



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**BEATRIZ BLENDIA PINHEIRO DE SOUZA**

**PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO ANURO *Hypsiboas boans***

**MANAUS**

**2015**

**BEATRIZ BLEND A PINHEIRO DE SOUZA**

**PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO ANURO *Hypsiboas boans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientador: Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Túlio de Orleans Gadelha Costa**

**MANAUS**

**2015**

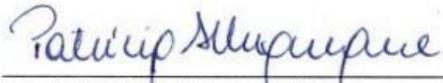
**BEATRIZ BLENDA PINHEIRO DE SOUZA**

**PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO ANURO *Hypsiboas boans***

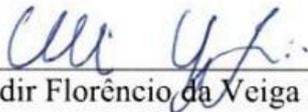
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação 28/01/15

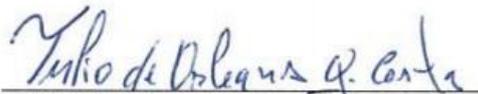
Banca Examinadora:



Patrícia Melchionna Albuquerque  
Universidade do Estado do Amazonas



Valdir Florêncio da Veiga Junior  
Universidade Federal do Amazonas



Túlio de Orleans Gadelha Costa  
Universidade Federal do Amazonas

**MANAUS**

**2015**

*Àqueles que se importam comigo!  
...e àqueles com os quais me importo!*

“Ninguém comete erro maior do que não fazer NADA porque só pode fazer UM POUCO”.

Edmund Burke

## AGRADECIMENTOS

Àquele que é luz no meu caminho, que é o próprio Caminho em mim, e que me conduz na Graça que me fez LIVRE e no AMOR que me fez prisioneira tão somente desse sentir. A Ele que em tudo tem me sustentado e que me fez entender que tanto a tempestade, quanto o dia ensolarado são necessários, os quais, no tempo certo, dão lugar um ao outro. A Ele que não cabe em conceitos humanos, mas que é chamado de Deus! A Ele que para mim é Pai, e que não precisa de mais definições. Obrigada pelo aprendizado da vida!

À minha família, que mesmo sem entender bem o que faço, compreendeu minha ausência, sabendo que é apenas consequência das escolhas que foram diferentes, inusitadas e necessárias no curso de minha vida. A cada um de vocês que me ama: meus pais (Nonato e Sebastiana), minhas irmãs (Taci, Glícia e Glenda), meu irmão (Lúcio) e minhas três princesas, Glívia, Gabi e Isadora. Obrigada por se orgulharem de mim e por torcerem por mim. Amo tanto vocês...

Aos meus orientadores Cleiton e Túlio, pela oportunidade que me deram para realizar este trabalho que é fruto das minhas vontades. Obrigada, Cleiton, por não ter me imposto tua vontade quando nesse “mundo acadêmico-científico” o pós-graduando tem sempre que fazer as pesquisas de seus orientadores e não aquilo para que tem ‘vocações’ ou ‘desejos’. Obrigada, Túlio, pela orientação e pela amizade construída ao longo destes dois anos. Obrigada por todos os esforços para me permitir fazer esta pesquisa, por ter me enviado à Brasília quando eu não queria. Por ter dado tanta força e me ajudado a superar os medos e as muitas insatisfações. Obrigada por ter ouvido de forma sábia todas as minhas reclamações, pelas desculpas pedidas e pelas desculpas dadas a mim, consolidando de forma tão sadia essa relação que não foi e nem será somente de orientador/orientada, mas de amizade. Obrigada aos dois pelo somatório de aprendizado que me propuseram nesse período!

Aos amigos do Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa CENARGEN. Ao Zé (que se tornou irmão), muito obrigada por todos os auxílios, por me ensinar a sequenciar os peptídeos por espectrometria de massa e por tantas outras coisas que me ensinou. Sobretudo, obrigada pela fiel amizade, pelas descontrações nos momentos difíceis, pelas músicas (ainda que sertanejas) que nos fizeram rir e gastar nosso tempo de forma tão boa. Obrigada por tudo que não tem com ser citado aqui nesse espaço. Ao Marcelo Ramada, pela amizade, pelos ensinamentos e pelas “histórias” inventadas a meu respeito que nos

fizeram sempre rir, tornando o ambiente do LEM um ambiente de um ótimo humor. Ao Eder, também pela amizade e por todos os auxílios nos experimentos que eu nunca havia feito. Pelas inúmeras dúvidas esclarecidas, ensinamentos e disposição sempre em ajudar. Muito obrigada! À querida, Mari Nóbrega, por todo carinho dado a mim, pela enorme disposição e atenção às minhas necessidades. Ao Felipe, nosso Chefe! Que faz o melhor churrasco e pasta de alho que já comi. À Maura e ao Bloch, que mesmo sem me conhecerem, abriram as portas do LEM para mim recebendo-me tão bem. Obrigada pelo cuidado e carinho, pelo ambiente agradável que vocês proporcionam. Obrigada por fazerem do LEM, um ambiente de pesquisa, onde os pesquisadores se reconhecem como humanos e não se ‘endeusam’ por causa de título nem agem como ‘diabos’ também por causa de títulos (coisas tão comuns a estes ambientes acadêmico-científicos). Muito obrigada por todo conhecimento gratuito, que me ensinaram de fato a fazer Ciência. E obrigada por deixarem as portas abertas para eu voltar fazendo o Doutorado.

Ao pessoal do Laboratório de Nanotecnologia: Giselle pela relação construída, pela cama cedida quando precisei ficar até tarde na Embrapa, por todo carinho. A Luciane por toda simplicidade e carinho, por nossas conversas tão boas e por toda torcida por mim. E ao Luciano, por todo auxílio prestado, pelas mais bobas dúvidas esclarecidas e pela preocupação também por mim.

Aos demais colegas que conheci nesse ambiente da Embrapa e que fizeram dos meus dias em Brasília dias de alegrias, Carol, Sol, Juliana, Sinara, Samuel, Raquel e Paula. Obrigada pela torcida e pelo carinho.

À família que me adotou, um eterno agradecimento. Obrigada Sergio e Leo por me receberem como filha, por me darem todo conforto e amor, pelo cuidado, pelo interesse no meu trabalho, por todos os esforços feitos para o meu bem estar aí. Muito obrigada pela fiel amizade. Obrigada aos filhos que me receberam também como irmã, Annelise, Augusto, Andressa e Anderson. Muito obrigada por terem me incluído e me proporcionado um ambiente tão agradável com vocês.

Aos meus amigos Cristiano, Anne e Paula. Vocês foram tão fundamentais na minha vida aí que não há nada que eu faça que retribua na mesma proporção tudo que fizeram por mim. Muito obrigada pela amizade e cuidado.

Aos meus amigos de Manaus que mantiveram contato comigo, me deram força, torceram por mim, se dispuseram a conversar quando eu precisava desabafar, que ajudaram das mais distintas formas, em especial a Ana, Gislene, Luana, Vanessa, Julio Nino e Otto. Muito obrigada!

Aos amigos que me acompanharam nos aventureiros e “perigosos” campos: Sebastião, Richardson, Maseo, Dani, Guilherme e Kleyner. Um agradecimento especial ao Sebastião, sem o qual jamais entraríamos na mata, pois de certo nos perderíamos e morreríamos pelo despreparo e falta de conhecimento. E ao Túlio por dar todos os subsídios para a realização de todas as coletas. Muito obrigada!

À professora Cláudia da EST (UEA) e ao professor Carlos Cleomir do INPA, por disporem o liofilizador dos Laboratórios dos quais são responsáveis, para secar minhas amostras.

À Universidade do Estado do Amazonas pela oportunidade dada para eu fazer esse mestrado.

À FAPEAM pelo financiamento dado para realização desta pesquisa.

À EMBRAPA-CENARGEN pela disponibilização dos laboratórios de Espectrometria de Massa para realização desta pesquisa.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para esta pesquisa.

## RESUMO

Os anfíbios compõem uma grande parte da biodiversidade mundial de animais. A ordem Anura se destaca dentre os anfíbios por sua diversidade em vários lugares do mundo. O sistema imune de anuros baseado na expressão, produção, acúmulo e liberação de secreções contendo substâncias biologicamente ativas é uma das principais estratégias de defesa desenvolvida ao curso da evolução em resposta às pressões bióticas e abióticas dos ambientes nos quais estes animais habitam. Os peptídeos bioativos liberados pelas glândulas granulares de anuros são alvos de intensas pesquisas que visam conhecer a composição química, os mecanismos de ação e as respectivas atividades biológicas destas moléculas. Diversas moléculas de natureza peptídica têm sido isoladas e caracterizadas a partir de distintas espécies de anuros. Indivíduos das famílias Ranidae e Hylidae são os mais estudados no que se refere ao conhecimento destas moléculas. A espécie *Hypsiboas boans* é um Hílideo, descrito em 1758 por Linnaeus, que até o presente trabalho não teve nenhum estudo relatado sobre suas secreções cutâneas. Conhecer os peptídeos produzidos e secretados por esta espécie constitui o objetivo deste trabalho. Os espécimes foram coletados às margens do Igarapé Tinga, na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, AM. As secreções foram obtidas por estimulação elétrica, liofilizadas, purificadas por RP-HPLC e caracterizadas quanto à estrutura primária dos peptídeos por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF-TOF - MS/MS), sequenciamento *de novo* por degradação de Edman e sequenciamento dos genes codificadores dos peptídeos. O perfil peptídico desta espécie demonstrou uma variedade de peptídeos com potenciais atividades biológicas, dos quais sete peptídeos foram caracterizados.

## ABSTRACT

Amphibians are a large part of the global animals biodiversity. The order Anura stands out among amphibians for its diversity in many places in the world. The anuros immune system based on the expression, production, accumulation and release of secretions containing biologically active substances is a major defense strategie developed through the course of evolution in response to biotic and abiotic pressure of the environments in which those animals live. The bioactive peptides released by granular glands of the anuros are the subjects of intense research in order to discover the chemical composition, the action mechanisms and the biological activities of these molecules . Several peptide molecules have been isolated and characterized from different species of anuros. Animals from the families Ranidae and Hylidae are the most studied regarding to the knowledge about these molecules. The *Hypsiboas boans* species is a Hilídeo, described in 1758 by Linnaeus which until this work had no reported study on their skin secretions. Knowing the peptides produced and secreted by this species is the objective of this paper. The specimens were collected on the banks of “Tinga Igarapé”, inside the “Reserva Florestal Adolpho Ducke”, Manaus, AM. The secretions were obtained by electrical stimulation , freeze dried, purified by RP-HPLC and characterized as the primary structure of the peptides by mass spectrometry (MALDI -TOF- TOF - MS / MS) , sequenced again by Edman degradation and sequencing of the genes whitch encode the peptides . The peptide profile of these species showed a variety of peptides with potential biological activity, among which seven peptides were characterized.

