

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
CURSO: BACHARELADO EM BIOMEDICINA

WELLINGTON MOTA MARTINS

**POTENCIAL BIOATIVO DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DA DERME DE
DIFERENTES ESPÉCIES ANUROS**

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado em forma de artigo científico
ao UniCEUB como requisito parcial para
conclusão do curso de bacharelado em
Biomedicina sob orientação da Profª Dra.
Anabele Azevedo Lima Barbastefano.

BRASÍLIA

2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem ele eu nada seria.

De forma especial queria agradecer à Prof^ª Dra Anabele Azevedo, que gentilmente me acolheu, orientou, me apoiando com paciência.

Um agradecimento muito justo e honroso à Prof.^a Dra Cláudia Popov, por todo aprendizado e confiança, pela orientação e acolhimento como aluno de iniciação científica e por ter feito tudo possível para me ajudar mesmo com as burocracias colocadas.

Aos meus pais Nilton e Ana e meus irmãos Danilo e Gabriel pelo apoio e conselhos sobre perspectivas do meu futuro acadêmico.

À Isabelle Rosa, minha namorada, pelo apoio incondicional e paciência estando sempre ao meu lado.

À Universidade Católica de Brasília pela oportunidade de aprendizado como aluno de iniciação científica voluntário.

Ao centro Universitário de Brasília por disponibilizar um corpo docente incrível nos cursos da área da Saúde.

Aos professores Dr. Bruno Milagres, Fabiola e Milton e suas provas gigantescas, por toda simpatia, paciência e didática proporcionando aos alunos uma visão real do mercado de trabalho bem como a necessidade do estudo diário para a concretização de uma carreira profissional de sucesso.

A todo corpo docente do curso de Biomedicina do UniCEUB pela competência e amor por ensinar.

Aos meus colegas e amigos adquiridos na Universidade pelo apoio e alegrias compartilhadas.

Aos meus amigos e companheiros da Universidade Católica de Brasília por proporcionar momentos de alegria e companheirismo.

Não menos importante quero agradecer todos que, de uma forma ou de outra, me ajudaram nessa trajetória acadêmica proporcionando a elucidação e concretização de minha ética e moral.

POTENCIAL BIOATIVO DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DA DERME DE DIFERENTES ESPÉCIES ANUROS.

Wellington Mota Martins¹

Anabele Azevedo Lima Barbastefano²

RESUMO

Os peptídeos bioativos isolados a partir de anfíbios despertam a atenção da comunidade científica devido à sua ampla variedade e aplicações: antibióticos, vasodilatadores, anti-inflamatórios, entre outras. Contudo, há hipótese de que peptídeos igualmente secretados pela derme de anuros por via do seu sistema imune inato possam desempenhar outras funções, que começam a ser verificadas. O objetivo do presente trabalho foi descrever o potencial ativo de alguns peptídeos presentes em anuros descritos na literatura a partir de uma revisão bibliográfica em formato narrativo. Os estudos demonstram que entre os anuros pertencentes à fauna brasileira, destacam-se diversas espécies que secretam peptídeos com propriedades antimicrobianas, assim como, apresentam potencial bioativo imunomodulador. Desse modo, torna-se necessário conhecer e caracterizar novos peptídeos com potencialidade para desempenhar diferentes funções de interesse biotecnológico.

Palavras-chave: Anuro, Peptídeos, Derme, Bioativo

BIOACTIVE POTENTIAL OF DERME ISOLATED PEPTIDES OF DIFFERENT ANUREAUS SPECIES.

Wellington Mota Martins¹

Anabele Azevedo Lima Barbastefano²

ABSTRACT

Bioactive peptides isolated from amphibians arouse the attention of the scientific community due to their wide variety and applications: antibiotics, vasodilators, anti-inflammatory, among others. However, there are hypotheses that peptides also secreted by the anuran dermis through their innate immune system can perform others functions that begin to be verified. The objective of the present study was to describe the active potential of some peptides present in anurans described in the literature from a bibliographical revision in narrative format. Studies have shown that among the anurans belonging to the Brazilian fauna, some species are detached due to their ability to secrete antimicrobial peptides, as well as, present immunomodulatory bioactive potential. Thus, is necessary to know and characterize new peptides with the potential to perform different functions of biotechnological interest.

Keywords: Anuran, Peptides, Dermis, Bioactive

¹ Estudante de biomedicina do Uniceub

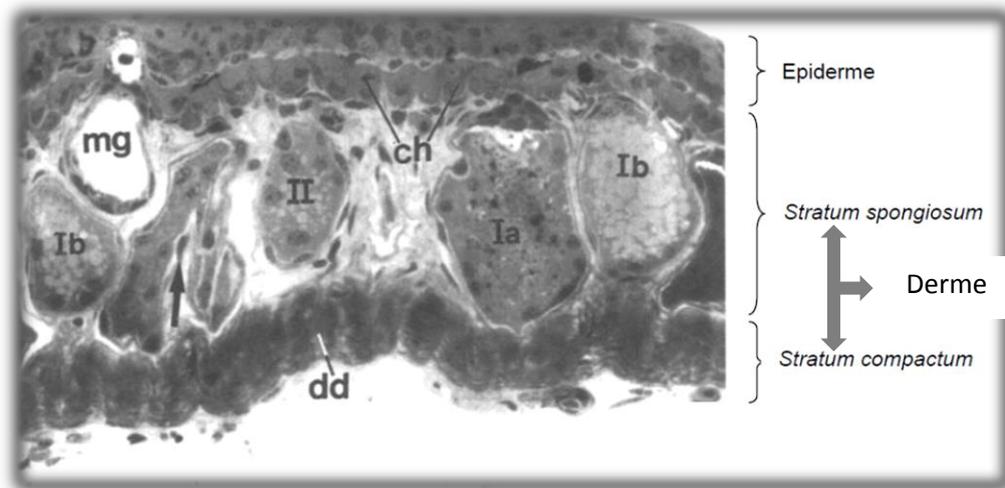
2 Professora do curso de biomedicina do Uniceu

1. INTRODUÇÃO

O território brasileiro compreende 1036 espécies de anfíbios, sendo que dessas, segundo a sociedade Brasileira de Herpetologia, cerca de 988 pertencem à ordem Anura, o que torna o Brasil o líder mundial quanto à riqueza de espécies de anfíbios. Os anuros são caracterizados por longas patas posteriores, corpo curto, membranas interdigitais, olhos protuberantes e ausência de cauda. A maioria tem um estilo de vida semiaquático, movendo-se em terra através de saltos ou escalando. Os anuros têm pele fina, úmida e permeável. Esta é revestida por um muco que evita a sua desidratação e contribui na termorregulação. A umidade constante da pele também permite que o oxigênio seja dissolvido em um filme aquoso, possibilitando a respiração cutânea, sendo esta uma função imprescindível para a manutenção fisiológica destes anfíbios. Além destas funções, a pele dos anuros tem ainda as funções de regulação osmótica e transporte de água e solutos (BARBEAU; LILLYWHITE,2005).

