

Isolamento, caracterização e atividade anti-protozoários de peptídeos bioativos da secreção cutânea de *Pseudopaludicola* sp.

Sherelyn Nícia de Geus (Bolsista PIBIC/UFPI), Rafael Magalhães (Colaborador, BIOTEC/UFPI), José Roberto de Souza Almeida Leite, (Orientador, UFPI/CMRV).

INTRODUÇÃO. Atualmente existem no mundo cerca de 5.362 espécies de anfíbios anuros, distribuídas entre 45 famílias (Frost, 2007). O Brasil possui a maior biodiversidade terrestre do mundo e em território brasileiro são encontradas 748 espécies de anuros (SBH, 2006), distribuídas em 10 famílias o que torna o país um dos mais diversos do mundo para o grupo. É no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade.

O gênero *Pseudopaludicola* atualmente possui 12 espécies, facilmente identificáveis morfológicamente por serem rãs diminutas, que normalmente não ultrapassam 20 mm de comprimento-rostro-cloacal, entretanto o número de espécies do gênero tende a aumentar devido ao fato de que existem fortes indícios que muitas espécies vivem simpatricamente e que algumas delas já foram diferenciadas através de estudos citogenéticos segundo FÁVERO *et al*, 2008.

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. Demonstra grande adaptação ao antropismo sendo encontrado desde as alagadas plantações de arroz, até mesmo nas proximidades de algumas cidades no litoral brasileiro. **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.** Distribuição e mapa espécie-área. 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. Purificação dos peptídeos. 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. Os peptídeos sintetizados quimicamente identificados e caracterizados a partir da secreção cutânea dos anfíbios serão purificados em várias etapas utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF. A análise em espectrometria MALDI TOF será

avaliada em parceria com a EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. O banco de secreções foi construído a partir da bioestimulação da região dorsal dos anfíbios, o material foi coletado em água nanopura, filtrado, liofilizado em concentrador de amostra e depois conservado em freezer a -20 °C. **RESULTADOS E DISCUSSÃO.** Para esta primeira fase do trabalho, as alunas bolsistas (PIBIC/UFPI e PIBIC/CNPq), fizeram a parte prática do trabalho em conjunto, gerando os mesmos dados. A partir deste ponto será dividido em função da atividade biológica a ser testada. Nesta primeira fase, além da revisão bibliográfica foram realizadas coletas de material biológico, extração do veneno e armazenamento liofilizado da secreção. Na **Figura 1** possuem várias fotos relacionadas aos animais estudados com seus respectivos ecossistemas de coleta. A *Pseudopaludicola* estudada se trata de uma espécie nova onde o trabalho de coleta é realizado em conjunto com os zoólogos que estão realizando sua descrição. O Amplexo é subaxial e possui comportamento diurno e noturno de vocalização, mas devido ser camuflado existe dificuldade de coleta nas áreas do Delta como as Ilhas das Canárias. 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 seqüenciamento.

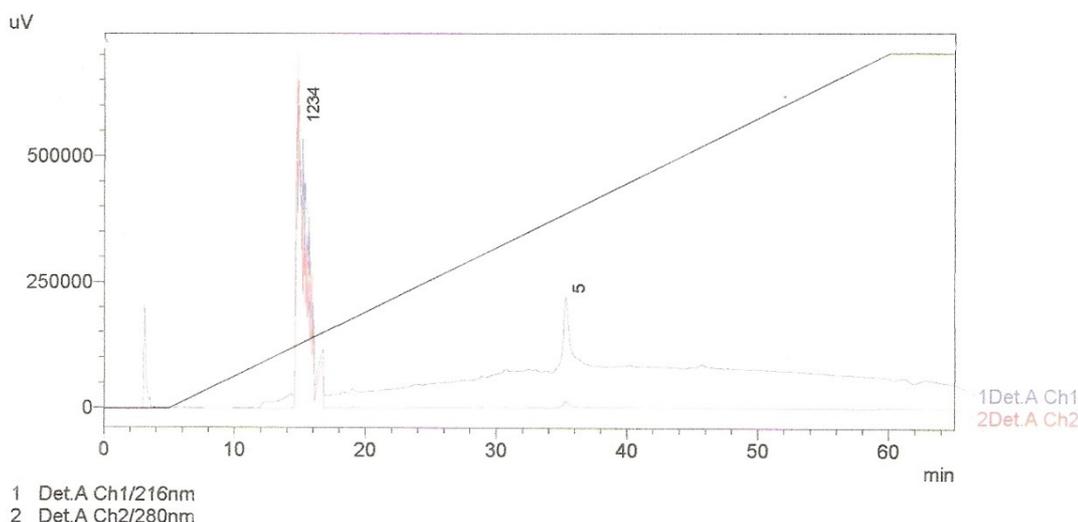


Figura 2. Cromatograma do extrato total de *Pseudopaludicola* sp. O experimento foi realizado com leitura simultânea a 216 e 280 nm.

CONCLUSÃO. A presença de micro-organismos na pele de *Pseudopaludicola* estimula o aumento dos níveis de transcrição dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos nesses animais, assim como, todo o processo de síntese, processamento e estocagem desses peptídeos nas glândulas granulares. Uma solução contendo ampicilina, oxacilina e gentamicina estimulam, por meio de um mecanismo ainda desconhecido, a síntese de peptídeos antimicrobianos enviados para a pele do

anfíbio, de maneira mais eficiente que a solução contendo os micro-organismos testados. Os resultados apresentados nesse trabalho são fruto de uma estratégia ainda inédita na literatura, especialmente no que diz respeito a um modelo de infecção para avaliação da expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos anfíbios, assim como, da estocagem desses peptídeos nas glândulas granulares. Como continuação do trabalho, os peptídeos previamente identificados por espectrometria de massa serão testados em células de protozoários na forma amastigota e promastigota do gênero *Leishmania* até o prazo da apresentação do painel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAND, G.D.; LEITE, J.R.S.A.; SILVA, L.P.; ALBUQUERQUE, S.; PRATES, M.V.; AZEVEDO, R.B.; CARREGARO, V.; SILVA, J.S.; SA, V.C.L.; BRANDAO, R.A.; BLOCH JR., C.; J. Biol. Chem. 277 (51) (2002) 49332–49340.

BRAND, G.D., LEITE, J.R.S.A., MENDEL, S.M.S., MESQUITA, D.A. SILVA, L.P., PRATES, M.V., BARBOSA, E.A., VINECKY, F., MARTINS, G.R., KUCKELHAUS, S. A. S. *et al.* (2006) Novel Dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **347**, 739-746.

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.

Palavras chave: Anfíbios ; peptides; *Pseudopaludicola*.