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
BRPs	Peptídeos Relacionados à Bradicinina
CCK	Colecistoquina
cDNA	Ácido Desoxiribonucleico complementar
CL	Cardiolipina
CRH	Hormônio Liberador de Corticotropina
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EM	Esfingomielina
FC	Fosfatidilcolina
FE	Fosfatidiletanolamina
FG	Fosfatidilglicerol
FS	Fosfatidilserina
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
M + H <sup>+</sup>	Massa + próton
m/z	Massa/carga
MALDI-TOF	Ionização por Dessorção de Laser Assistida por Matriz – Tempo de Vôo
MS	Espectrometria de Massa (Mass Spectrometry)
PAMs	Peptídeos Antimicrobianos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPSQ	Sequenciador Automático de Proteínas e Peptídeos
RAS	Sistema Renina-Angiotensina
RNA	Ácido Ribonucleico
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance - Fase Reversa
SMH	Modelo ‘Shai-Matsuzak-Huang’
TFA	Ácido Trifluoroacético
TRH	Hormônio Liberador de Tireotropina
α-MSH	Hormônio α-Melanotrófico

## LISTA DE TABELAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 – Taquicininas isoladas de anfíbios.....	25
Tabela 2 – Exemplos de Peptídeos Relacionados às Bradicininas (BRPs) isolados de anfíbios.....	26
Tabela 3 – Exemplos de Ceruleínas isolados de anfíbios.....	27
Tabela 4 – Exemplos de Dermorfina ( $\mu$ -seletiva) isoladas de anfíbios.....	29
Tabela 5 – Exemplos de Deltorfina ( $\delta$ -seletivas) isoladas de anfíbios.....	29
Tabela 6 – Exemplos de algumas classes de Peptídeos Antimicrobianos (AMPs)..	36

### CAPÍTULO I

Tabela 1- Propriedades físico-químicas para predição da estrutura secundária.....	63
---	----

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1 - Ordens de anfíbios.....	17
Figura 2 - Mapa de declínio global de anfíbios.....	18
Figura 3 - Corte vertical da pele de um sapo.....	19
Figura 4 - Representação esquemática da glândula granular de anuros.....	20
Figura 5 - Formação de uma ligação peptídica por condensação.....	21
Figura 6 – Ilustração da síntese de peptídeos das secreções de anuros.....	22
Figura 7 - Modelo Barrel-Stage.....	35
Figura 8 - Modelo Carpet-Like.....	36
Figura 9 - Modelo Shai-Matsuzak-Huang (SMH).....	37
Figura 10 - <i>Hypsiboas boans</i> .....	39

### CAPÍTULO I

Figura 1- Cromatograma do perfil peptídico da secreção de <i>H.boans</i> .....	58
Figura 2 - Espectro de Massa do peptídeo Hb07b.....	58
Figura 3 - Espectro de Massa do peptídeo Hb14.....	59
Figura 4 - Espectro de Massa do peptídeo Hb15.....	59
Figura 5 - Espectro de Massa do peptídeo Hb17.....	60
Figura 6 - Espectro de Massa do peptídeo Hb20.....	60
Figura 7 - Espectro de Massa do peptídeo Hb21.....	61
Figura 8- Identificação de cDNA de Hb21 e alinhamento da estrutura primária do peptídeo com filoseptinas.....	62
Figura 9 - Predição da estrutura secundária.....	63

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Anfíbios: Características Gerais.....	17
2.2 A Pele dos Anfíbios.....	19
2.3 Peptídeos Biologicamente Ativos em Anuros.....	21
2.3.1 <i>Peptídeos Neuroativos</i> .....	24
2.3.1.1 Taquicininas.....	24
2.3.1.2 Peptídeos Relacionados à Bradicicina (BRPs).....	25
2.3.1.3 Celureínas.....	26
2.3.1.4 Bombesinas.....	27
2.3.1.5 Tryptofilinas.....	28
2.3.1.6 Peptídeos opióides.....	28
2.3.1.7 Xenopsina.....	29
2.3.1.8 Hormônio Liberador de Tireotropina (TRH).....	30
2.3.1.9 Crinia – Angiotensina II.....	30
2.3.1.10 Prokineticinas.....	31
2.3.1.11 Sauvageínas.....	31
2.3.1.12 Peptídeos contendo dissulfeto.....	31
2.3.2 <i>Peptídeos Antimicrobianos (AMPs)</i> .....	32
2.3.2.1 Mecanismo de ação membranolítica.....	33
2.3.2.1.1 Modelo de “Barrel-Stave”.....	34
2.3.2.1.2 Modelo “Carpet-Like”.....	35
2.3.2.1.3 Modelo Shai-Matsuzak-Huang (SMH).....	36
2.3.2.1.4 Modelo “detergent-like”.....	37
2.4 A Espécie <i>Hypsiboas boans</i> .....	38
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo Geral.....	41
3.2 Objetivos Específicos.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO I.....	53
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>

<b>2.1 Coleta dos Anfíbios e Extração da Secreção Cutânea.....</b>	<b>55</b>
<b>2.2 Purificação dos Peptídeos.....</b>	<b>56</b>
<b>2.3 Sequenciamento e Determinação da Massa Molecular Monoisotópica dos Peptídeos.....</b>	<b>56</b>
<b>2.4 Construção da biblioteca de cDNA a partir do tecido cutâneo de <i>H. boans</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>2.5 Análise e alinhamento das sequências nucleotídicas e peptídicas.....</b>	<b>57</b>
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1 Purificação e elucidação da estrutura primária dos peptídeos.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2 Análise e alinhamento das sequências nucleotídicas e peptídicas.....</b>	<b>61</b>
<b>3.3 Propriedades físico-químicas dos peptídeos.....</b>	<b>63</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios fazem parte do imaginário popular desde tempos remotos. Os mitos e lendas contribuem, inclusive, para a aversão de muitas pessoas em relação a estes animais. Tal fato é em parte atribuído às explicações dadas por povos primitivos a determinados fenômenos naturais, relacionando-os muitas vezes ao fogo, à água, ao sol, à lua, à vida e à morte, ou a animais, que eram considerados como entidades ou símbolos divinos, fosse por respeito, medo ou fascínio (DORNELLES, MARQUES, RENNER, 2010).

Em relatos bíblicos, por exemplo, verifica-se a associação destes animais ao sórdido e pecaminoso, quando nas determinações das regras de animais puros e impuros, as salamandras foram denominadas impuras por se rastejarem sobre a terra, e as rãs foram, dentre outros animais, utilizadas como pragas, onde milhares de rãs invadiram o Egito, poluindo a terra até serem mortas (BÍBLIA DE JERUSALÉM, 1985). Mas se por um lado os anfíbios, principalmente os anuros, causam estes tipos de sentimentos, por outro, eles são alvos de admiração e estudos, trazendo diversas contribuições à biologia animal, aos estudos quanto ao potencial químico/farmacológico dos constituintes de suas secreções cutâneas, a estudos de impactos ambientais, como indicadores biológicos, entre outras.

O modo de vida dos anuros, dividido entre o ambiente aquático e o terrestre em pelo menos uma das fases do desenvolvimento, culminou no aparecimento ao longo da evolução de diversas modificações fisiológicas, morfológicas e comportamentais, que permitiram e ainda permitem a sobrevivência deste grupo em distintos habitats, alguns, demasiadamente hostis. Aposematismo, camuflagem, mimetismo, tanatose e liberação de secreções tóxicas na pele (ou não tóxicas, mas com sabores que causam aversão) são mecanismos utilizados pelos anuros na luta pela sobrevivência nos ambientes em que estão inseridos (DUELLMAN & TRUEB 1986).

O surgimento de um sistema imune baseado na expressão, produção, acúmulo e secreção de moléculas bioativas por glândulas granulares localizadas na pele e na parte superior da cabeça dos anuros, é uma das principais características do grupo. As secreções dos anuros são dotadas de diversas substâncias biologicamente ativas, as quais têm sido alvos de muitas pesquisas que visam conhecer sua composição e ação biológica. Dentre as substâncias secretadas, podem ser encontradas: amins biogênicas, esteróides, alcalóides, peptídeos, proteínas e glicoproteínas, todas com potenciais atividades biológicas (ERSPAMER & MELCHIORRI, 1973; 1980; TOLEDO & JARED, 1995; MANDEL, 2008). Apesar desta

variedade de substâncias que podem ser encontradas nas secreções cutâneas de anuros, a maior parte dos constituintes de suas secreções é de natureza peptídica.

Os peptídeos bioativos das secreções de anuros atuam como primeira barreira contra a invasão de microrganismos patogênicos e complementam o sistema imune adaptativo, o qual é mediado por células de alta especificidade, atuando como um sistema secundário de defesa de ação rápida (MANDEL, 2008).

Há décadas os peptídeos bioativos das secreções de anuros estão sendo estudados e têm sido considerados como um dos principais fatores de sucesso evolutivo desse grupo em decorrência das inúmeras atividades biológicas por eles exercidas, tais como: atividades contra fungos patogênicos, bactérias gram-positivas e gram-negativas, atividade anti-tumoral, hemolítica, analgésica, entre outras (MOR et al., 1991; BOMAN, 1991; BATISTA, 1999; ABDEL-WAHAB et al., 2008; HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008).

Os anuros são, portanto, considerados uma fonte rica de peptídeos com potencial para servir como modelos para a produção de novos fármacos (PRATES et al., 2004; BRAND et al., 2006).

*Hypsiboas boans* pertence à família Hylidae, que se destaca dentre as outras famílias pela quantidade e diversidade de moléculas presentes nas suas secreções, principalmente pela presença de peptídeos com atividades biológicas (NICOLAS, VANHOYE, AMICHE, 2003). A subfamília Phyllomedusinae, por exemplo, possui peptídeos representantes de muitos destes grupos de moléculas, dentre as quais se destacam as dermaseptinas e as filoseptinas, famílias de peptídeos antimicrobianos que foram encontradas somente nesse grupo de anfíbios (BRAND et al., 2002; LEITE et al., 2005; BRAND et al., 2006). A espécie *Hypsiboas boans*, não teve até o presente momento, nenhum trabalho relatado na literatura com suas secreções.

Portanto, as investidas realizadas nesta pesquisa tiveram como objetivo isolar e caracterizar os peptídeos bioativos produzidos e liberados por *H. boans*. Inicialmente o trabalho apresenta uma revisão teórica sobre as características gerais dos anfíbios com especial atenção aos anuros, em seguida, sobre os estudos realizados com peptídeos de anuros e por fim, uma revisão sobre a espécie *H. boans*. No Capítulo 1, apresentamos uma série de metodologias realizadas a fim de chegarmos aos objetivos propostos, os resultados obtidos a partir do perfil peptídico das secreções de *H. boans*, bem como uma discussão a partir das características de cada peptídeo caracterizado.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Anfíbios: Características Gerais

Os anfíbios são agrupados em três ordens: Anura (sapos, rãs e pererecas), Caudata (salamandras e tritões) e Gymnophiona (cecílias) (Figura 1). Atualmente estima-se que existem 7.350 espécies de anfíbios no mundo, das quais 6.478 espécies correspondem à ordem Anura, 672 à ordem Caudata e 200 espécies à ordem Gymnophiona (AMPHIBAWEB, 2014).

No território Brasileiro existem atualmente 1026 espécies de anfíbios, sendo 988 espécies de Anuros, 33 espécies de Gymnophionas e 5 espécies de Caudatas (SEGALLA et al., 2014).

