREITAS, S. M., LUZ, I. S., PIRES, O. R. Jr., FONTES, W., CASTRO, M. S. (2020). Biological properties of a novel multifunctional host defense peptide from the skin secretion of the Chaco tree frog, *Boana raniceps*. *Biomolecules*, 10(5): 790. doi: 10.3390/biom10050790.

SANTANA, C. J. J. (2022). **Caracterização molecular e funcional de peptídeos de anuros e seus análogos: efeitos sobre patógenos microbianos e células tumorais**. Brasília, 196 p. Tese (*Doutorado*) – Biologia Molecular, Universidade de Brasília.

SANTOS, J. S. (2023). **Caracterização das propriedades biológicas de uma dermaseptina isolada da secreção cutânea de *Pithecopus rohdei* (Anura: Phyllomedusinae)**. Brasília, 59 p. Dissertação (*Mestrado*) - Biologia Animal, Universidade de Brasília.

SHAI, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1462(1-2): 55-70. doi: 10.1016/s0005-2736(99)00200-x.

SHI, J., WU, J., FENG, G., YANG, H., UM, L. (2023). Natural amphibian-derived host defense peptides: Peptide immunomodulators with potential therapeutic value. *Protein Pept Lett.*, 30(7): 562-573. doi: 10.2174/0929866530666230525163307.

SILVA, D. MENEZES, E. M. N. SILVA, E. V. LAMOUNIER, A. C. (2017). Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of ESKAPE pathogens from the Federal District, Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 53(4): 240-245.

SPELLBERG, B. POWERS, J.H., BRASS, E.P., MILLER., LG., EDWARDS, J.E.Jr. (2004). Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin Infect Dis.*, 38(9): 1279-1286. doi: 10.1086/420937.

TEIXEIRA, V., FEIO, M. J., BASTOS, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog Lipid Res.*, 51(2): 149-177. doi: 10.1016/j.plipres.2011.12.005.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. (2017). **Microbiologia**. 12<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre: Artmed.

TRAVKOVA, O. G., MOEHWALD, H., BREZESINSKI, G. (2017). The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 247: 521-532.

VILAS BOAS, L. C. P., CAMPOS, M. L., BERLANDA, R. L. A., NEVES, N. C., FRANCO, O. L. (2019). Antiviral peptides as promising therapeutic drugs. *Cell Mol Life Sci.*, 76(18): 3525-3542. doi: 10.1007/s00018-019-03138-w.

WANG, G., LI, X., WANG, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.*, 44(D1): D1087-93. doi: 10.1093/nar/gkv1278.

WIMLEY, W. C.; HRISTOVA, K. (2011). Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *Journal of Membrane Biology*, 239: 27-34.

XIAO, Y., LIU, C., LAI, R. (2011). Antimicrobial peptides from amphibians. *Biomol Concepts*, 2(1-2): 27-38. doi: 10.1515/bmc.2011.006.

XU, X., LAI, R. (2015). The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chem Rev.*, 115(4): 1760-846. doi: 10.1021/cr4006704.

YANDEK, L. E., POKORNY, A., FLORÉN, A., KNOELKE, K., LANGEL, U., ALMEIDA, P. F. (2007). Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. *Biophys J.*, 92(7): 2434-2444. doi: 10.1529/biophysj.106.100198.

YUAN, Z. Y., ZHOU, W. W., CHEN, X., POYARKOV, N. A. Jr., CHEN, H. M., JANG-LIAW, N. H., CHOU, W. H., MATZKE, N. J., IIZUKA, K., MIN, M. S., KUZMIN, S. L., ZHANG, Y. P., CANNATELLA, D. C., HILLIS, D. M., CHE, J. (2016). Spatiotemporal diversification of the true frogs (Genus *Rana*): A historical framework for a widely studied group

of model organisms. *Syst Biol.*, 65(5): 824-842. doi: 10.1093/sysbio/syw055.

ZHANG, Q. Y., YAN, Z. B., MENG, Y. M., HONG, X. Y., SHAO, G., MA, J. L., CHENG, X. R., CHENG, X. R., LIU, J., KANG, J., FU, C. Y. (2021). Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Med Res.*, 8: 48. doi: 10.1186/s40779-021-00343-2.

ZASLOFF, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389–395. doi: 10.1038/415389a.