A pele destes anfíbios é constituída por duas partes distintas: a epiderme e a derme; A epiderme corresponde à área mais externa e possui diversas unidades cromáticas cutâneas, estruturas ricas em pigmentos que conferem a cor específica de cada espécime. Logo abaixo da epiderme encontra-se a derme, rica em diversos tipos de glândulas granulares e mucosas. Estas ficam localizadas no *Stratum spongiosum*, uma camada intermédia formada por tecido esponjoso que se localiza acima da derme densa ou *Stratum compactu* (Figura 1) (DELFINO et al., 1998).

Figura 1. Estruturas glandulares anfíbio da espécie *P. hypochondrialis*. **Ia-** glândula granular; **Ib-** glândula granular; **II-** glândula granular; **ch-** unidade cromática cutânea; **dd-** derme densa (*Stratum compactum*); **mg-** glândula mucosa (x350).



Fonte: Delfino *et al.* (1998), modificada.

As glândulas granulares são estruturas neuroendócrinas e estão distribuídas no corpo do anfíbio de modo variado. Podem-se encontrar uniformemente distribuídas na região dorsal e as glândulas granulares são estruturas neuroendócrinas e estão distribuídas no corpo do anfíbio na parte ventral ou concentradas em algumas áreas, especialmente na região dorsal do animal (TOLEDO; JARED, 1995). Estas glândulas são responsáveis pela produção, armazenamento e liberação das moléculas bioativas (DOCKRAY; HOPKINS, 1975 apud POPOV, 2017).

Delfino e colaboradores (1998) citam as glândulas granulares de anuros em duas classes: tipo I e tipo II. As glândulas granulares tipo I apresentam um retículo endoplasmático liso pouco desenvolvido e apresentam dois subtipos: Ia e Ib (Figura 1), na qual, em situações de perigo, ocorre uma contração da musculatura local das paredes das glândulas e ocorre uma liberação do conteúdo dos grânulos que armazenam as secreções. Nas glândulas tipo Ia, a secreção parece seguir uma estratégia defensiva contra predadores maiores, liberando uma maior quantidade de produtos nocivos (NOSI *et al.*, 2002). Já as glândulas tipo Ib parecem ter uma função reguladora, uma vez que liberam o seu conteúdo de modo contínuo e envolvendo uma menor quantidade de secreção.

Além das glândulas granulares, existe ainda outro tipo de glândulas presentes na derme dos anuros responsáveis pela produção de glicoproteínas que mantêm a pele úmida e que facilita a respiração, reprodução e termorregulação (TOLEDO; JARED, 1995).

A interação com os patógenos presentes no meio ambiente conduz a uma variedade de mecanismos de defesa nos anuros, sendo eles uma barreira inicial (imunidade inata) ou adquiridos após o contato do animal no seu habitat com os patógenos ali presentes (imunidade adquirida). Dentre os mecanismos de defesa mais conhecidos, encontram-se os peptídeos antimicrobianos (PAMs) ou *Host Defense Peptides*. Estes peptídeos variam na sua sequência e estrutura, mas existem algumas características em comum: natureza anfipática, e possuem de 12 a 50 resíduos de aminoácidos (MOOKHERJEE; HANCOCK, 2007).

Cada espécie de anuro produz os seus próprios peptídeos bioativos que compartilham pouca ou nenhuma similaridade com a sequência dos peptídeos de outras espécies, inclusive espécies relativamente próximas (ZASLOFF, 2009). Esses peptídeos representam uma fonte valiosa de substâncias com efeitos farmacológicos diversos, já que, destacou-se pela função principal desses peptídeos de proteger os anfíbios contra microrganismos patogênicos. (CONLON, 2011).

Deste modo, os peptídeos de anfíbios merecem um estudo mais detalhado relativamente à sua descrição e seus mecanismos bioativos de ação, podendo ter interesse biotecnológicos como potenciais drogas antimicrobianas e imunomoduladoras. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo descrever o poder farmacológico e biotecnológico de peptídeos secretados da derme dos anfíbios.

2. METODOLOGIA

O vigente trabalho de conclusão de curso teve como método seguido de uma revisão bibliográfica no formato narrativo com intuito de descrever e discutir um assunto em relação seu desenvolvimento com uma análise da literatura publicada em artigos de revistas eletrônicas do ponto de vista teórico ou contextual.

Foram realizadas buscas bibliográficas em base de dados eletrônicas de publicações tais como: Google Acadêmico, Pubmed, SciELO e BVS (Biblioteca Virtual em Saúde). As palavras-chave utilizadas foram: *Anuro*, *Potencial Bioativo*, *Bombina*, *Hypsiboas*, *Peptídeos*, *Imunomoduladores*, *Anti-inflamatórios*, *Antimicrobianos*, *PAMs*, *Figaininas*, *Reniceptinas*, *Derme e Anfíbio*. As palavras-chave foram pesquisadas em inglês e português, individualmente ou em conjunto na busca de resultados significantes. Período de abrangência foi entre 2002 a 2018, contudo vários artigos fora desse intervalo também foram utilizados por possuírem um caráter significativo para a elucidação do tema.