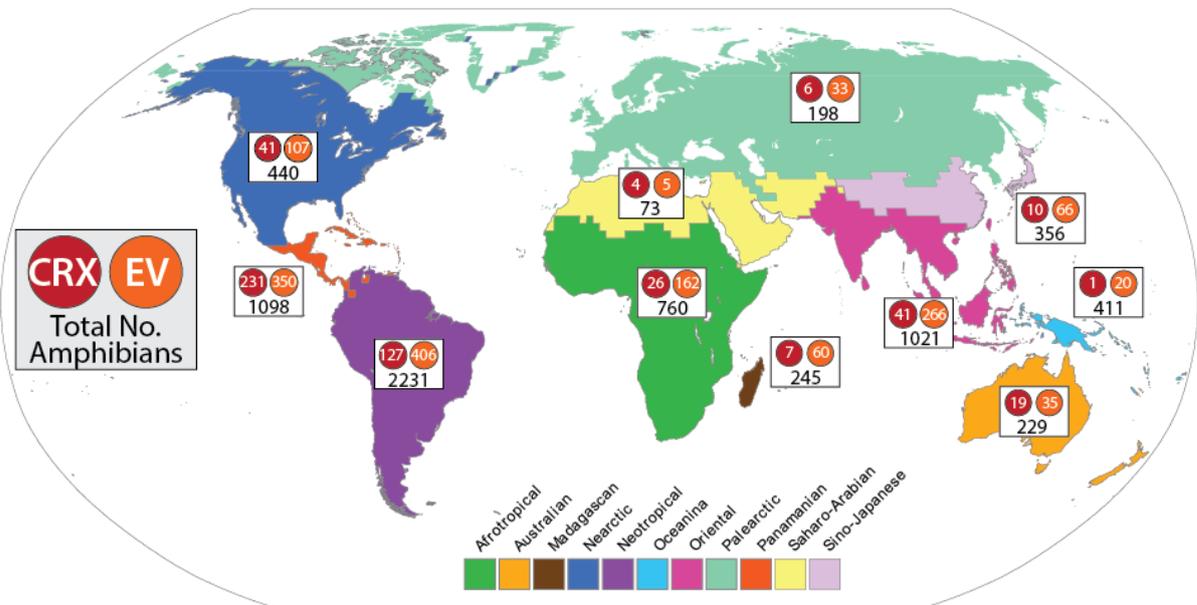
**Figura 1** - Ordens de anfíbios. Da esquerda para a direita respectivamente as ordens, Anura, Caudata e Gymnophiona.



Fonte - AMPHIBIAWEB, 2014.

Amphibia constitui uma das classes mais ameaçadas no planeta, que sofre com a perda ou alteração de seus ambientes causada pelo desmatamento desenfreado, pela erosão, assoreamentos (HECNAR & M'CLOSKEY, 1996), por poluições causadas por uso constante de inseticidas e herbicidas, por resíduos industriais como águas e gases tóxicos (GILLILLAND et al., 2001; HAYES et al, 2002), por chuvas ácidas (BEATTIE et al, 1992), aumento da radiação ultravioleta, entre outros fatores que alteram o hábitat natural destes animais e que têm provocado o declínio de muitas espécies de anfíbios (figura 2).

**Figura 2** - Mapa de declínio global de anfíbios. 1) Em vermelho, número de espécies extintas ou criticamente ameaçadas; 2) Em laranja, número de espécies em vias de extinção ou vulneráveis; 3) Em branco, o número total de espécies por bioma.



**Fonte** - AmphibiaWeb: Wallacean Biome Map of Amphibian Species in Decline. [web application]. 2014. UC Regents, Berkeley, CA. Available:

A sensibilidade dos anfíbios a estes fatores os torna excelentes bioindicadores da qualidade do ambiente, o que é de grande importância em avaliações ecológicas, pois chegam a ser mais sensíveis que os comuns sistemas de monitoramento (BRANDÃO, 2002).

Os anuros correspondem ao maior grupo da classe Amphibia. São popularmente conhecidos como rãs, pererecas, sapos e jias. A grande maioria vive nos trópicos, onde aproximadamente 600 espécies vivem na Amazônia. Por não possuírem escamas nem pelos para proteção, parecem ser frágeis, no entanto, são muito bem adaptados e estão entre os vertebrados mais abundantes e presentes em maior número de habitats (LIMA et al., 2008). A transição destes animais do ambiente aquático para o ambiente terrestre ao longo da evolução culminou no desenvolvimento de várias características morfológicas, fisiológicas e comportamentais que fornecem individualmente ou em conjunto, diversas formas de proteção contra potenciais predadores (DUELLMAN & TRUEB 1986).

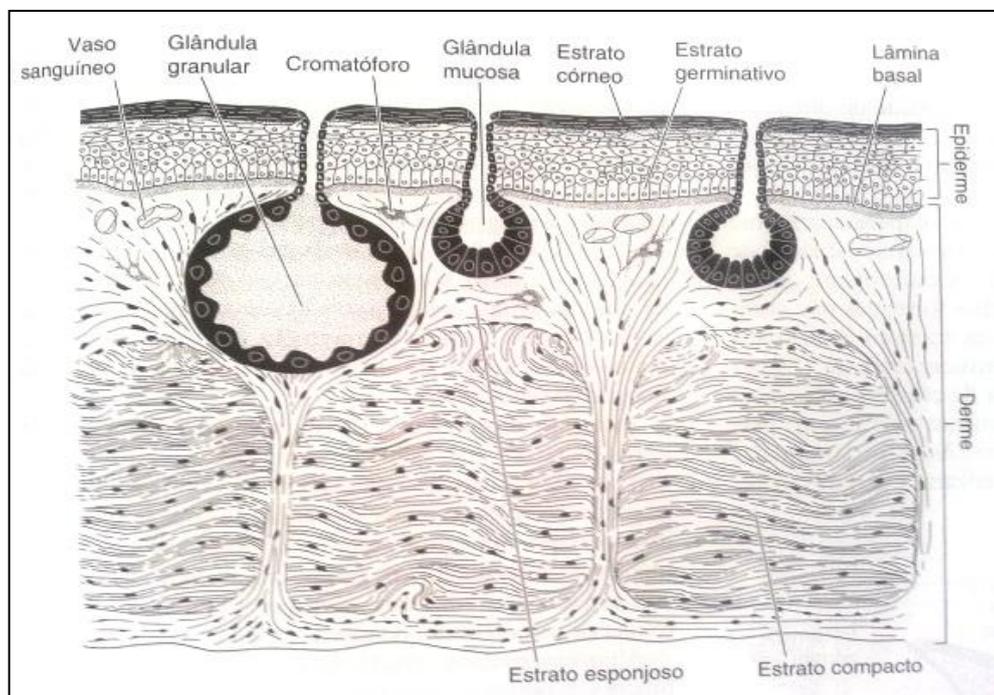
A pele contendo glândulas especializadas na elaboração e secreção de uma complexa mistura química é um dos mecanismos de defesa muito bem desenvolvido por esses animais.

## 2.2 A Pele dos Anfíbios

A pele dos anfíbios é um órgão especializado ao desenvolvimento de diversas funções fisiológicas, como transporte de água e solutos, regulação da temperatura corporal e regulação osmótica, bem como defesa contra predadores e microrganismos (SEBEN et al., 1993).

A ordem Anura possui dois tipos de glândulas, multicelulares e alveolares, as quais têm origem na epiderme e crescimento na derme. Estas glândulas formam dois sistemas distintos, um representado pelas glândulas mucosas, que são menores, encontram-se espalhadas por todo o corpo secretando continuamente e espontaneamente, limpando, lubrificando e umedecendo a pele proporcionando a respiração cutânea. O outro sistema é representado pelas glândulas granulares, as quais estão sob controle do sistema nervoso e hormonal. A secreção das glândulas granulares é um fluido leitoso, com gosto ruim e em alguns casos muito tóxico para os predadores. Nos sapos, as glândulas granulares são agrupadas nas verrugas (Figura 3) (TOLEDO & JARED, 1995; HILDEBRANDE & GOSLOW, 2006).

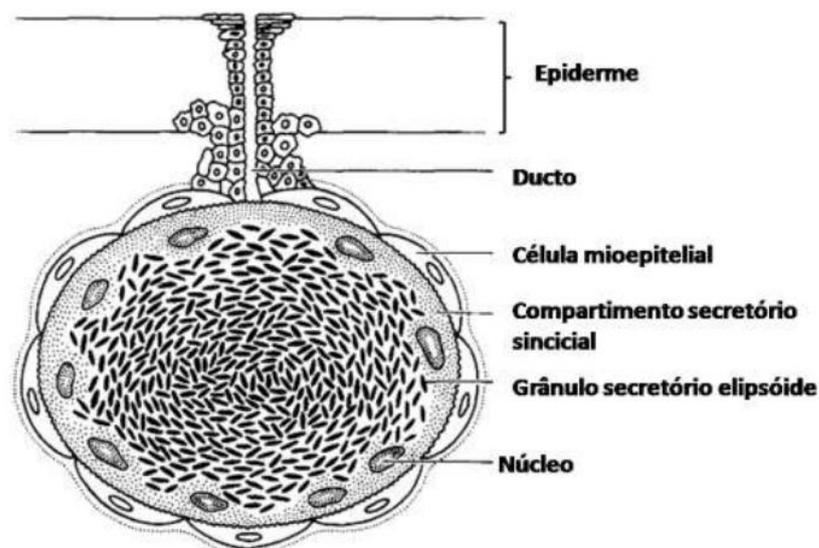
**Figura 3** - Corte vertical da pele de um sapo.



**Fonte:** LIEM et al., 2012.

As glândulas granulares de anfíbios anuros são constituídas por tecido sincicial, onde na região periférica se localizam os núcleos celulares e as macro-organelas. No citoplasma, em forma de grânulos encontram-se vesículas secretoras contendo peptídeos e proteínas e a depender da espécie, esses grânulos podem tomar formas arredondas ou uniformes e são agrupadas em estruturas maiores sendo mais comuns estruturas em formato elipsóide (figura 4). As glândulas granulares situam-se na derme, são recobertas por tecido mioepitelial e abrem se para o meio externo através de ductos epidermiais (DOCKRAY & HOPKINS, 1975; DELFINO et al., 2002; TERRENI et al., 2003; DELFINO et al., 2006).

