

Prospecção de Peptídeos Antiparasitários a partir da herpetofauna do Delta do Parnaíba para estudos em Doenças Negligenciadas.

Emanuelle Morais Silva (Bolsista PIBIC/CNPq), Leiz Maria Costa Veras Miura (Colaboradora, BIOTEC/UFPI, José Roberto de Souza Almeida Leite, (Orientador, UFPI/CMRV).

INTRODUÇÃO. Devido a uma enorme presença de microorganismos patogênicos que vêm adquirindo resistência a múltiplas drogas causando vários problemas de saúde pública. Nos últimos anos, uma variedade de antibióticos de baixo peso molecular tem sido isolada de diversas espécies animais, a partir da descoberta de novas moléculas, Considerando-se que desempenham um papel na imunidade inata de animais, estudos revelam técnicas de sintetização a partir de glândulas granulares presentes na pele de anuros (rãs, sapos e pererecas), este método tem recebido uma crescente atenção como agentes terapêuticos em potencial (AUSTIN D. J., *et al.*, 1999).

A pele dos anfíbios é um órgão que desempenha papéis importantes para a manutenção fisiológica normal destes organismos. A defesa contra micro-organismos patogênicos é importante porque a pele desses animais é um ambiente favorável para o crescimento de bactérias e fungos (TOLEDO e JARED, 1995). Os peptídeos antimicrobianos isolados a partir da secreção cutânea de anfíbios possuem uma grande variedade em estrutura primária. Muitas vezes estes peptídeos antimicrobianos adotam esta estrutura em ambientes hidrofóbicos que facilita a sua interação e inserção dentro membranas aniônicas principalmente de bactérias Gran-positivas e Gran-negativas (COLON *et al.* 2009).

A espécie-alvo do presente estudo, *Hypsiboas raniceps* (CARDOSO, A. *et AL.*, 1992) é um hylídeo que pertence ao grupo *H. albopunctata*, sendo a espécie do grupo com maior distribuição geográfica. A biodiversidade local favorece uma gama de interesses no estudo desses animais. Estes então podem ser utilizados para o tratamento de doenças negligenciadas existentes na própria região. As doenças negligenciadas se tratam de um grande problema de saúde pública, pois afetam milhares de pessoas ao redor do mundo, que na maioria não dispõem de tratamentos eficazes ou adequados.

Esse projeto tem como objetivo principal a purificação, caracterização e determinação de atividade antiparasitária de peptídeos bioativos isolados a partir da secreção cutânea do hylídeo *Hypsiboas raniceps* coletado na região da Área de Proteção Ambiental do Delta do Parnaíba. Também realizou-se teste hemolítico para analisar a toxicidade do peptídeo contra essas células.

METODOLOGIA. O estudo de campo foi realizado dentro da região do Delta do Parnaíba nos municípios de Parnaíba/PI e Ilha Grande/PI nas áreas alagadiças e campos úmidos da região. O programa utilizado no mapeamento foi o GPS track maker, que possui uma interface com o GPS para o georreferenciamento. Para a purificação dos peptídeos inicialmente foi realizada a extração dos peptídeos por meio de estimulação elétrica da região glandular do animal. O

extrato total foi filtrado e liofilizado. O material foi purificado em sistema HPLC.

O grau de pureza e a massa molecular exata foram determinados por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF. Os peptídeos sintetizados quimicamente identificados e caracterizados a partir da secreção cutânea dos anfíbios foram purificados em várias etapas utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência. O ensaio hemolítico foi realizado com hemácias de um doador O⁻ e analisado no leitor de microcubetas em uma microplaca de diluição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO. Além da revisão bibliográfica, onde pode-se obter um georeferenciamento das espécies de anfíbios com potenciais para a prospecção de moléculas bioativas, foram realizadas coletas de material biológico, extração do veneno e armazenamento liofilizado da secreção. Os dados sugerem que a secreção cutânea de *H. raniceps* é rica em peptídeos bioativos. A partir da purificação por meio de sistema de HPLC foram obtidas 24 corridas apresentando frações com graus de pureza distinto, após a determinação do grau de pureza e a massa molecular exata por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF, chegou-se a conclusão que a fração correlativa ao pico 4, indicado pela seta, apresentava-se com grau de pureza em torno de 99,5% (figura 1).

