

PROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIPARASITÁRIOS A PARTIR DA HERPETOFAUNA DO DELTA DO PARNAÍBA PARA ESTUDOS EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS.

Suellen Sousa Lustosa (Bolsista PIBIC/CNPq), Leiz Maria Costa Veras Miura (Colaboradora, BIOTEC/UFP), José Roberto de Souza Almeida Leite, (Orientador, UFPI/CMRV).

INTRODUÇÃO. Herpetofauna é a totalidade de espécies de répteis e anfíbios existentes em uma região. A herpetofauna brasileira apresenta uma das maiores riquezas do mundo, com aproximadamente 750 espécies de anfíbios e 650 espécies de répteis. Dentre os vertebrados produtores de princípios ativos de grande interesse mundial destaca-se os anfíbios da ordem Anura, que representam um verdadeiro laboratório de bioquímica, tendo em vista o arsenal de toxinas que fabricam. Entre estas, os peptídeos têm despertado bastante interesse devido às suas atividades como mediadores farmacológicos e à descoberta de moléculas homólogas ou análogas em tecidos do trato gastrointestinal e sistema nervoso de mamíferos. (Erspamer, V. e Melchiorri, P., 1980).

A Área de Proteção Ambiental (APA) do Delta do Parnaíba, abrange áreas do Maranhão, Piauí e Ceará e tem como principal porta de entrada no Piauí, a cidade de Parnaíba. O Delta constitui um complexo mosaico de ecossistemas e, desta forma, um verdadeiro laboratório a céu aberto o que torna essa região particularmente interessante para estudos que enfoquem a diversidade e distribuição das espécies em relação às características ambientais, bem como, permite-nos explorar seu potencial para a Biotecnologia.

Hypsiboas raniceps é um hylídeo do grupo *H. albopunctata*, cuja espécie pertence ao grupo com maior distribuição geográfica. Esta espécie pode ser encontrada em florestas secas tropicais, subtropicais ou tropicais de baixa altitude, rios, pântanos, lagos de água doce, áreas urbanas e florestas secundárias altamente degradadas. (FROST, 1985) O projeto objetiva-se a extração, purificação e o seqüenciamento do peptídeo encontrado na secreção cutânea do anfíbio *Hypsiboas raniceps* e, posterior investigação farmacológica dessas moléculas biologicamente ativas.

METODOLOGIA. Espécimes adultos e machos foram coletados na APA do Delta do Parnaíba. Os animais foram previamente lavados com água Milli-Q e a secreção cutânea foi obtida por estimulação elétrica. Posteriormente, a amostra foi filtrada, liofilizada em concentrador e conservada em freezer a -20°C. Uma vez secas, as amostras foram enviadas à Brasília-DF (EMBRAPA), para que o peptídeo fosse sintetizado e analisado por espectrometria de massa MALDI-TOF TOF. Os extratos do veneno dos anfíbios foram estocados a -20°C no banco de venenos e secreções.

As frações bioativas foram purificadas em várias etapas utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A coluna utilizada foi Vydac C18 RP analítica de fase reversa e a pré-coluna foi G0DS4 (Shimpack). Foram dissolvidas 3mg do peptídeo em 200µL de água Milli-Q. Desta diluição, cerca de 100µL foram injetados para que se pudesse dar início à corrida. A eluição realizou-se com fluxo de 1mL/min, onde o eluente utilizado foi a acetonitrila

com 0,1% de TFA (ácido trifluoroacético). As frações eluídas foram coletadas manualmente a partir de um monitoramento simultâneo a 216 e 280 nm respectivamente, secadas a vácuo e armazenadas a – 20°C no banco de venenos e secreções.

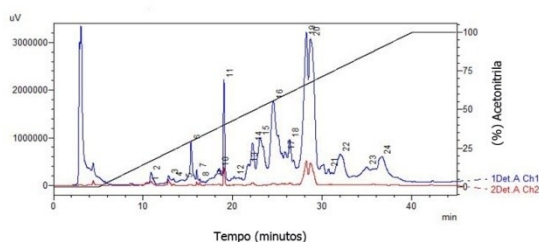
Para os testes bacterianos foram utilizadas duas cepas: *S. aureus* e *E. coli*. Foram utilizadas microplacas de diluição e a suspensão bacteriana foi diluída em MHB 1:50. O antibiótico testado foi a amoxicilina na concentração de 125 mg/ml.

Primeiramente, o peptídeo foi diluído em 600µl de caldo MHB para que pudesse fazer a diluição na microplaca. Foram realizadas diluições seriadas de 1:2 até 1:256. A microplaca de diluição possuía oito linhas (A a H) e doze colunas (1 a 12). Nas colunas 1 e 5 foram colocadas somente bactérias puras (*S. aureus* e *E. coli*), respectivamente. Já nas colunas 2, 3, 4 e 6, 7, 8 foram colocados os testes para as duas cepas, caldo MHB e peptídeo. O antibiótico foi colocado juntamente com *S. aureus* na coluna 9 e com *E. coli* na 10. As colunas 11 e 12 representavam o controle negativo e continham apenas caldo MHB. As diluições foram feitas de modo que ao término do experimento um volume total de 100µl ficasse em cada poço da placa.