**Figura 4** - Representação esquemática da glândula granular de anuros. Modificado de Dockray e Hopkins (1975).



**Fonte** – Retirado e modificado de Dockray e Hopkins (1975).

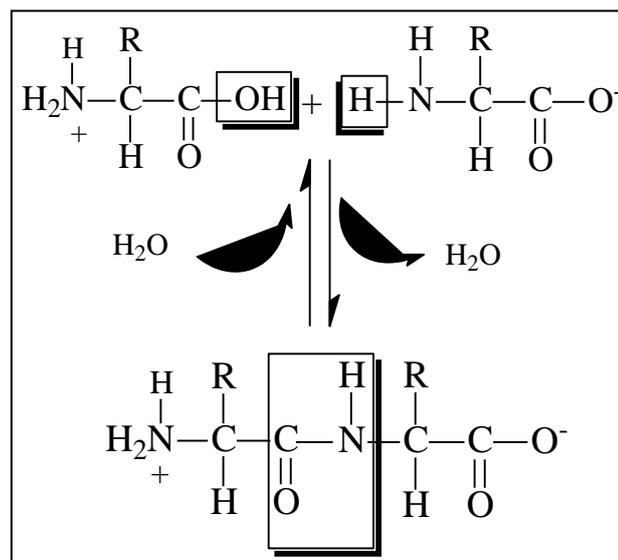
As secreções destas glândulas são fontes de inúmeras moléculas bioativas, das quais, várias apresentam analogia com moléculas encontradas tanto em mamíferos quanto em répteis. A maioria destas moléculas é de natureza peptídica e constituem o sistema inato de defesa que atua como primeira barreira contra a invasão de microrganismos patogênicos e complementa o sistema imune adaptativo, o qual é mediado por células de alta especificidade, atuando como um sistema secundário de defesa de ação rápida (MANDEL, 2008).

Em algumas espécies de anuros são comuns glândulas paratóides que são capazes de estocar grande quantidade de secreção (PRATES & BLOCH JR., 2000).

### 2.3 Peptídeos biologicamente ativos em anuros

Os peptídeos são biomoléculas formadas por aminoácidos ligados através de ligações peptídicas estabelecidas entre um grupo amina de um aminoácido e um grupo carboxila de outro aminoácido (Figura 5). Dependendo do número de resíduos de aminoácidos ligados entre si, pode-se ter um polímero com pequenas moléculas de dois ou três aminoácidos até macromoléculas contendo milhares de aminoácidos, denominadas de proteínas. As proteínas são, portanto, amidas resultantes da reação entre os grupos amina e carboxila dos  $\alpha$ -aminoácidos (NELSON & COX, 2002).

**Figura 5** - Formação de uma ligação peptídica por condensação.



**Fonte:** Retirado e modificado de NELSON & COX, 2002.

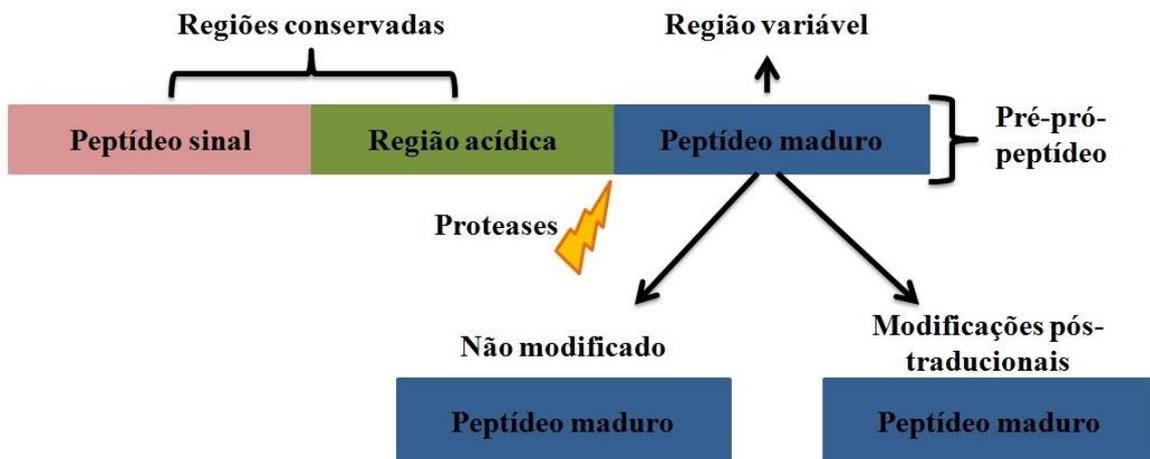
As proteínas constituem um dos principais polímeros essenciais aos processos vitais das células, exercendo funções como: estrutural, catalítica, hormonal, transportadora, reguladora, sinalizadora e imunológica (NELSON & COX, 2002).

Diversos estudos demonstraram que a secreção cutânea dos anuros é fonte rica de peptídeos biologicamente ativos que são derivados e processados a partir de um precursor que contém um padrão de duas regiões conservadas, constituídas por um peptídeo sinal e uma

região acídica, e uma região super variável que constitui o peptídeo maduro (figura 6). A região do peptídeo sinal direciona o peptídeo para o local ideal na glândula e em respostas a estímulos, uma protease remove a região acídica, deixando livre o peptídeo maduro, porém este peptídeo é desativado minutos depois por proteases de modo a evitar a toxicidade para o animal (CHARPENTIER et al., 1998; RINALDI, 2002; PUKALA et al., 2006).

Após a síntese dos peptídeos maduros podem ocorrer modificações pós-traducionais como clivagens enzimáticas, amidação C-terminal, acetilação, sulfonação e enantiomerização de aminoácidos (CONLON et al., 2005a; CONLON et al., 2005b; KÖNIG et al., 2015). As modificações pós-traducionais podem causar alterações nas propriedades primárias dos peptídeos, alterando, portanto, a solubilidade, a estabilidade, as interações com receptores ou com outras proteínas, a localização subcelular, e, pode alterar a rede de transdução de sinal por desfosforilação de determinados aminoácidos (serina, treonina e tirosina). Estas modificações pós-traducionais modulam as atividades biológicas dos peptídeos, contribuindo, assim, para a diversidade biológica (KREIL, 1997).

**Figura 6** – Ilustração da síntese de peptídeos das secreções de anuros.



Esses peptídeos constituem o sistema imune inato dos anuros, sendo, portanto, potencialmente ativos contra uma larga variedade de microrganismos patogênicos. E, não apresenta, na sua maioria, toxicidade em células normais de mamíferos, sugerindo, portanto,

que os peptídeos podem servir de modelos para a produção de novos fármacos (BOMAN, 1991; ZASLOFF, 1992; PRATES et al., 2004; BRAND et al., 2006).

Em decorrência do avanço nos estudos de peptídeos de anuros, vários peptídeos, como peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm sido identificados destes animais, alguns apresentando homologia com os já existentes e outros apresentando pouca ou nenhuma homologia (ROLLINS-SMITH, L. A. & CONLON, J. M. 2005; CONLON et al., 2009; AMICHE et al., 2008; ROLLINS – SMITH, 2009; NICOLAS & AMIRI, 2009;).

Dentre os peptídeos antimicrobianos são destacados na literatura, peptídeos com atividades contra fungos patogênicos, bactérias gram-positivas e gram-negativas (MOR et al., 1991; BOMAN, 1991; BATISTA, 1999; ABDEL-WAHAB, et al., 2008). As Magaininas, que são reconhecidas como um potente antimicrobiano e apresentam atividade antitumoral significativa (HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008; BAKER et al., 1993; CRUCIANE et al., 1991; OHSAKI et al., 1992). Os derivados sintéticos das Magaininas também possuem outras atividades como, antiviral contra herpes tipo I (EGAL et al., 1999); algumas bombininas com atividade hemolítica (MIELE et al., 1998); e as Phylloseptinas, conhecidas por serem bactericidas e por apresentarem atividades anti-protozoário (LEITE et al., 2005).

Os peptídeos também têm despertado bastante interesse devido às suas atividades como neurotransmissores e por serem similares a hormônios presentes nos sistemas gastrintestinal e nervoso de mamíferos. Tanto na pele de anfíbios quanto de mamíferos, incluindo a espécie *Homo sapiens*, são frequentemente encontrados o hormônios bradicinina, o hormônio liberador de tireotropina (TRH), as bombesinas e os peptídeos opióides (ERSPAMER & MELCHIORRI, 1976).

Os peptídeos de anfíbios são agrupados em diferentes classes de acordo com suas funções biológicas e características estruturais. Aqueles com atividades no sistema nervoso são chamados peptídeos neuroativos e são classificados como taquicininas, peptídeos relacionados com bradicininas, ceruleínas, bombesinas, triptofilinas, opióides, e peptídeos diversos abrangendo um conglomerado de peptídeos que ainda não são incluídos em uma classe específica, sendo estes: Xenopsina, Hormônio Liberador de Tireotropina, Crinia – Angiotensina II, Prokineticinas, Sauvagíneos e Peptídeos contendo dissulfeto. As seis classes de peptídeos neuroativos citadas são amplamente encontradas, enquanto os opióides foram isolados apenas em hilídeos da sub-família Phyllomedusinae (KÖNIG et al., 2015). Abaixo uma breve descrição destas classes e de modo geral uma descrição de alguns peptídeos antimicrobianos.

### 2.3.1 Peptídeos Neuroativos

#### 2.3.1.1 Taquicininas

Do grego *takhus* (rápido) e *kinein* (mover), são peptídeos que induzem rapidamente a contração dos músculos lisos intestinais (KÖNIG et al., 2015). Podem causar hipotensão por meio de vasodilatação dos vasos sanguíneos periféricos, onde os receptores NK1 são os alvos e causam a liberação de fatores endógenos de relaxamento. Porém, se receptores NK2 forem estimulados podem aumentar a pressão arterial. Um dos primeiros peptídeos dessa classe a ser isolados foi uma substância com propriedades de reduzir a pressão sanguínea e estimular a região do duodeno em coelhos, isoladas por Von Euler & Gaddum (1931) a partir do extrato alcoólico do cérebro e do intestino de equinos. Esta molécula foi nomeada como Substância P por não possuir nenhuma similaridade com outras com a mesma propriedade (ERSPAMER, 1994). Somente em 1971 este peptídeo foi identificado por Chang e colaboradores.

Além da Substância P, outras taquicininas de mamíferos foram encontradas, como a Neurocinina A (NKA) e Neurocinina B (NKB) (HOLZER-PETSCHE et al., 1987). Estas taquicininas de vertebrados (SP, NKA e NKB) têm sido relatadas como peptídeos que agem como neurotransmissores/neuromoduladores que medeiam a geração, modulação e transmissão da informação nociceptiva dos neurônios primários sensoriais (YANG et al., 2003).

Em 1964, Erspamer observou que o peptídeo Eledoisina isolado das glândulas salivares de *Eledone moschata* 1947, causava redução na pressão sanguínea em coelhos, estimulava a musculatura lisa intestinal e causava salivação abundante em cães e ratos (ERSPAMER, 1994). Posteriormente foi isolado das secreções da pele de *Physalaemus biligonigerus* um undecapeptídeo de estrutura e atividade biológica muito similar a Eledoisina denominado Fisalemina. Nos anos futuros, várias taquicininas de anfíbios foram isoladas (Tabela 1) e acredita-se que em termos de defesa dos anuros, as taquicininas podem aumentar a permeabilidade capilar e assim induzir a salivação, vômitos e diarreias em predadores que ingerem estes animais (ERSPAMER, 1994).

