

Isolamento, caracterização e atividade bacteriana de peptídeos bioativos da secreção cutânea de *Pseudopaludicola* sp.

Allane Maria Vaz Ribeiro (Bolsista PIBIC/UFPI), Rafael Magalhães (Colaborador, BIOTEC/UFPI), José Roberto de Souza Almeida Leite, (Orientador, UFPI/CMRV).

Introdução. O armamento terapêutico atualmente utilizado para tratar infecções microbianas está restrito a antibióticos desenvolvidos especificamente como modelos bactericidas ou bacteriostáticos para bactérias isoladas, não levando em consideração a biologia de seu alojamento em grupo, onde se apresentam com maior resistência devido à inativação da droga por polímeros ou enzimas extracelulares ou à dificuldade de penetração e atuação em todo biofilme, dentre outros fatores (SRITHARAN & SRITHARAN, 2004). O gênero *Pseudopaludicola* compreende pequenas rãs que não ultrapassam os 20 mm de comprimento total. Estas espécies muito se assemelham, sendo que algumas vivem simpatricamente. A distribuição do gênero se estende por grande parte da América do Sul, desde o sudeste do Brasil até o leste da Bolívia, passando pelo Paraguai e Argentina ocorrendo principalmente em áreas abertas e alagadas com presença de gramíneas, no período reprodutivo essas áreas apresentam centenas, ou até milhares de indivíduos. Dourado et al. (2007) e Leite Jr. et al. (2009, *no prelo*) identificaram duas classes de peptídeos antimicrobianos isoladas de anfíbios da família leptodactylidae, syphaxinas e ocellatinas, respectivamente, que apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas. Apesar do gênero *Pseudopaludicola* nunca ter tido seu veneno estudado para fins farmacológicos e estar inserido em outra família (leuperidae), acredita-se que estes grupos estejam relacionados, podendo haver similaridade estrutural entre as moléculas da secreção cutânea. **Objetivos.** Esse projeto tem como objetivo principal o isolamento, a caracterização e a prospecção da atividade antimicrobiana de peptídeos bioativos da secreção cutânea de *Pseudopaludicola* sp. **Material e Métodos.** O estudo de campo será realizado dentro da região do Delta do Parnaíba nos municípios de Parnaíba/PI, Ilha Grande/PI e Araisos/MA nas áreas alagadiças e campos úmidos da região. O sistema DGPS utilizado para o mapeamento dos espécimes será um receptor GPS, que utiliza o código C/A para os cálculos de posicionamento. Este equipamento recebe correção diferencial via satélite para o DGPS, sendo este serviço disponibilizado pelo Instituto de Pesquisas Espaciais (INPE, DF). Durante o mapeamento, a pé, de carro e/ou barco de pescadores locais e a este equipamento será montado o DGPS e um notebook. O programa utilizado no mapeamento será o GPS track maker, que possui uma interface com o GPS para o georreferenciamento. A extração dos peptídeos será realizada por meio de estimulação elétrica da região glandular do animal. O extrato total será filtrado e liofilizado. O material será purificado em sistema HPLC de fase reversa utilizando colunas semi-preparativa e analítica. O grau de pureza e a massa molecular exata serão determinados por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF. Foi-se extraído o veneno dos machos. O veneno foi colocado em tubos de ensaio sendo mantidos em refrigeração. O veneno foi colocado para secar na centrífuga por 13 horas e posteriormente foi analisado em um HPLC (Cromatógrafo líquido de alto

desempenho). **Resultados e discussão.** Na **Figura 1** possui um amplexo para liberação dos ovos desta espécie. O *Pseudopaludicola* possui hábito noturno e diurno, seu tamanho é em torno de 2 cm (distância rostró-croacal) e se camufla muito entre a vegetação. Tornando seu processo de coleta demorado.

O rendimento da produção de veneno também é pequeno, logo, foram necessários muitos exemplares para que conseguíssemos algo em torno de 5 mg de material para começarmos a parte bioquímica do projeto.



Figura 1. Fotografia do amplexo de *Pseudopaludicola* sp. Amplexo axial.