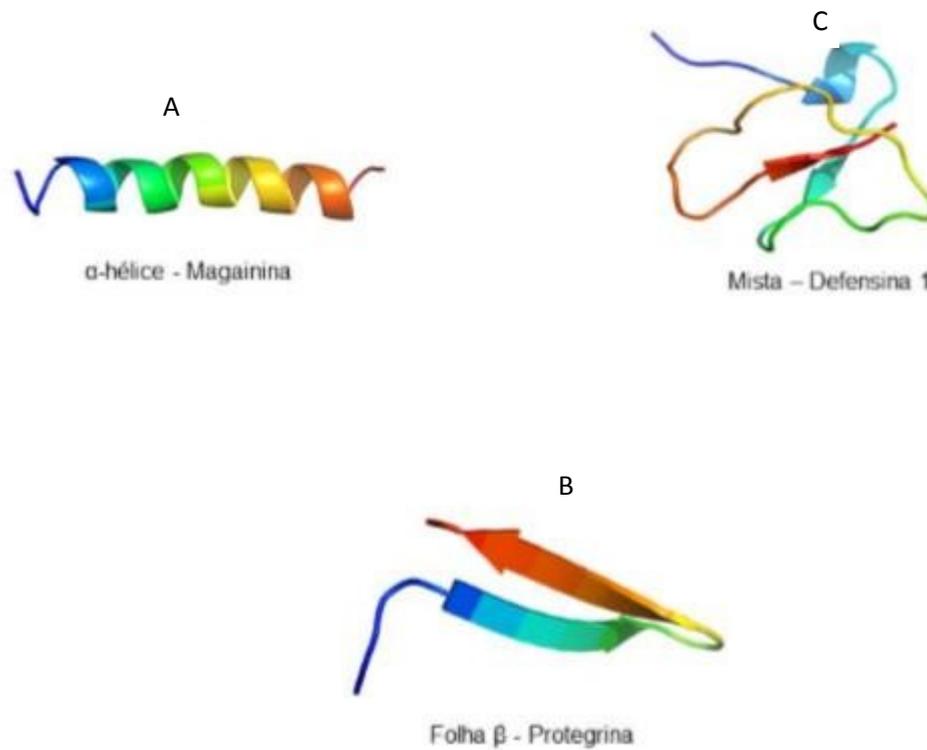
3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Estrutura dos PAMs em anuros

Segundo Straus e Hancock (2006), mais de 700 peptídeos com atividade contra microrganismo já foram descritos, apesar de possuírem uma variação de sequência e estrutura eles possuem características em comum: natureza anfipática, possuem de 12 a 50 resíduos de aminoácidos e positivamente carregados transfigurando como catiônicos.

Do mesmo modo que apresentam uma variação em sua extensão de cadeia de peptídeos, apresentam também características estruturais diversas que são alocadas em três famílias (Figura 2). A primeira e mais comum é a α -hélices (A) que dispõem de cadeias com característica anfipática e são formados quando o peptídeo entra em contato com as membrana celulares como as famílias de peptídeos Migaininas e Dermaseptinas; folhas- β (B) estabilizadas por duas ou três ligações de sulfeto que podem apresentar pequenas porções de α -hélices, como as Breveninas e Gaeguerinas e por fim e menos comum as estruturas curvadas (C) que apresentam conformação mista entre folhas- β e α -hélices e formada também por pontes simples de sulfeto ou devido à presença de resíduos de Prolinas como as Temporinas (Tabela 1) (VERLY, 2010; POPOV, 2017).

Figura 2.- Conformação diversificada de peptídeos bioativos de anuros.



FONTE: Santana (2016), modificada.

Tabela 1. Relação entre espécie, alguns peptídeos bioativos e conformação estrutural.

Gênero	Peptídeo Bioativo	Conformação
<i>Phyllomedusa</i>	Dermaseptinas	α -hélices
<i>Xenopus</i>	Magaininas	
<i>Rana</i>	Breveninas Esculetinas, Gaegerinas	folhas- β
<i>Rana</i>	Temporinas	Curvadas

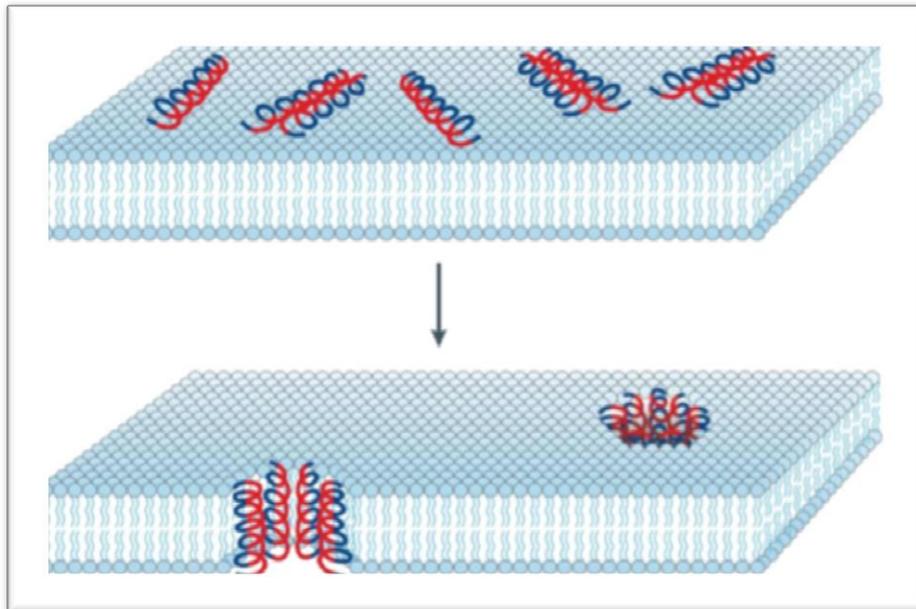
FONTE: Adaptado de Popov, 2017.

3.2 Mecanismos de Ação dos PAMs

Os mecanismos de ação correlacionados com os PAMs ocorrem na maioria das vezes com a interação dos peptídeos, podendo se ligar e interagir diretamente com fosfolipídios da membrana plasmática bacteriana, desestabilizando a integridade física da membrana. (ZASLOFF, 2002).

De acordo com Santana (2016), a conformação peptídica está diretamente ligada com mecanismo de ação associado. Alguns modelos explicativos foram propostos para esclarecer a interação dinâmica para a morte gerada por dano membranar. O modelo de *Barrel-stave*, por exemplo, sugere uma interação de vários peptídeos organizados em formato de “barril” promovendo a formação de poros criando assim um canal transmembranar. Os peptídeos, no modelo em questão, interagem ligando-se a bicamada lipídica da membrana celular e em seguida penetra nessa bicamada induzindo a formação de poros de forma perpendicular a membrana (Figura 3) (VERLY, 2010; HAMILL; HANCOCK, JENSSEN, 2006; BROGDEN, 2005).