**Tabela 1** – Taquicininas isoladas de anfíbios (ERSPAMER, 1994).

Peptídeo	Estrutura	Espécies
Fisalemina	pGlu-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	<i>Physalaemus biligonigerus</i>
Fisalemina	pGlu-Ala--Asp-Pro-Lys-Thr-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	<i>Uperoleia rugosa</i>
Uperoleina	pGlu-Pro-Asp-Pro-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	<i>Uperoleia rugosa</i>
Hilambatina	Asp-Pro-Pro-Asp-Pro-Asp-Arg-Phe-Tyr-Gly-Met-Met-NH <sub>2</sub>	<i>Hylambates maculata</i>
Ranamargurina	Asp-Asp-Ala-Ser-Asp-Arg-Ala-Lys-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	<i>Rana margaratae</i>
PG-SP I	pGlu-Pro-Asn-Pro-Asp-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	<i>Pseudophryne guntheri</i>
PG-SP II	pGlu-Pro-Asn-Pro-Asn-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	<i>P. guntheri</i>
Kassinina	Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Gln-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	<i>Kassina senegalensis</i>
Kassinina II	Asp-Glu-Pro-Lys-Pro-Asp-Gln-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	<i>Hylambates maculata</i>
Phyllomedusina	pGlu-Asn-Pro-Asn-Arg-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
PG-K I	pGlu-Pro-His-Pro-Asp-Glu-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	<i>Pseudophryne guntheri</i>
PG-K II	pGlu-Pro-Asn-Pro-Asp-Glu-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	<i>P. guntheri</i>
PG-K III	pGlu-Pro-His-Pro-Asn-Glu-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	<i>P. guntheri</i>

### 2.3.1.2 Peptídeos Relacionados à Bradicinina (BRPs)

A Bradicinina é um peptídeo de mamíferos originado da clivagem de precursores (cininogênicos) do sistema Calicreína-Cinina (COUTURE et al., 2001). Constituído por nove resíduos de aminoácidos foi sequenciado e sintetizado em 1990 e conhecido por suas diversas atividades biológicas, tais como, atividade hipotensiva em cães, estimuladora do sistema digestivo em gatos e em útero de ratos (PRATES, 1999).

Os BRPs de anuros apresentam estruturas primárias similares aos encontrados nos mamíferos e assim como as taquicininas, causam relaxamento ou contração da musculatura lisa, embora atuem mais lentamente (COUTURE et al., 2001).

O primeiro BRP encontrado em anuros foi isolado de *Rana temporária* por Anastasi et al (1965) e mais tarde foram isolados vários BRPs da secreção cutânea de anuros de diferentes famílias (LI et al., 2003; BRAND et al., 2006; CHEN et al., 2011; SAMGINA et al., 2011; BARBOSA, 2014).

Estes peptídeos foram testados e apresentaram atividades biológicas características: vasodilatação, hipotensão e contração de músculos lisos não vasculares (CONLON, 1999; CONCEICAO et al., 2007; CHEN et al., 2011). Acredita-se que em anuros os BRPs exercem um papel na proteção contra predadores, onde no estômago, estas moléculas atuam estimulando a mobilidade gástrica e conseqüente regurgitação do animal, levando, portanto, a rejeição por este tipo de presa (CONLON, 1999).

Na tabela 2 alguns exemplos de BRPs de anuros.

**Tabela 2** – Exemplos de Peptídeos Relacionados às Bradicininas (BRPs) isolados de anfíbios (ERSPAMER, 1994).

Peptídeo	Estrutura	Espécies
Bradicinina	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH	<i>Rana temporaria</i>
Filocinina	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Ile-Tyr(HSO <sub>3</sub> )	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>
Bradicinina II	Val-Pro-Pro-Gly-Phe-Thr-Pro-Phe-Arg-OH	<i>Rana nigromaculata</i>
Ranacinina-O	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Gly-Lys-His-OH	<i>Bombina orientalis</i>
Bradicinina III	Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH	<i>Heleophryne purcelli</i>
Ranacinina-R	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Phe-Arg-Ile-Ala-Pro-Glu-Ile-Val-OH	<i>Rana rugosa</i>

### 2.3.1.3 Celureínas

A primeira celureína de anuros foi isolada de *Litoria caerulea* por Anastasi et al (1968). Trata-se de um decapeptídeo que possui estrutura química e atividade biológica semelhante à gastrina e à colecistoquina (CCK), peptídeos presentes em mamíferos (ZETLER,1985). Gastrina e colecistoquina são peptídeos hormonais que atuam na estimulação da secreção de insulina, na motilidade gástrica e como agente ansiolítico no caso de CCK (RANG et al., 2000).

As ceruleínas ligam-se a receptores de CCK envolvidos em vias celulares que promovem pancreatite aguda, vômitos e diarreia, atuam como supressores do apetite (promovendo saciedade) e diminuem a pressão arterial. Além disso, foram investigadas ceruleínas com efeitos antinociceptivos mais potentes que os da morfina, sendo, portanto, clinicamente utilizado como um analgésico (ERSPAMER, 1994).

Atualmente são conhecidas ceruleínas de 46 espécies de anuros de 5 famílias (alguns representados na tabela 3). As ceruleínas foram os peptídeos da pele de anuros a serem completamente sequenciados de *Xenopus laevis* (HOFFMANN et al., 1983).

**Tabela 3** – Exemplos de Ceruleínas isolados de anfíbios (ERSPAMER, 1994).

Peptídeo	Estrutura	Espécies
Ceruleína	pGlu-Gln-Asp-Tyr(HSO <sub>3</sub> )-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	<i>Litoria caerulea</i>
Ceruleína [Asn <sup>2</sup> , Leu <sup>5</sup> ]	pGlu-Asn-Asp-Tyr(HSO <sub>3</sub> )-Leu-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	<i>Bombina orientalis</i>
Ceruleína [Leu <sup>3</sup> ](3-10)	Asp-Tyr(HSO <sub>3</sub> )-Leu-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	<i>Heleophryne purcelli</i>
Ceruleína [Glu(Ome) <sup>2</sup> ]	pGlu-Glu(Ome)-Asp-Tyr(HSO <sub>3</sub> )-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	<i>Rana rugosa</i>
Filoceruleína	pGlu-Glu-Tyr(HSO <sub>3</sub> )-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>

#### 2.3.1.4 Bombesinas

As primeiras bombesinas isoladas de anuros foram a Bombesina (BN) da espécie *Bombina bombina*, Alitensina da espécie *Alytes obstetricans*, (ANASTASI et al., 1971; 1972) e a Ranatensina da espécie *Rana pipiens* (NAKAJIMA et al., 1972). A partir destas, várias bombesinas foram encontradas em diferentes espécies de anuros, principalmente das famílias Hilidae, Ranidae e Myobatrachidae, como: litorina e litorina [Glu(OMe)<sup>2</sup>] de *Litoria aurea*; litorina [Glu(OEt)<sup>2</sup>] de *Uperoleia rugosa*; ranatensina R de *Rana rugosa*; rodei-litorina de *Phyllomedusa rohdei*; PG-litorina de *Pseudophryne güntheri*; (ERSPAMER, 1994); PR-bombesina, rico em prolina, isolado de *Bombina máxima* (LAI et al., 2002).

Em mamíferos, esta classe é representada por Peptídeo Liberador de Gastrina (GRP), isolado de estômago de porco (McDONALD et al., 1979) e por a Neuromedina B, a partir da medula espinhal de porco (MINAMINO et al., 1983).

Atuando como neurotransmissores/moduladores, estes peptídeos produzem efeitos como, hipotermia, liberação de hormônios, estimulação da secreção gastrointestinal, antidiurético, hipertensivo e respostas a células cancerígenas da próstata (ERSPAMER, 1994; XIAO et al., 2003; TSUSHIMA et al., 2003).

Interessantemente GRP e bombesinas são expressos no cérebro e no estômago, porém são produtos de genes diferentes (NAGALLA et al., 1992). Em anuros, a pele produz somente

as bombesinas, refletindo a presença desses peptídeos como agentes de defesa (KÖNIG et al., 2015).

#### 2.3.1.5 Triptofilinas

Esta classe de peptídeos de anuros é a mais recentemente descoberta. As triptofilinas não possuem nenhum homólogo no sistema nervoso de outros metazoários. Os peptídeos desta classe são caracterizados pelo tamanho (possuindo de 4 a 7 resíduos de aminoácidos), por serem ricos em prolina e por apresentarem tipicamente um resíduo de triptofano, geralmente na terceira ou quarta posição (MONTECUCCHI, 1985; SIMON T. STEINBORNER, 1994; KÖNIG et al., 2015).

Foi novamente o grupo de Erspamer que identificou o primeiro membro dessa família (MONTECUCCHI et al., 1984), mas até o momento não se sabe muito bem a função biológica destas moléculas. Porém, algumas triptofilinas, como as triptofilinas L 1.3 e L 3.1 apresentaram atividade muito fraca em músculo liso (STEINBORNER et al., 1996). Outros peptídeos foram testados quanto à atividade biológica sobre a pressão arterial, no entanto os resultados não foram positivos (ERSPAMER, 1994).

#### 2.3.1.6 Peptídeos opióides

Os peptídeos definidos como opióides são aqueles que exercem atividades biológicas semelhantes as dos opiáceos. Em anuros estes peptídeos ocorrem exclusivamente em espécies pertencentes à subfamília Phyllomedusinae (ERSPAMER, 1994).

Os receptores que medeiam as atividades biológicas (analgesia, depressão respiratória, constrição da pupila, redução da motilidade, euforia, disforia, sedação e dependência física) dos opiáceos são  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ . Dependendo da seletividade pelos receptores  $\mu$  ou  $\delta$ , os peptídeos opióides são classificados em duas subfamílias: as dermofinas que são  $\mu$ -seletivas e as deltorfinas que são  $\delta$ -seletivas (ERSPAMER, 1994). Alguns exemplos podem ser visualizados nas tabelas 4 e 5.

**Tabela 4** – Exemplos de Dermorfina ( $\mu$ -seletiva) isoladas de anfíbios (ERSPAMER, 1994).

Peptídeo	Estrutura	Espécies
Dermorfina	Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH <sub>2</sub>	<i>P. sauvagei</i>
Dermorfina [Hyp <sup>6</sup> ]	Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Hyp-Ser-NH <sub>2</sub>	<i>P. rohdei</i>
Dermorfina [Lys-OH <sup>7</sup> ]	Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Lys-OH	<i>P. bicolor</i>
Dermorfina [Trp <sup>1</sup> ,Asn-H <sup>7</sup> ]	Tyr-D-Ala-Phe-Trp-Tyr-Pro-Asn-OH	<i>P. bicolor</i>
Dermorfina (1-8)[Trp <sup>1</sup> ,Asn <sup>5</sup> -OH]	Tyr-D-Ala-Phe-Trp-Asn-OH	<i>P. bicolor</i>

**Tabela 5** – Exemplos de Deltorfina ( $\delta$ -seletivas) isoladas de anfíbios (ERSPAMER, 1994).

Peptídeo	Estrutura	Espécies
met-Deltorfina	Tyr-D-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp-NH <sub>2</sub>	<i>P. bicolor</i>
Alta Deltorfina I	Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Gly-NH <sub>2</sub>	<i>P. bicolor</i>
Alta Deltorfina II	Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH <sub>2</sub>	<i>P. bicolor</i>
leu-Deltorfina	Tyr-D-Leu-Phe-Ala-Asp-Val-Ala-Ser-Thr-Ile-Gly-Asp-Phe-Phe-His-Ser-Ile-NH <sub>2</sub>	<i>P. bicolor</i>

A deltorfina de 7 resíduos de aminoácidos apresentou 1000x o efeito da morfina quando administrado na mesma concentração (ERSPAMER, 1994). Acredita-se que os opióides analgésicos em anuros podem atuar tanto na defesa contra predadores induzindo efeitos saporíferos, quanto podem atuar aliviando a dor nos próprios anuros quando são atacados por um predador (PIRES JUNIOR, 2002).