Na **Figura 1** possui um amplexo para liberação dos ovos desta espécie. O *Pseudopaludicola* possui hábito noturno e diurno, seu tamanho é em torno de 2 cm (distância rostró-croacal) e se camufla muito entre a vegetação. Tornando seu processo de coleta demorado.

O rendimento da produção de veneno também é pequeno, logo, foram necessários muitos exemplares para que conseguíssemos algo em torno de 5 mg de material para começarmos a parte bioquímica do projeto.

Após o armazenamento do material 2 mg do extrato total foram injetados em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) como demonstrado na figura abaixo. O extrato total desta espécie é pobre comparado com outras espécies de anfíbios. Aparentemente existe apenas algumas frações, com destaque para a fração 5, que será liofilizada e analisada em espectrometria de massa para determinação de massa molecular e sequenciamento. Como próximo passo será realizado a determinação de atividade bacteriana da fração 5, assim como a determinação de sua estrutura química.

Os resultados demonstram que os íons com massa molecular que correspondem aos peptídeos caracterizados pelo sequenciamento de cDNA começam a ser detectados na pele 24 horas depois que o estímulo elétrico foi aplicado (Figura 4) e alcançam níveis de detecção e distribuição mais altos 36 horas após o estímulo, momento no qual os níveis de expressão dos genes que codificam os peptídeos antimicrobianos começam a baixar.

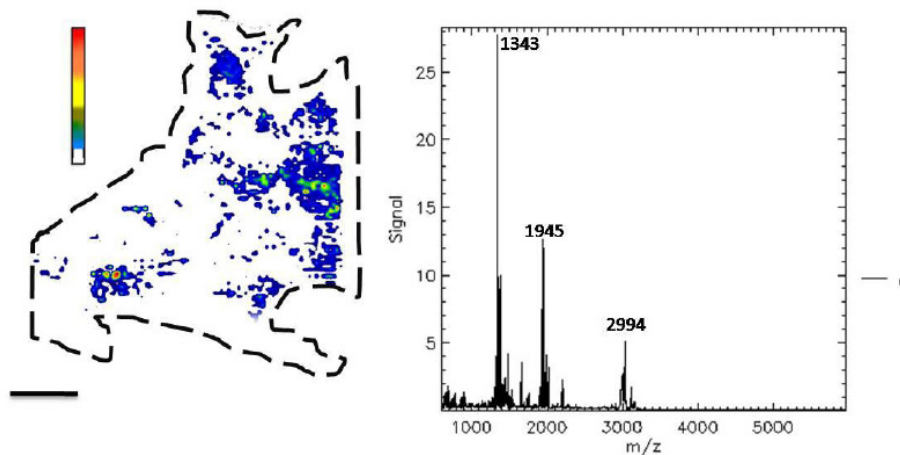


Figura 2. Imagens moleculares dos tecidos cutâneos de *Pseudopaludicola* realizadas por meio de espectrometria de massa. O tecido foi isolado de um animal que não sofreu estimulação elétrica cujo tecido foi obtido no primeiro dia de experimento – Controle C1 - (animal não submetido ao cativeiro).

O gráfico acima representa o espectro de massas global resultante da análise. Apenas os íons com massa molecular igual aquela dos peptídeos caracterizados por sequenciamento de cDNA estão representados nas imagens. As linhas pontilhadas representam a área do tecido a qual foi feita a varredura. As barras horizontais localizadas no canto inferior esquerdo de cada imagem representam uma escala de 5 mm. **Conclusão.** A depleção do conteúdo peptídico estocado nas glândulas granular presentes na pele de *Pseudopaludicola*, promovida pelo estímulo elétrico, induz a um aumento dos níveis de transcrição de genes que codificam peptídeos antimicrobianos. Como próximos passos, que serão realizados até o seminário de IC na UFPI, farão os testes biológicos de atividade antibacteriana dos peptídeos identificados acima nas análises de espectrometria de massa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FROST, D.R. *Amphibian Species of the World: an online reference*. V. 40 (22 august 2004). Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA. Acessado em: 04 de janeiro de 2007.

HARVEY, A. (2000) Strategies for the discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, **5**, 294-300.

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

Palavras chave: Anfíbios; antimicrobianos; *Pseudopaludicola*.