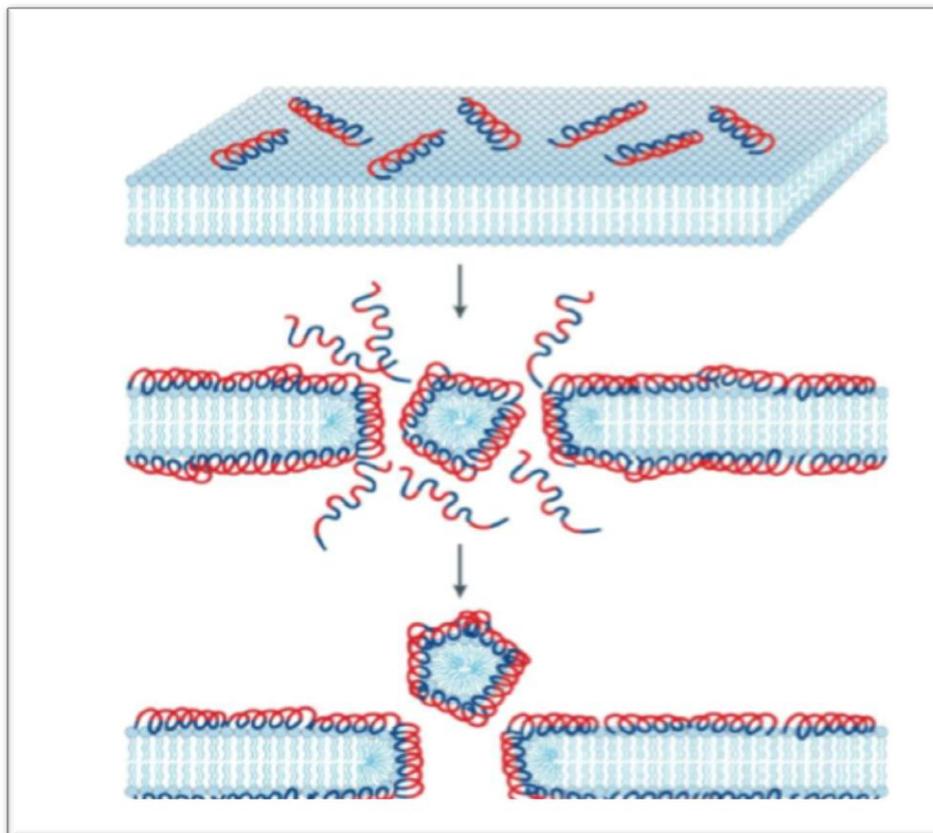
Figura 3. Modelo de *Barrel-stave* em forma esquemática demonstrando a interação dos peptídeos com a bicamada lipídica da membrana para a indução de morte bacteriana.



FONTE: Brogden, 2005.

Outro modelo descrito é o modelo de tapete (*Carpet-like*) a qual os peptídeos abrangem paralelamente a superfície da membrana cobrindo sua superfície semelhante a um tapete de moléculas. Os peptídeos se inserem na bicamada desorganizando-a devido a interação eletrostática com os lipídios promovendo a partir, da tensão na curvatura da membrana, desintegração e permeabilização da bicamada. (Figura 4) (VERLY, 2010; SANTANA, 2016).

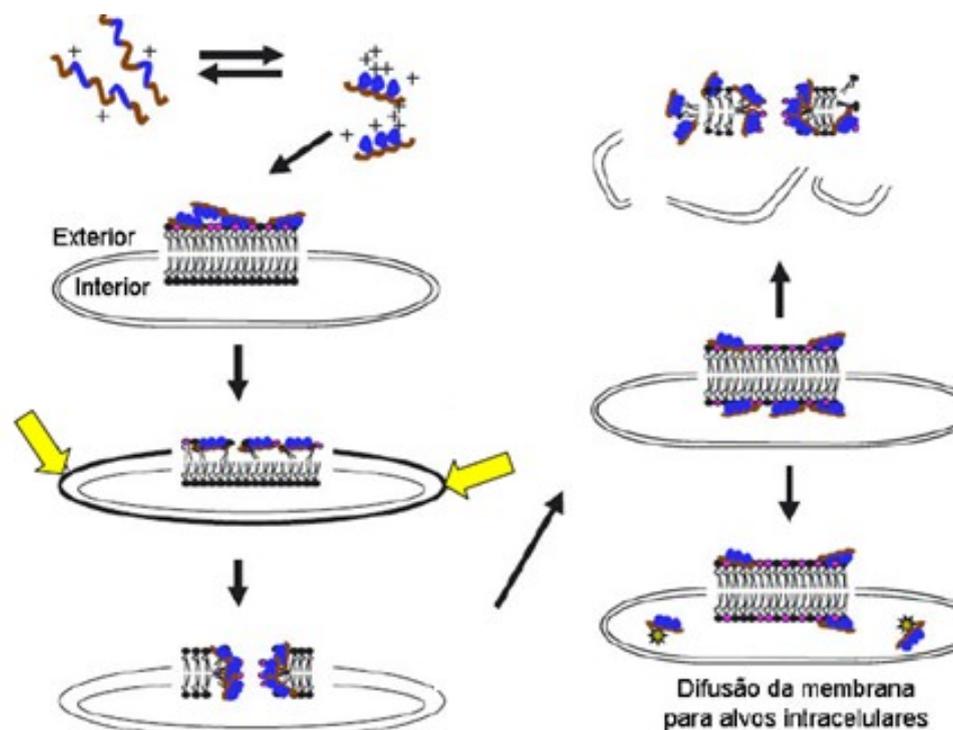
Figura 4. Modelo de *Carpet-like* em forma esquemática demonstrando o atapetamento de peptídeos que promove uma tensão na curvatura da membrana até o rompimento.



Fonte: Brogden, 2005.

Ademais, outro modelo também descrito na literatura, é o modelo cuja ação se apresenta mais comumente em peptídeos menores como as Temporinas. Segundo Santana (2016) este modelo envolve a formação de carpete e de poro pela adesão de peptídeos na membrana do microrganismo, esse carpete promove um afinamento da camada lipídica, e em consequência, ocorre a formação de poros na superfície, assim, gerando a lise da membrana. Estudos apontam que o peptídeo após formar os poros e adentrar à célula do microrganismo podem interferir as funções metabólicas se ligado às estruturas intracelulares: DNA por exemplo (RINALDI, 2002) (Figura 5).

Figura 5. Modelo de SMH ilustrativo demonstrando a formação do carpete de peptídeos e consequentemente promovendo o afinamento da membrana e com isso favorecendo a formação de poros na membrana.



Fonte: Verly (2010), modificada.