Os peptídeos opióides foram os primeiros originários de animais a possuírem D-aminoácidos (MANGONI et al., 2006, BARRA et al, 1994). Posteriormente outros peptídeos nesta configuração foram encontrados (MAGALHÃES et al., 2013).

### 2.3.1.7 Xenopsina

Isolado de *Xenopus laevis* (ARAKI et al., 1973) a Xenopsina (XT) é um octapeptídeo, do qual, 6 resíduos de aminoácidos são conservados e ocorrem na mesma ordem em Neurotensina (NT), um hormônio do sistema nervoso central de mamíferos identificado por Carraway e Leemann (1973).

A NT não está presente em anuros, porém foi encontrado no cérebro, no intestino delgado e no reto da espécie *Rana temporaria* um tridecapeptídeo estruturalmente relacionado, com uma região C-terminal conservada e crucial para a sua atividade biológica

(SHAW et al., 1992). Ensaios biológicos com XP e NT evidenciaram que ambos apresentam atividades semelhantes, como aumento da permeabilidade vascular, inibição da secreção do ácido gástrico, estímulo da secreção pancreática exócrina e induzem a saciedade, esta última de fundamental importância por repelir os predadores (FEURLE, 1998).

A Xenina, um peptídeo de 25 resíduos é outro peptídeo relacionado também à XP que foi isolado da mucosa gástrica, da região duodenal e jejunal do homem (FEURLE, 1992).

Vários peptídeos relacionados à Xenopsina e à Neurotensina têm sido encontrados em diversos anuros, tanto na pele quanto nas secreções gastrointestinais (CARRAWAY et al., 1982; FLUCHER et al., 1988; SHAW et al., 1992).

#### 2.3.1.8 Hormônio Liberador de Tireotropina (TRH)

O TRH é um tripeptídeo (pGlu-His-ProNH<sub>2</sub>) que ocorre no hipotálamo dos vertebrados (YASUHARA, 1975). Ele induz a liberação da tireotropina (hormônio tireoestimulante-TSH) da adeno-hipófise. O TSH por sua vez, é um dos principais responsáveis pela liberação do hormônio tireóide (TH), o qual é crucial no processo de metamorfose dos anfíbios (OKADA et al., 2003).

Em anuros, foi isolado pela primeira vez em *Bombina orientalis* (YASUHARA, 1975) em quantidades acima de 40 µg/g de tecido fresco, posteriormente em *Rana pipiens* (JACKSON & REICHLIN, 1977) e em *Rana ridibunda* (RENDA et al., 1985) em concentrações duplicadas frente ao encontrado em hipotálamo.

#### 2.3.1.9 Crinia – Angiotensina II

Foi isolado pela primeira vez da espécie *Crinia georgiana* em seguida de outras duas espécies do gênero *Crinia* (ERSPAMER et al., 1979). É uma forma estendida da Angiotensina II, presente em vertebrados no sistema renina-angiotensina (RAS), envolvido na regulação da pressão sanguínea e no balanço osmótico (SLIVKOFF & WARBURTON, 2003).

Estes peptídeos causam vasoconstrição, resultando em hipertensão, estimulam a liberação de aldosterona no córtex supra-renal, onde através da retenção de sódio nos néfrons distais elevam o efeito de aumento da pressão arterial (ERSPAMER, 1994).

Outros componentes do sistema RAS foram encontrados em vários anuros, como *Rana catesbiana*, *Rana esculenta* e *Bufo bufo* (SANDBERG & JI, 2001).

#### 2.3.1.10 Prokineticinas

Inicialmente foram isolados de *Bombina bombina* denominado BV8 em seguida de *B. orientalis* (B08) e *B. maxima* (Bm8a) (CHEN et al., 2005; MOLLAY et al., 1999).

São peptídeos relativamente grande, com a região N-terminal altamente conservada constituída por 6 resíduos (Ala-Val-Ile-Thr-Gly-Cys), possuem cinco ligações dissulfetos e ligam-se a receptores acoplados a proteína G (GPRs) (NEGRI et al., 2007).

A atividade biológica destes peptídeos inclui contração do músculo liso gastrointestinal, modulação do comportamento (comer, beber, ritmos cardíacos), liberação de hormônios do hipotálamo, envolvimento em hematopoiese e em processos inflamatórios (NEGRI et al., 2007).

#### 2.3.1.11 Sauvageínas

Encontrado exclusivamente em anuros da subfamília Phyllomedusinae, tendo sido isolado primeiramente de *Phyllomedusa sauvagei*, e em seguida de *P. burmeisteri*, *P. palliata*, *P. edentula*, *P. bicolor*, *P. rohdei*, e *P. hypochondrialise* (ERSPAMER et al., 1985; MONTECUCCHI et al., 1979).

Sauvageínas apresentam semelhança estrutural com Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH) de mamíferos e com Urotensina I de teleósteos. As atividades biológicas de Sauvageínas se assemelham também às atividades exercidas por estes hormônios de vertebrados. Apresentam efeitos hipotensores e antidiuréticos em cães e ratos, além de apresentarem diversas outras atividades como: taquicardia, glicemia, termorregulação, atividades de liberação do hormônio adrenocorticotrófico e da  $\beta$ -endorfina, a qual regula o hormônio  $\alpha$ -melanotrófico ( $\alpha$ -MSH) responsável pelo processo de adaptação da coloração na pele de anuros, além de agir acelerando a metamorfose, através do CRH que estimula a liberação do hormônio tireoidiano de algumas espécies (ERSPAMER, 1994; DENVER, 1999; POHL et al., 2001; COMELISSE et al., 2002; HAUGER et al., 2003).

#### 2.3.1.12 Peptídeos contendo dissulfeto

Estes peptídeos foram isolados recentemente de três espécies de Crinia (MASELLI et al., 2004 e 2006; JACKWAY et al., 2008). As atividades biológicas destes peptídeos ainda não estão bem estabelecidas, mas de modo geral, apresentam propriedades que os fazem bons candidatos para peptídeos neuroativos e antimicrobianos (JACKWAY et al., 2008).

### 2.3.2 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

As secreções de anfíbios são ricas em PAMs, os quais apresentam amplo espectro farmacológico sem toxicidade para células normais de mamíferos (FEDER et al., 2001). Os PAMs são usados pelos anfíbios como parte de seu sistema imune contra microrganismos patogênicos (BOMAN, 1991; ZASLOFF, 1992; PIERRE, 2000). Atuam como primeira linha de defesa contra microrganismos associados ao declínio global dos anfíbios (ROLLINS-SMITH et al., 2002).

Bombinina foi o primeiro PAM de anfíbio, isolado da espécie *Bombina variegata* (CSORDAS & MICHL, 1969), apresentando atividade antimicrobiana e hemolítica. A partir de então, mais de 50 PAMs já foram caracterizados, sendo a cationicidade e a capacidade de permeabilizar as membranas biológicas de microrganismos algumas das principais características destes (PRATES, 1999).

Obviamente, existem particularidades na produção de peptídeos antimicrobianos de acordo com cada espécie, variando, assim, a atividade contra um amplo espectro de microrganismos (AMICHE et al., 1999). Dentre os PAMs, alguns são constitutivos e os demais são sintetizados em resposta a alguma infecção (BOMAN et al., 1972; ZASLOFF, 2002; CUNLIFFE & MAHIDA, 2004; IZADPANAH & GALLO, 2005).

Estes peptídeos são encontrados em diversas famílias de anfíbios, especialmente da ordem anura, porém, as famílias Hylidae e Ranidae destacam-se em quantidade e diversidade de moléculas. Os diversos estudos com PAMs de espécies destas duas famílias revelaram um alto grau de semelhança estrutural, sugerindo, portanto, uma possível existência de um ancestral comum (VANHOYE et al., 2003).

Considerando as características estruturais, os PAMs podem ser classificados de modo geral em três grupos: 1) peptídeos lineares que apresentam conformação hélice  $\alpha$  anfipática (sem resíduos de cisteínas); 2) peptídeos com ponte dissulfeto (possuindo dois resíduos de cisteínas na região C-terminal); 3) e os pequenos peptídeos contendo entre 10 a 13 resíduos de aminoácidos. Estas características são simplistas e não abrangem o total de PAMs que aumenta anualmente (COSTA, 2005).

Entretanto, alguns peptídeos apresentam padrões diferenciados que distinguem os PAMs em diferentes classes, conforme observado na tabela 6.

**Tabela 6** – Exemplos de algumas classes de Peptídeos Antimicrobianos (PAMs) (\*KÖNIG et al., 2015).

Classes de peptídeos	Anuros/família	Classes de peptídeos	Anuros/família
Brevivninas	Ranidae	Filoseptinas	Hylidae
Esculentinas		Plasticinas	
Japonicinas		Filoxinas	
Nigrocinas		Hiposinas	
Palustrinas		Aliteserinas	Alytidae
Ranaciclinas		Bombininas	Bombinatoridae
Ranatueringinas		Maximinas	Bombinatoridae
Temporinas		Tigerininas	Dicroglossidae
Aureinas		Hylidae	Kassinatueringinas
Caerinas	Ocelatinas		Leptodactylidae
Citropinas	Uperinas		Myobatrachidae
Dahleinas	Signiferinas		Myobatrachidae
Dermaseptinas	Magaininas		Pipidae
Dermatoxinas			

\*Trata-se de uma revisão da literatura sobre estes peptídeos. König e colaboradores não são os autores que descreveram cada peptídeo/classe de PAMs aqui descritos.

### 2.3.2.1 Mecanismo de ação membranolítica

Conforme citado no tópico acima, os PAMs compartilham características químicas que são necessárias para o seu mecanismo de ação. Embora tenham sido descritos PAMs com atividade contra células eucarióticas (fungos e protozoários, por exemplo), a interação eletrostática entre os PAMs e as membranas procarióticas é mais forte. Isso porque a diferença na constituição química das membranas promove características físico-químicas distintas entre procariotos e eucariotos (YEAMAN & YOUNT, 2003).

As membranas de procariotos são constituídas por moléculas de cargas negativas, como: fosfatidilglicerol (FG); cardiolipina (CL); e fosfatidilserina (FS), as quais atraem peptídeos carregados positivamente. Já os eucariotos possuem fosfatidilcolina (FC); esfingomielina (EM); fosfatidiletanolamina (FE); e esteróis (carga neutra). As cargas destas moléculas interferem na interação com os PAMs, porém outras características como distribuição e saturação dos fosfolipídios interferem na seletividade de PAMs por membranas procarióticas (YEAMAN & YOUNT, 2003).