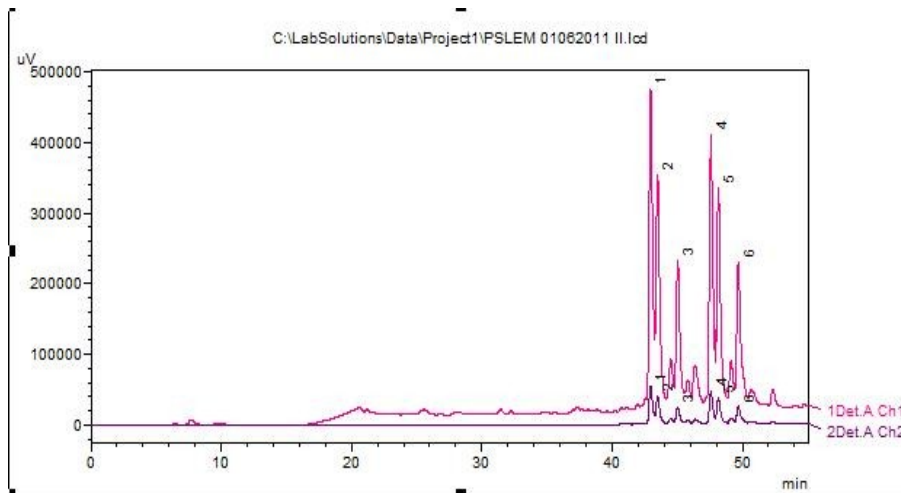
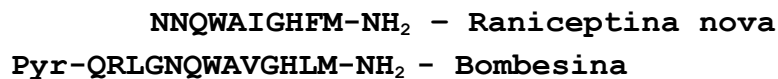


Figura 1. Purificação em sistema HPLC fase-reversa coluna C18 semi-preparativa dos peptídeos bioativos a partir do extrato total da secreção cutânea de *Hypsiboas raniceps*.

O peptídeo obtido a partir desta fração possui massa molecular experimental equivalente a 1216.55 daltons e cuja sequência de aminoácidos determinada foi NNQWAIGHFM-NH₂ e a este foi um registro cujo codinome se da a PSLEM 11006. Ao se fazer o alinhamento desta sequência em um programa específico (BLAST), pode se observa que este possuía homologia a outro peptídeo já devidamente identificado, a bombesina. O peptídeo não apresentou atividade hemolítica

A análise realizada nos leva a entender que essa homologia é de grande relevância para nosso estudo, sendo que a bombesina é um peptídeo já amplamente caracterizado. Este também se trata de um peptídeo que, originalmente foi purificada a partir da pele de anfíbios (ANASTASI et al., 1971).

Sua estrutura possui a fórmula molecular C₇₁H₁₁₀N₂₄O₁₈S, é um peptídeo pequeno com 14 resíduos aminoácidos, apresentando a seguinte seqüência: Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂, onde sete destes são os mesmos encontrados no peptídeo isolado da *H. raniceps*:



CONCLUSÃO. O desenvolvimento deste trabalho é de fundamental importância, pois possibilita a prospecção de moléculas naturais farmacologicamente ativas isoladas da biodiversidade brasileira. A utilização destas substancias contra patologias negligenciadas, principalmente de contexto regional, possibilitará futuros avanços e aplicações na medicina humana. . As análises com células do agente etiológicas causador da leishmaniose e atividade em musculatura lisa serão realizados posteriormente, mas já sabemos que houve atividade hemolítica reduzida, ou seja, baixa citotoxicidade, condição importante para uso fármaco em diversas formulações. **APOIO.** CNPq (pela bolsa concedida através do programa PIBIC), Rede Nanobiomed Capes/Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTASIA A.; ERSPAMER V.; BUCCI M. **Isolation and structure of bombesin and alytensin, two analogous peptides from the skin of European amphibians Bombina orientalis and Alytes obstetricans**. *Experientia*. 27: 166-167, 1971.

AUSTIN, D. J., KRISTINSSON, K.G. e ANDERSON, R. M. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96:1152-1156, 1999.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. **Cutaneous granular glands and amphibian venoms**. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 111 (1), p. 1-29, 1995.

CARDOSO, A. J. & HADDAD, C. F. B. **Diversidade e turno de vocalizações de anuros em comunidade neotropical**. *Acta zool. lilloana, Tucumán*, 41:93-105, 1992.

COLON, J. M., IWAMURO, S., KING, J. D., ANN, N. Y. **Dermal cytolytic peptides and the system of innate immunity in anurans**, *Acad Sci.* v. 1163, p. 75-82, 2009.