3.3 Peptídeos antimicrobianos expressos em anuros

Com o interesse científico em novas moléculas que atuam com potencial antimicrobiano, em 1969, Csordás e Michl isolaram o primeiro peptídeo com atividade antimicrobiana e hemolítica, a bombina, um peptídeo encontrado na secreção cutânea do anfíbio *Bombina variegata* (*B. Variegata*;). Pouco tempo depois, em 1970, Csordas e Michl também isolaram a bombina na espécie *Bombina orientalis* (*B. Orientalis*) apontando a presença do mesmo peptídeo em espécies diferentes (CSORDAS; MICHL, 1969; CSORDAS; MICHL 1970 apud FALICO, 2014).

A família de peptídeos bombinha segundo Gibson (1991, apud SANTANA, 2016) apresenta amplo espectro contra microrganismo, contudo, devido seu elevado potencial tóxico essa família de peptídeos provoca lise nas células sanguíneas. Em 2017, Zhou e colaboradores analisaram dois novos peptídeos da família das bombinas: a bombina BLP-7 e a bombina H-Bo e foram apresentados com uma gama de bioatividade incluindo atividade antimicrobiana, potencial antitumoral e com efeitos hemolíticos diminuídos.

Em 1987, Zasloff isolou e encontrou novos peptídeos com potencial antimicrobiano secretado de *Xenopus laevis*, entre eles estavam peptídeos da família das Magaininas (Magaininas I e II) que apresentaram resultados significativos como potencial antibiótico (POPOV, 2017). A partir de um Peptídeo análogo a migainina II sintetizado, o MSI-78, a indústria “Magainin Pharmaceuticals” conseguiu desenvolver um creme antibiótico potencialmente terapêutico objetivando para o combate de úlceras de pé causadas pelo diabetes, contudo foi rejeitado na fase final de testes em 1999 pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (FDA) por não possuir efeito superior aos semelhantes já comercializados (MOORE, 2003; CEOLIN, 2014).

Os peptídeos pertencentes as famílias Dermaseptinas e Filoseptinas presentes nos anuros do gênero *Phyllomedusa* também apresentaram atividade bactericida com baixa atividade hemolítica (MANDEL, 2008). Kuckelhaus e colaboradores (2009) ao estudar peptídeos da espécie *Phyllomedusa azurea*, além de comprovar o potencial bactericida também demonstrou a possível ação contra protozoários *Leishmania amazonenses* e *Plasmodium falciparum in vitro*.

Não diferente, a espécie *Hypsiboa raniceps* apresenta grandes expectativas quanto à capacidade biotecnológica de suas moléculas (SANTANA, 2016). Magalhães e colaboradores, (2008), identificaram uma nova família de peptídeos antimicrobianos desses anuros, as Raniceptinas. No estudo produzido, foram identificados dois novos peptídeos em maior abundância na derme da espécie *H. raniceps* pertencentes à família das Reniceptinas os peptídeos Ref-1 e Ref-2. Esses peptídeos foram testados contra três tipos de cepas patogênicas para humanos, *Escherichia coli* American type culture collection (ATCC) 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29313. Apresentando concentração inibitória mínima (MIC) de 5 a 10 µM contra as bactérias gram- negativas e 20 µM contra gram-positiva. No disposto estudo esses peptídeos além de demonstrarem ter ação antimicrobiana também apresentaram baixa atividade hemolítica, sendo assim correlacionados com peptídeos de outros gêneros de anfíbios que obtiveram resultados similares, como é o caso das Dermaseptinas do gênero *Phyllomedusa sp.* (WANG; Li; Li, 2004; MAGALHÃES, 2008).

Barbosa (2010), demonstrou que após sofrer estresse abiótico (estímulo elétrico de 5V) e estresse biótico (presença de microrganismos), a taxa de expressão dos genes que codificam esses peptídeos aumentou significativamente. Seu grupo utilizou vários peptídeos presentes na rã *H. raniceps*, entre os peptídeos analisados estão algumas Reniceptinas, já descritos por Magalhães (2008) e outras duas famílias de PAMs dessa espécie, as Dissulfinas e as Figaininas, como mostra a tabela 2.

Tabela 2. Peptídeos antimicrobianos expressos na derme de anfíbios.

Anfíbios	Peptídeos
<i>Xenopus sp.</i>	Magaininas
<i>Bombina sp.</i>	Bombininas
<i>Phyllomedusa sp.</i>	Dermaseptinas
<i>Rana brevipoda</i>	Brevininas
<i>Litoria sp.</i>	Caerinas
<i>Rana rugosa</i>	Rugosinas

<i>Rana temporaria</i>	Temporinas
<i>Litoria cerúlea</i>	Ceruleína
<i>Hypsiboas raniceps</i>	Raniceptinas
<i>Hypsiboas raniceps</i>	Dissulfinas

FONTE:Modificado de Popov, 2017.

Santana (2016) também testou algumas PAMs da espécie *Hypsiboas raniceps*, a figainina Hr22, por exemplo, apresentou uma atividade bactericida com uma dose de 4 μM para patógenos Gram-positivos e entre 4 e 8 μM para bactérias Gram-negativas. Popov (2017) por sua vez, ao analisar algumas Figaininas observou que o peptídeo RC11 também apresentou efeitos inibitórios de 23 μM contra a cepa *E. coli* ATCC 8739 afirmando o potencial antimicrobiano de alguns peptídeos isolados da derme desse anuro.

A atividade contra outros tipos de microrganismos, como fungos, também é relatada, peptídeos da família Dermaceptinas encontrados no gênero *Phyllomedusa*, bem como os PAMs Migainina I e II também se apresentaram como potencial antifúngico (HONORATO, 2009). Peptídeos híbridos também apresentaram grande potencial, como é o caso do PAM P18 que surgiu da junção da Migainina II com a Cecropina A, peptídeo isolado da espécie de mariposa *Hyalophora Cecropia*, de acordo com Falico (2014) esse híbrido possui grande potencial contra *Candida albicans*, *Aspergillus Flavus*, *Fusarium oxysporum* e *Trichosporum beigelli* com MIC variando de 12,5 a 24 μM .

Na espécie *Hypsiboia raniceps*, poucos estudos relatam ação antifúngica, como é o caso dos peptídeos HR 36 que apresentou 50% de inibição do crescimento de *Candida albicans*, porém somente nas concentrações mais elevadas (FALICO, 2014; Li et al, 2013).