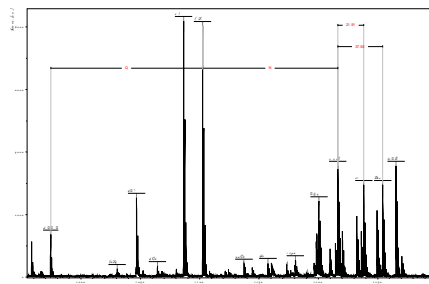
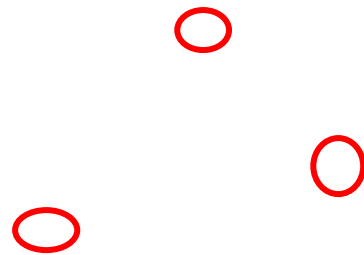
Após este procedimento, a microplaca foi incubada por 24 horas a 37°C e, em seguida foi analisada a 650nm em um leitor de microplacas. O MIC foi definido como a menor concentração de peptídeo em que houve inibição do agente microbiano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO. Através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi possível isolar 765,72µg deste peptídeo. Após o armazenamento do material, cerca de 3 mg do extrato total foi purificado em sistema de CLAE em várias etapas, totalizando cerca de 20 corridas. Os dados sugeriram que a secreção cutânea de *H. raniceps* é rica em peptídeos bioativos comparados a outras espécies de anuros. A partir da purificação foram obtidas 24 frações com graus de pureza distintos. A fração correlativa ao pico 11 apresentava-se com grau de pureza em torno de 99,5%, sendo esta enviada ao laboratório de parceria onde foi feita a identificação por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF TOF (**figura 1**).

Após síntese do peptídeo resultante da secreção cutânea de *H. raniceps*, este recebeu nome de PSLEM 11/006 e teve sua massa molecular confirmada por espectrometria de massa ($[M+H]^+ = 1216.55$ Da), apresentando a seguinte seqüência de aminoácidos: H-NNQWAIGHFM-NH₂. Foi encontrado uma quantidade significativa de dois produtos secundários, um, com uma deleção de uma asparagina e outro, com uma deleção de uma asparagina e de uma glutamina, com massas moleculares de 1102.4 e de 974.3, respectivamente (**figura 1**).



(1)



(2)

Figura 1. (1) Purificação em sistema HPLC dos peptídeos bioativos a partir do extrato total da secreção cutânea de *Hypsiboas raniceps*. **(2)** . Análise do produto bruto, com destaque para o produto esparado ($m/z= 1216.4$), também os produtos secundários com deleção de um resíduo de asparagina ($m/z= 1102.4$) e com deleção de um resíduo de asparagina e um resíduo de glutamina ($m/z= 974.3$). Estes dados confirmam a pureza e o peso molecular de PSLEM.

Ao se fazer a análise do peptídeo onde alinhou a sequência dos aminoácidos em um programa específico (BLAST), pode-se observar que este possuía homologia a outro peptídeo já devidamente identificado, a bombesina.

Foi testado *in vitro* atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* e observou-se o seguinte. PSLEM, não foi efetivo quanto à inibição do crescimento bacteriano e, mesmo havendo uma variação quanto a este desenvolvimento dos microrganismos, o menor crescimento bacteriano foi significativo quando comparado com o controle positivo das respectivas cepas. Pode-se constatar, que em algumas concentrações o peptídeo tornou-se meio propício para as bactérias, resultando, nas maiores taxas de crescimento.

CONCLUSÃO. O grande interesse do projeto é, na realidade tentar investigar a função farmacológica de PSLEM contra parasitas do gênero *Leishmania*. Ou seja, nesta próxima etapa serão realizados testes contra formas amastigotas e promastigotas, no entanto, experimentos

adicionais como o antibacteriano foi desenvolvido e, embora não tendo havido atividade antibacteriana para as espécies testadas, tem-se perspectiva que o peptídeo tenha alguma atividade como antiparasitário. Testes em musculatura lisa também serão realizados, já que a bombesina se trata de um peptídeo análogo a gastrina (inibidor do comportamento alimentar) para verificar se o peptídeo extraído de *H. raniceps* possui função semelhante. **APOIO.** CNPq (pela bolsa concedida através do programa PIBIC).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIOTEC. Piauí 2010. Disponível em <<http://www.biotec.org.br/>>. Acesso em: 08 ago. 2011.

ERSPAMER, V. e MELCHIORRI, P(1980). Trends in Pharmacological Sciences. 1(2): 391-395.

FROST, D. R. **Amphibian species of the world. A taxonomic and geographical reference.** Lawrence, Allen 732p,1985.

Palavras-chave: *H. raniceps*; peptídeos bioativos; bombesina.