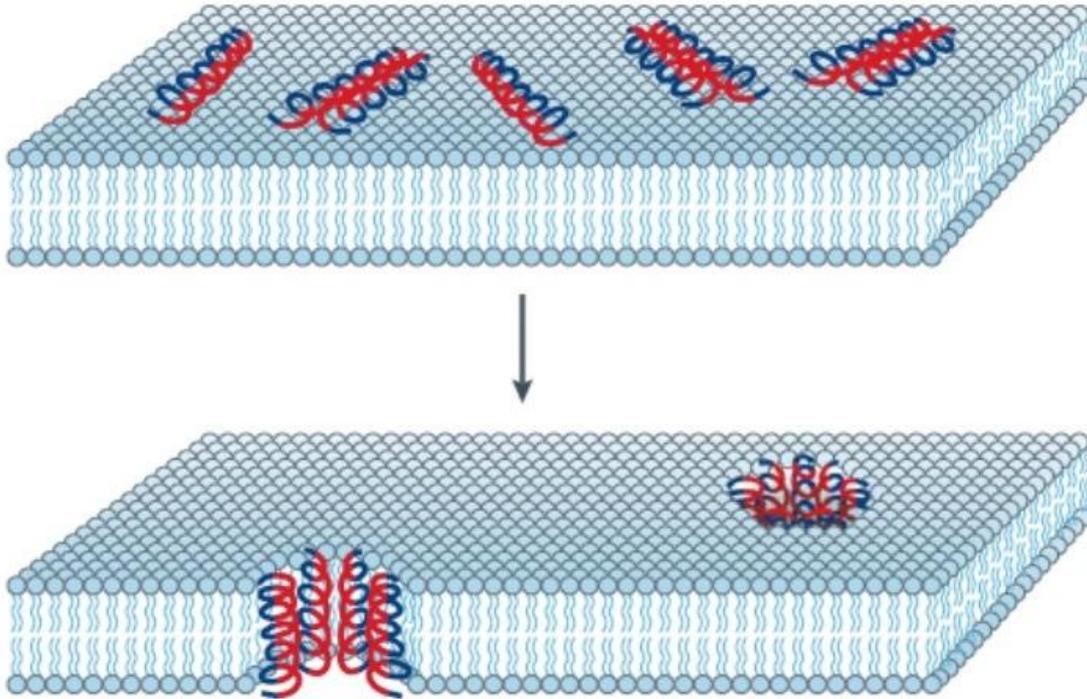
Além destas características que influenciam na interação de PAMs com as membranas, outras propriedades relacionadas às estruturas dos peptídeos são determinantes para a atividade biológica destas moléculas. Estas propriedades são: disposição dos resíduos de aminoácidos ao longo da cadeia, elevada hidrofobicidade, cargas positivas, momento hidrofóbico, resíduos L-aminoácidos e formação de estrutura secundária hélice  $\alpha$  anfipática e polaridade angular. (HANCOCK & CHAPPLE, 1999; POWERS & HANCOCK, 2003; ZASLOFF, 2002; BROGDEN, 2005).

Existem alguns modelos que visam explicar o mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos em membranas biológicas. A seguir uma breve descrição desses modelos:

#### 2.3.2.1.2 Modelo de “Barrel-Stave”

Neste modelo, propõe-se que haja formação de poros transmembrânicos a partir das moléculas de peptídeos. Conforme visualizado na figura 7, inicialmente há uma interação eletrostática entre a membrana e os peptídeos, a partir da qual, os peptídeos se estruturam em hélice  $\alpha$  e se inserem na membrana através da formação de poros. A formação dos poros se dá pela interação das regiões hidrofóbicas dos peptídeos (em azul) com os núcleos lipídicos da bicamada, deixando as regiões hidrofílicas dos peptídeos (em vermelho) na face interior do barril. Estes poros, por sua vez, aumentam de tamanho conforme os monômeros de peptídeos se agrupam. A inserção dos monômeros nas membranas é o momento crítico na formação dos poros, posto que a estruturação transmembrânica é desfavorável energeticamente (SHAI, 2002).

**Figura 7** - Modelo Barrel-Staff. A partir da interação eletrostática as regiões hidrofóbicas dos peptídeos (em azul) se alinham aos núcleos lipídicos da bicamada deixando as regiões hidrofílicas (em vermelho) na face interior do barril.

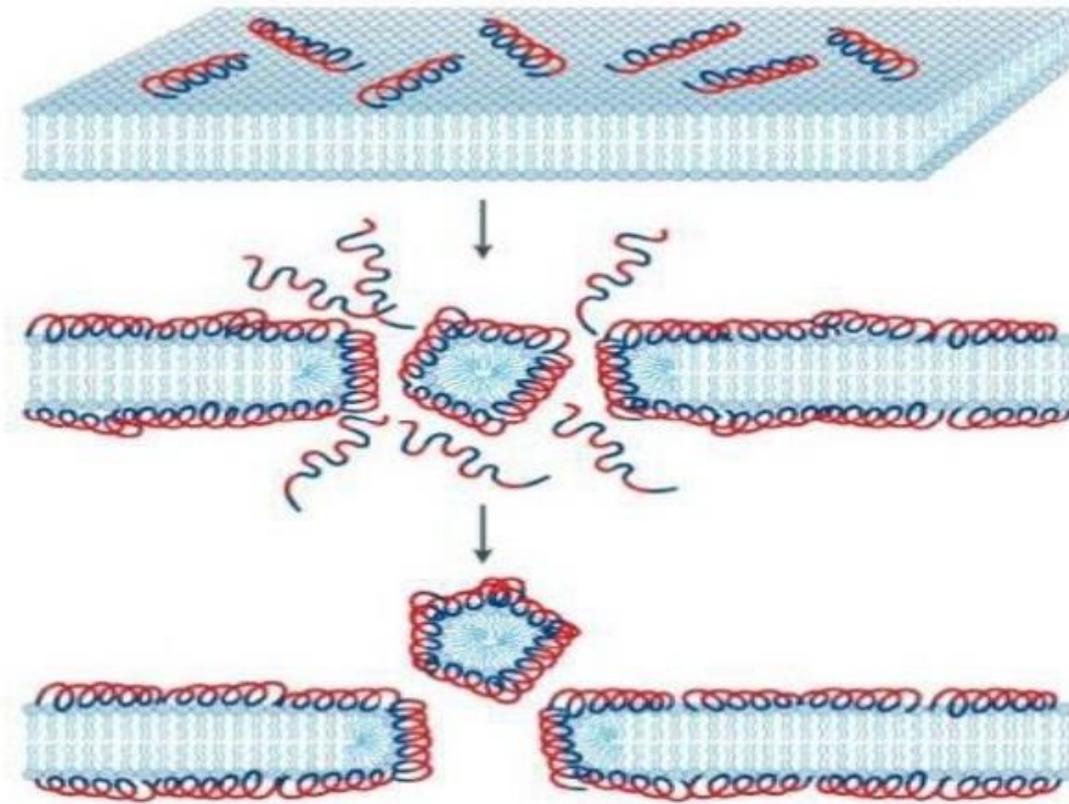


**Fonte:** BROGDEN, 2005.

#### 2.3.2.1.3 Modelo “Carpet-Like”

Neste modelo sugere-se que os peptídeos são adsorvidos perpendicularmente sobre a membrana formando uma estrutura assemelhada a um tapete (Figura 8). Nesta proposta, a interação inicial entre os peptídeos e as membranas também é mediada por interação eletrostática, a partir da qual, os monômeros se alinham deixando a face hidrofílica em contato com as cabeças dos fosfolipídios. Após isso, a face hidrofóbica dos peptídeos se reorienta em direção a região hidrofóbica da membrana. E por fim, ocorre a desintegração da membrana, através do rompimento de sua curvatura. Esta última etapa pode ser precedida pela formação de poros transientes (SHAI, 2002).

**Figura 8** - Modelo Carpet-Like. A partir da interação eletrostática a face hidrofílica dos peptídeos se alinha e se liga aos grupamentos das cabeças dos fosfolípidios. A face hidrofóbica se reorienta para a região hidrofóbica da membrana. Ocorre então a desintegração da membrana por rompimento de sua curvatura.

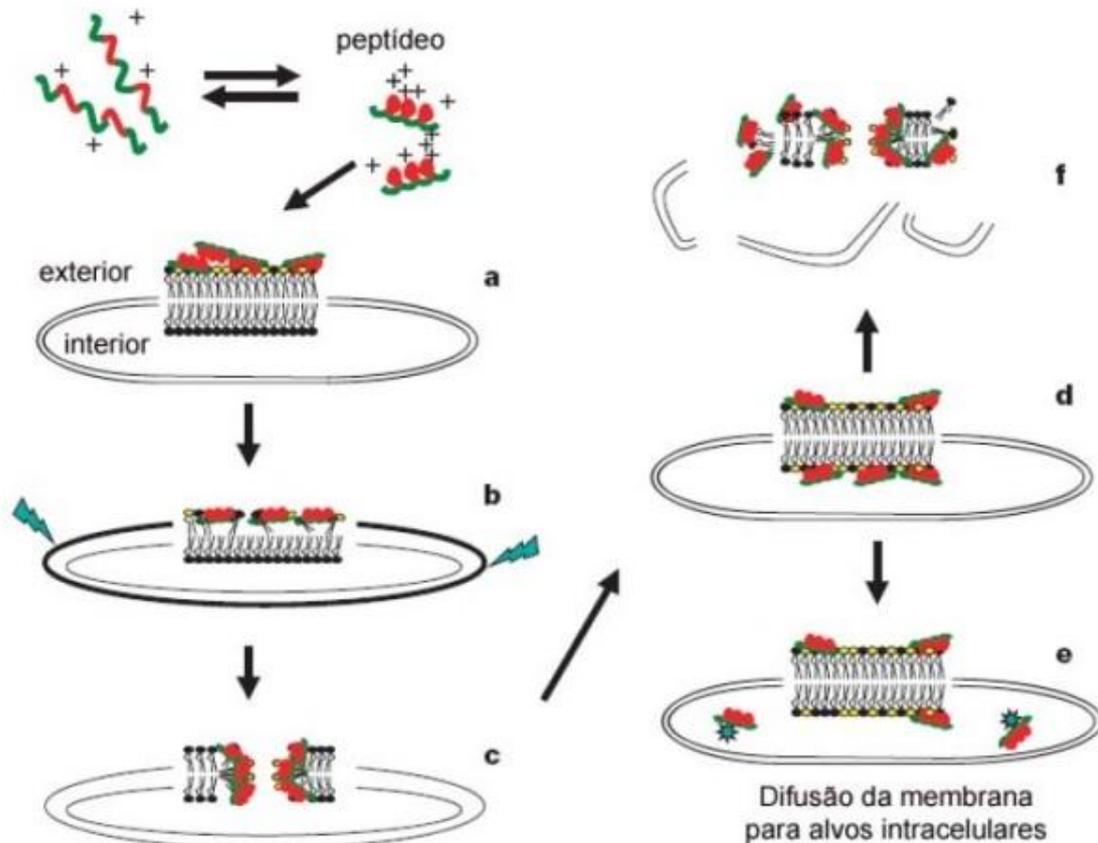


**Fonte:** BROGDEN, 2005.

#### 2.3.2.1.4 Modelo Shai-Matsuzak-Huang (SMH)

No modelo SMH, acredita-se que a interação dos peptídeos com a membrana provoca deslocamento dos fosfolípidios, modificando, portanto, a estrutura membranal e possibilitando a entrada de peptídeos para o interior da célula. Conforme representado na figura 9, os peptídeos se alinham à membrana formando um carpete na camada externa da membrana. A ligação dos peptídeos na face externa da membrana gera sua expansão em relação à face interna, criando tensões (HUANG, 2006). Em decorrência dessa expansão, os fosfolípidios da face interna se aproximam gerando o fenômeno chamado de achatamento de membrana, em seguida os fosfolípidios e peptídeos são transportados para a face interna, ocasionando a difusão dos peptídeos para alvos intracelulares e o posterior colapso da estrutura da membrana (ZASLOFF, 2002; CHEN, 2002; 2003; HUANG, 2006).