Alguns peptídeos encontrados na secreção de rãs têm apresentado mecanismos de ações antivirais, inativando a partícula viral de promover uma ligação de receptores específicos na superfície celular impedindo sua entrada no citoplasma e início de seu ciclo reprodutivo, essas propriedades afirmam a importância potencial de peptídeos como possíveis antivirais (CONLON, 2014); como, por exemplo, o peptídeo Cearina A da Rã do gênero *Litoria* que apresentou ação antiviral contra os vírus envelopados HIV (Vírus da imunodeficiência humana) e Herpes (HONORATO, 2009); outro exemplo são as Dermaceptinas que apresentaram ação inibitória contra a infetividade de cepas de HIV-1 *in vitro* (LORIN et al., 2005)

Devido à efetividade dos PAMs, o interesse farmacológico vem direcionando suas pesquisas para o desenvolvimento de drogas de uso tópico por se tratar de uma administração e terapia relativamente mais segura comparada as terapias sistêmica uma vez que, apesar de apresentar potenciais de toxicidade baixos *in vitro* em ensaios com modelos animais, a toxicidade dos peptídeos antimicrobianos se apresenta bem próxima do limite permitido o que acarreta em dúvidas quanto a margem de segurança principalmente de forma sistêmica do fármaco (HONORATO, 2009; ZASLOFF, 2002).

3.4 Peptídeos imunomoduladores

Outras atividades utilizando peptídeos, além das ações antimicrobianas, antivirais e antifúngica, também são descritos na literatura. Atualmente, alguns projetos científicos têm voltado à atenção para a propriedade imunomodulatória encontrada nos peptídeos antimicrobianos já que, algumas moléculas conseguem estimular o sistema imune enquanto diminuem respostas inflamatórias do hospedeiro, essas moléculas estão sendo denominadas pela sigla HDP (*host defense peptide*). Um exemplo dessas biomoléculas multifuncionais é a catelicidina humana LL-37 peptídeo com atividade microbiana e capacidade de redução do óxido nítrico (NO) induzido pelo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (HANEY; HANCOCK, 2013; POPOV, 2017). Ademais, essas moléculas também podem atuar como auxiliares para cicatrização de feridas e neovascularização de acordo com Popovic e seu grupo de pesquisa (2017).

Com relação aos Anuros, Cirioni (2002), ao estudar o peptídeo magainina 2, isolado da secreção da pele do anfíbio *Xenopus laevis* correlacionado com beta-lactâmicos contra septicemia, analisou a redução de endotoxinas conjunta a ação antimicrobiana descobrindo assim um novo HDP. Outros anfíbios do gênero *Xenopus* apresentaram uma similaridade elevado com sistema imune inato de mamíferos (ROBERT; OHTA, 2009)

Esses peptídeos com ação imunomodulatória possuem vários mecanismos de ação entre eles a ativação e recrutamento de leucócitos, sinalização para produção de citosinas pró- inflamatórias, quimiocinas e inibição da resposta inflamatória entre outros (BOWDISH, 2005).

Na espécie *Hypsiboas raninceps*, os peptídeos AC12, DK16 e RC11 foram testados *in vitro* com o objetivo de avaliar a produção de NO e da citocina pró-inflamatória TNF- α . Os peptídeos AC12 E DK16 nas concentrações de 128 $\mu\text{g.mL}$ apresentaram redução de 38% e 50% na produção de NO respectivamente. O peptídeo RC11 apresentou um aumento de NO quando adicionado nas concentrações de 128 $\mu\text{g.mL}$ sendo o único peptídeo analisado a produzir uma citotoxicidade elevada nas mesmas concentrações pesquisadas. Esses resultados são de suma importância visto que, o óxido nítrico apesar de um bom bactericida é um marcador inflamatório que em quantidades desproporcionais no organismo pode estar ligada a fisiopatologias como artrite reumatoide (AR) e asma (ALI et al., 2014), outro marcador inflamatório importante foi a produção da citocina TNF- α , os peptídeos AC12 e DK16 diminuíram a produção de TNF- α em cerca de 70%. Esse resultado chama atenção biotecnocientífica para um possível fármaco já que, níveis elevados de TNF- α está diretamente correlacionado a artrite reumatoide. Apesar disso, novos tratamentos de remissão e controle dessa enfermidade estão usando a ação Anti-TNF- α (FALEIRO, 2011; POPOV, 2017).

Ensaio *in vivo* relacionados à ação antiinflamatória são raros, uma vez que há algumas limitações para o seu uso, já que existe uma sensibilidade referente à degradação enzimática e inativação no soro por albuminas. Não bastando, a distribuição tecidual inadequada e potencial toxicidade sistêmica também dificultam o uso *in vivo* (POPOVIC, 2017). Todavia, Popov (2017) ao induzir um edema na pata de camundongos e tratar com os peptídeos AC12, DK16 e RC11, obteve valores significativos com o peptídeo AC12 em relação à redução do edema. O peptídeo apresentou resultados similares a um glicocorticoide com propriedades anti-inflamatório já comercializado no mercado, dexametazona. Glicocorticoides apesar do

potencial efetivo, a longo e as vezes a curto prazo, podem apresentar efeitos colaterais fortes o que indica a necessidade de pesquisa de novos fármacos auxiliares ou substitutivos para esses grupos de medicamentos (CAIDAS, 2001).

Além desses potenciais analisados, um grande passo para comunidade científica que busca potencial bioativo em biomoléculas foi a descoberta de peptídeos análogos a bradicinina (BK) em secreções de diversas espécies de anuros (tabela 3) (MUNDIM, 2008).

Tabela 3. Exemplo de bradicininas isolados de anfíbios

PEPTIDEOS	ESPÉCIE
Bradicinina	<i>Rana temporaria</i>
Filocinina	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>
Bradicinina II	<i>Rana nigromaculata</i>
Ranacinina-O	<i>Bombina orientalis</i>
Bradicinina III	<i>Heleophryne purcelli</i>
Ranacinina-R	<i>Rana rugosa</i>

Fonte: ERSPAMER, 1994 apud COSTA, 2005. Modificada.

A BK, dentre os efeitos descrito, são conhecidos por inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA), promove a vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo nos vasos sanguíneos e diminuindo, deste modo, a pressão arterial. A BK é tida como um medidor inflamatório que facilitando a migração das células de defesa para o local afetado; está presente também em algumas terminações nervosas desempenhando papel de ativação e manutenção das vias de dor (MUNDIM, 2008; CAVALCANTE, 2015).

Peptídeos antagonistas, análogos e peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP) foram também descobertos na secreção de diversas espécies de rãs do gênero *Phyllomedusa* como por exemplo, nas espécies *Phyllomedusa hypochondrialis* que apresentou um BPP, a Phypo A, capaz também de aumentar a ação da BK e consequentemente inibir a ECA (CONCEIÇÃO, 2007 apud, CAVALCANTE, 2015).

Outras espécies como *Phyllomedusa rohdei*, *Phyllomedusa tomoptema* e *Phyllomedusa burmeisteri* também apresentaram peptídeos análogos a BK (MUNDIM, 2008).

Atualmente medicamentos a base de bradicinina são comercializados mundialmente graças a descoberta desse nanopéptido a partir do veneno de jararaca pelos pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP); A indústria farmacêutica Squibb conseguiu sintetizar uma nova molécula ao BPP provindo do veneno de Jajaraca e conseguiu sintetizar a primeira substância com efeitos terapêuticos na hipertensão que inibia a atividade da ECA, o fármaco chamado Captopril (FERREIRA, 1998; FMRP-USP, 2012).

Após essa descoberta e síntese desse novo medicamento, outros fármacos derivados das moléculas BPP começaram a ser sintetizados em outros laboratórios (FMRB-USP, 2012). Esse grande achado consolida a importância de estudos com peptídeos naturais tendo como insumo diversos anuros que possuem moléculas análogas ou potencializadoras de BK.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos anfíbios, a busca de novas moléculas com diversas ações relacionada à estratégia de defesa tem se tornado cada vez mais relevante, além disso, a caracterização da atividade funcional de novos peptídeos encontrados tem chamado a atenção da comunidade científica não só pela variedade, mas também, devido as diferentes funções biológicas apresentadas. Na busca de novos potenciais farmacológicos pertinentes à ampla diversidade de enfermidades, as espécies variadas de anuros se aparentam como fonte de conhecimento acendendo expectativas futuras na busca da síntese de novas drogas.

A gama de peptídeos analisados no estudo confirma a perspectiva esperada do presente potencial bioativo, contudo, é importante ressaltar a necessidade de novos estudos esgotando as diversas metodologias presentes na literatura em relação aos potenciais ativo correlacionado com outras espécies ou até mesmo de outras classes biológicas já elucidadas.

Foi comumente perceptível que apesar de apresentar função de defesa dos anuros, os artigos mostraram uma deficiência de resultados em relação a diversidade de ensaios. O estudo contra antimicrobiano foi o que se apresentou mais completo com ensaios sob cepas de bactérias, principalmente. Com relação a fungos, vírus e parasitas, existe um déficit de artigos. Dificilmente o mesmo peptídeo é testado para todos os tipos de microrganismo, esse fato pode estar relacionado ao elevado custo das pesquisas bem como, a complexidade estrutural do agente patogênico que muitas vezes é, de fato, resistente a ação do peptídeo.

Em relação à ação imunomodulatória, a literatura apresenta alguns estudos interessantes com grandes perspectivas futuras, como é o caso dos peptídeos analisados por POPOV (2017) que apresentou o peptídeo AC12 como potencial fármaco comparado a glicocorticoides já comercializado. Além disso, peptídeos potencializadores de bradicinina e análogos também apresentam grandes expectativas já que, esses peptídeos já auxiliam na síntese de fármacos como é o caso do Captopril.

Contudo, vale ressaltar que são poucos os testes *in vivo* devido a complexidade dos conselhos de bioética, custo elevado e locais adequados para tais pesquisas. Essas dificuldades proporcionam lacunas sobre a eficácia segura e completa dos peptídeos descritos abrindo assim, um leque de opções para novas pesquisas com grandes perspectivas de drogas futuras.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A. M. et al. Níveis de óxido nítrico mais elevados estão associados à atividade da doença em pacientes egípcios com artrite reumatoide, **Revista Brasileira de Reumatologia** Brasil v.54, n. 6, p. 446-451, Nov /Dez 2014

BARBEAU, T. R.; LILLYWHITE, H. B. Body wiping behaviors associated with cutaneous lipids in hylid tree frogs of Florida. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 208, p.2147-2156, jun. 2005

BARBOSA, E. A. **Avaliação da transcrição, expressão e indução de genes que codificam peptídeos antimicrobianos em *H. raniceps* por ferramentas de biologia molecular e espectrometria de massa**. 2010. 82f. Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós graduação Pós-graduação da UnB. 2010

BOWDISH, D. M. et al. Immunomodulatory Activities of Small Host Defense Peptides. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Washington v. 5, n. 49, p.1727-1732, maio 2005.

BROGDEN K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. **Nature Reviews Microbiology**. London V.3 p. 238-250 mar. 2005.

CAIDAS, D.; SCHRANK, Y. Cushing syndrome after abusive use of a nasal preparation containing dexamethasone: A case report. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, Brasil v. 67, n. 6, nov./dez., p. 868-871, 2001.

CAVALCANTE, I. D. **Análise Bioquímica e Biológica da Secreção Cutânea do Anuro *Dermatonotus muelleri***. 2015. 72f. Dissertação (Mestrado) do programa de Pós-Graduação em Ciências do Instituto Butantan, Brasil. 2015.

CEOLIN M. D. O. **Análise do conteúdo da secreção cutânea do anuro *Pipa carvalhoi* a procura de possíveis moléculas com atividades biológicas relevantes**. 2014 f.102 Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Graduação em Toxinologia, Instituto Butantan, Brasil. 2014.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria**. Disponível em: site: < <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m45/>> - Acesso em: 23 Oct. 2017.

CONLON, J. M.; MECHKARSKA, M. Host-Defense Peptides with Therapeutic Potential from Skin Secretions of Frogs from the Family Pipidae. **Pharmaceuticals**, Suíça, v. 7, n. 1, p.58-77, 15 jan. 2014.

CONLON, J. M. The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. **Cellular Tissue Research**, London, v. 343, n. 1, p. 201-212. Jan, 2011

COSTA, T.O.G. **Purificação e Determinação Estrutural de Substâncias Bioativas em Três Espécies de *Osteocephalus* (Amphibia:Anura:Hylidae)**. 2005. 201f. Dissertação(Doutor) do programa em ciências da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil 2005.

Csordás, A.; Michl, H. Primary structure of two oligopeptides of the toxin of *Bombina variegata* L. **Toxicon**, EUA v.0792 p. 103-108. 1969

- DELFINO, G.; BRIZZI, R.; ALVAREZ, B. B.; KRACKE-BERNDORFF, R. Serous cutaneous glands in *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae): secretory patterns during ontogenesis. **Tissue & Cell**, Tokyo. v. 30 n.1 p.30-40. Aug. 1998
- FALEIRO, L. R.; ARAÚJO, L. H. R.; VARAVALLO, M. A. A Terapia Anti-TNF- α na Artrite Reumatóide, **Revista UEL - Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 77-94, jan./jun. 2011.
- FALICO, D. A. **Identificação, purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps***. 2014. 63f. Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós graduação Pós-graduação da UnB. 2014
- FERREIRA, S. H. Aspectos históricos da hipertensão: Do fator de potenciação da bradicinina (BPF) aos inibidores da ECA. **HiperAtivo Brasil**, v. 5, n.6 p. 6-8 Jan. 1998
- FMRP - USP - Jornal de medicina de ribeirão preto. **A Hipertensão Sob Controle**. Disponível em: site: < <http://www.fmrp.usp.br/usp-8-decadas-de-servicos-contribuicoes-da-fmrp-usp-a-hipertensao-sob-controle/> > - Acesso em: 04 maio. 2018
- HANEY, E. F.; HANCOCK, R. E. W. Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. **Biopolymers**, Italy v. 100, n. 6, p.572-583, nov. 2013.
- HONORATO, C. T. M. **Análise peptidômica da secreção cutânea do anuro *Eupemphix nattereri* com ênfase na prospecção de peptídeos antimicrobianos**. 2009. 62 f., Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)-Animal -Universidade de Brasília, 2009
- JENSSEN, H.; HAMILL, P. E HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents **Clinical microbiology reviews**, Washington. v.19, n.3, p.491-511. Jul. 2006
- KÜCKELHAUS, S.A.S. et al. Antiplasmodial and Antileishmanial Activities of Phylloseptin-1, an Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of *Phyllomedusa Azurea* (Amphibia). **Experimental Parasitology**. Austrália v.123 p.11–16. Mar. 2009
- LI, A.; ZHANG, Y.; WANG, C.; WU, G. WANG, Z. Purification, molecular cloning, and antimicrobial activity of peptides from the skin secretion of the black-spotted frog, *Rana nigromaculata*. **World J. Microbiol.** Netherlands v.29, p.1941-1949 jan. 2013.
- LORIN, C. et al. The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. **Virology**. France v. 334, n. 2, p. 264-275, Apr. 2005.
- MAGALHÃES, B. S. et al. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. **Biochemical Biophysical Research Communication**, Orlando; v. 26, p.1057-1061, Dez. 2008.
- MANDEL, S.M.S. **Prospecção de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de anfíbios do gênero *Phyllomedusa***. 2008. 71 f., Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)-Animal -Universidade de Brasília, Brasília,2008.
- MOOKHERJEE, N.; HANCOCK, R. E. Cationin host defense peptides: immune regulatory peptides as a novel approach of treating infections. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Suíça, .v. 64, p.922-33 Maio. 2007
- MOORE A. The big and small of drug discovery. **EMBO Reports**. London v. 4 p.114–117. Fev. 2003
- MUNDIM, N. **Prospecção de Bradicininas de anfíbios do gênero *Phyllomedusa***. 2008. 72f. Dissertação (Mestrado) do programa de Pós-Graduação em Biologia Animal UnB, Brasil. 2008

- NOSI, D.; TERRENI, A.; AL3, VAREZ3, VAREZ, B. B.; DELFINO, G. Serous gland polymorphism in the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* (Anura, Hylidae): response by different gland types to norepinephrine stimulation. **Zoomorphology**. Berlin, v. 121 p.139-148, Fev.fev. 2002.
- POPOV, Cláudia. **Caracterização estrutural e funcional de peptídeos isolados da derme de *Hypsiboas raniceps* (Anura)**. 2017. 154f.(Doutorado) em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brasil. 2017
- POPOVIC, S. Effects of host defense peptides B2RP, Brevinin-2GU, D-Lys-Temporin, Lys-XT-7 and D-Lys-Ascaphin-8 on peripheral blood mononuclear cells: Preliminary study. **Periodicum biologorum**, v. 119, n. 2, Abr.2017.
- RINALDI A. C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. **current opinion in chemical biology**. Eua v.6 p.799-804. Dec. 2002.
- ROBERT, J.; OHTA, Y. Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*. **Developmental Dynamics**, suíça v. 238, n. 6, p.1249-1270, jun. 2009.
- SANTANA, C. J. C. **Caracterização química e biológica de peptídeos com propriedades antiproliferativas isolados da secreção cutânea do anuro *Hypsiboas raniceps* (Cope, 1862)**. 2016 84f. Dissertação (mestrado) do programa de pós Pós-Graduação em Biologia Animal UnB. 2016.
- SBH (Sociedade Brasileira de Herpetologia). **Espécies de anfíbios do Brasil**. Disponível em: site: <<http://sbherpetologia.org.br/listas/lista-anfibios/>> - Acesso em: 2 abr. 2017
- STRAUS S. K., HANCOCK R. E. W. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens, daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. **Biochim. Biophys**. Canada v. 1758 p.1215–1223. Set.2006
- TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. Comparative Biochemistry and Physiology Part A. **Physiology**, Amsterdam v.111A, p. 1-29. May 1995.
- VERLY, R. D. **Peptídeos antimicrobianos: síntese, ensaios biológicos, estudos termodinâmicos e análise estrutural por RMN em meios biomiméticos**. 2010. 182f Tese(Doutorado) apresentada ao programa de pós graduação da Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química. 2010.
- WANG, G.; LI, Y.; LI, X. Correlation of Three-dimensional Structures with the Antibacterial Activity of a Group of Peptides Designed Based on a Nontoxic Bacterial Membrane Anchor. **Journal Of Biological Chemistry**, France v. 280, n. 7, p.5803-5811, 30 nov. 2004.
- ZASLOFF, M AntimicrobialM Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**. London 415 p. 389-395 jan. 2002.
- ZASLOFF, M. Misteries that still remain. **Biochimica et Biophysica acta**. EUA. v. 1788 p.1693-1694. Jan. 2009.
- ZHOU .C. et al. Discovery of two bombinin peptides with antimicrobial and anticancer activities from the skin secretion of Oriental fire bellied toad, *Bombina orientalis*. **Chemical Biology & Drugs Design**, Oxford. v.91 p. 50-61, Jun. 2017