**Figura 9** - Modelo Shai-Matsuzak-Huang (SMH). **a)** Alinhamento dos peptídeos formando um carpet; **b)** Ligação dos peptídeos à face externa gerando expansão e posterior achatamento da membrana apontado pelas setas azuis; **c)** transição de fase e formação de poros transitórios; **d)** transporte dos peptídeos e fosfolipídios para face interna da membrana; **e)** difusão dos peptídeos para alvos intracelulares e **f)** ruptura da membrana em fragmentos.



**Fonte:** ZASLOFF, 2002.

#### 2.3.2.1.5 Modelo “detergent-like”

Este modelo sugere a ação de peptídeos como casos específicos de fenômeno de detergência. Proposto por Bechinger & Lohner (2006), o modelo “detergent-like” é fundamentado nos efeitos causados pela intercalação de moléculas anfifílicas em bicamadas lipídicas, causando tensão, curvatura e micelização.

O efeito detergente promovido pelos peptídeos antimicrobianos leva à desintegração das membranas, perda da barreira física, dissipação do gradiente eletroquímico e posterior perda dos componentes. Este modelo não exclui os outros, pelo contrário, engloba todos os

mecanismos propostos nos outros modelos, sugerindo que todos eles podem ocorrer dependendo das condições experimentais citoplasmáticos (BECHINGER & LOHNER, 2006).

#### 2.4 A espécie *Hypsiboas boans* (LINNAEUS, 1758)

*Hypsiboas boans* pertence à família Hylidae, a qual é umas das maiores famílias de anuro com 936 espécies e 50 gêneros conhecidos. Atualmente são reconhecidas três subfamílias de Hylidae: Pelodyadinae, Phyllomedusinae e Hylinae (LIMA et al., 2008; AMPHIBIAWEB, 2014).

Os hilídeos são anuros de grande variedade na aparência externa e no tamanho (1,7-14 cm de comprimento) e as espécies pertencentes a esta família são na maioria arborícolas, mas algumas são semi-aquáticas e outras são fossoriais. Uma característica que geralmente distingue os hilídeos de outras famílias é a presença dos discos adesivos arredondados nas pontas dos dedos, presentes na maioria das espécies e pelo dedo do pé que apresenta uma compensação da cartilagem da falange terminal, a qual pode ajudar na escalada (LIMA et al., 2008; AMPHIBIAWEB, 2014).

Hylidae destaca-se dentre as outras famílias pela quantidade e diversidade de moléculas presentes nas suas secreções, principalmente pela presença de peptídeos com atividades biológicas (NICOLAS, VANHOYE, AMICHE, 2003). A subfamília Phyllomedusinae, por exemplo, possui peptídeos representantes de muitos destes grupos de moléculas, dentre as quais se destacam as dermaseptinas e as filoseptinas, famílias de peptídeos antimicrobianos que foram encontradas somente nesse grupo de anfíbios (BRAND et al., 2002; LEITE et al., 2005; BRAND et al., 2006).

Dos 50 gêneros conhecidos da família Hylidae, o gênero *Hypsiboas* possui cerca de 86 espécies que são encontradas nos Trópicos, América do Sul desde a Nicarágua até a Argentina e em Trinidad e Tobago (AMNH, 2014; AMPHIBIAWEB, 2014).

Poucas espécies deste gênero foram estudadas quanto aos seus potenciais químico/farmacológicos. Porém, dentre as que foram estudadas, foram identificados de *H. raniceps* uma nova classe de peptídeos antimicrobianos, denominada Raniseptinas (MAGALHÃES et al., 2008) e quatro novos peptídeos antimicrobianos, Hylin a1 da espécie *H. albopunctatus* (CASTRO et al., 2009), Hylaseptina P1 de *H. punctata* (PRATES et al., 2004) e Hylins b1 e b2 de *H. lundii* (CASTRO et al., 2005).

A espécie *Hypsiboas boans* que foi descrita em 1758 por Linnaeus, nunca teve suas secreções estudadas, revelando, portanto, a necessidade de estudos nesta linha de pesquisa com a mesma.

Esta espécie distribui-se por toda a Bacia Amazônica, Equador, Colômbia, leste do Panamá e Trinidad e Tobago. Nas regiões de Manaus, *Hypsiboas boans* é encontrada nas bordas da Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD) e ao longo dos igarapés Tinga, Ipiranga, Acará e Bolívia (LIMA et al., 2008).

Destaca-se entre as demais espécies do gênero pelo seu tamanho, onde em machos o tamanho médio é de 101-128 mm e em fêmeas é de 91-123 mm. Nos machos o dorso apresenta coloração marrom e nas fêmeas marrom-alaranjado. O ventre de ambos os sexos apresenta uma coloração de creme a esbranquiçada e nas partes laterais do corpo e das pernas apresentam faixas transversais mais escuras. Entre os dedos dianteiros, esta espécie apresenta uma membrana completa até o início das falanges terminais. A íris de *Hypsiboas boans* é marrom-alaranjada (Figura 10) (LIMA et al., 2008).

**Figura 10** - *Hypsiboas boans*.



**Fonte:** Beatriz Pinheiro, 2013.

*Hypsiboas boans* é uma espécie arborícola e de hábito noturno, se reproduz na estação seca, entre julho e dezembro. Cerca de 1300 a 3000 ovos são depositados em forma de massa gelatinosa na superfície da água em bacias de nidificação construídas pelos machos, as quais têm conexões aquáticas a igarapés, ou em depressões naturais que são formadas nas liteiras ou

raízes. Tais locais de desovas são defendidos pelos machos. Os girinos apresentam coloração marrom clara a esbranquiçada, vivem em bancos de areia ou liteira dentro dos igarapés, e são impalatáveis para os peixes (LIMA et al., 2008).

A espécie evita altitudes mais elevadas, portanto, é encontrada em áreas de florestas e perto de corpos de água como lagos e rios durante a época de acasalamento. Alimenta-se principalmente de insetos e outros invertebrados. Dificilmente os indivíduos se movem para áreas longes do seu local de descanso e de reprodução (LIMA et al., 2008).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Caracterizar peptídeos bioativos da secreção cutânea do anuro *Hypsiboas boans*.

#### **3.2 Específicos**

- i. Extrair e isolar os peptídeos da secreção cutânea de *H. boans*;
- ii. Elucidar a estrutura primária dos peptídeos da secreção de *H. boans* e as sequências dos seus respectivos genes codificadores;
- iii. Analisar as sequências primárias dos peptídeos por meio de ferramentas de bioinformática.

#### 4 REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, Y. H. A.; POWER, G. J.; FLATT, P. R.; WOODHAMS, D. C.; ROLLINS-SMITH, L. A.; CONLON, J. M. A peptide of the phylloseptin family from the skin of the frog *Hylomantis lemur* (Phyllomedusinae) with potent in vitro and in vivo insulin-releasing activity. **Peptides**, 29: 2136 – 2143, 2008.

AMICHE, M.; AURELIA, A. S.; THIERRY, N. P. & NICOLAS, P. The dermaseptin precursors: A protein family with a common preproregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. **FEBS Letters**, 456: 352-356. 1999.

AMICHE, M.; LADRAM, A.; NICOLAS, P. Review A consistent nomenclature of antimicrobial Peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. **Peptides**, 29: 2074 – 2082, 2008.

AMNH (AMERICAN MUSEUM OF NATURAL HISTORY). Amphibian Species of the World 6.0, an Online Reference. Disponível em: <[research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Anura/Hylidae/Hylinae/Hypsiboas](http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Anura/Hylidae/Hylinae/Hypsiboas)>. Acesso em: 27 jan. 2014.

AMPHIBIAWEB: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2014. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: <http://amphibiaweb.org/>. (Accessed: Dec 26, 2014).

AMPHIBIAWEB: Wallacean Biome Map of Amphibian Species in Decline. [web application]. 2014. UC Regents, Berkeley, CA. Available: <http://amphibiaweb.org/declines/>.

ANASTASI, A.; ERSPAMER, V.; BUCCI, M. Isolation and amino acid sequence of alytesin and bombesin, two analogous active tetradecapeptides from the skin of European discoglossid frogs. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 148: 443-446, 1972.

ANASTASI, A.; ERSPAMER, V.; BUCCI, M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibian *Bombina* and *Alytes*. **Experientia**, 27: 166-167, 1971.

ANASTASI, A.; ERSPAMER, V.; ENDEAN, R. Isolation and amino acid sequence of caerulein, the active peptide in the skin of *Hyla caerulea*. **Archives Biochemistry and Biophysics**, 125:57-68, 1968.

ARAKI, K.; TACHIBANA, S.; UCHIYAMA, M.; NAKAJIMA, T.; YASUHARA, T. Isolation and structure of a new active peptide xenopsin on rat stomach strip and some biogenic in the skin of *Xenopus laevis*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, 23:3132-3140, 1973.

BAKER, M.A.; MALOY, W.L.; ZASLOFF, M.; JACOB, L.S. Anticancer of magainina 2 and analogue Peptides. **Cancer Research**, 53: 3052-3057, 1993.

BARBOSA, E. A. **Estrutura gênica, indução, expressão e processamento de peptídeos bioativos isolados a partir da secreção cutânea de *Phyllomedusa azurea* e *Physalaemus***

**nattereri.** Tese (Doutorado) em Biologia Molecular. Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília, 2014.

BARRA, D.; MIGNOGNA, G.; SIMMACO, M.; PUCCI, P.; SEVERINI, C.; FALCONIERI-ERSPAMER, G.; NEGRI, L.; ERSPAMER, V. [D-eu2] deltorphin, a 17 amino acid opioid peptide from the skin of the Brazilian hylid frog, *Phyllomedusa burmeisteri*. **Peptides**, 15: 199–202. 1994.

BATISTA, C. V. F; ROSENDO DA SILVA, L. A; SEBBEN, A.; SCALONI, FERRARA, L.; PAIVA, G.R.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; POSSANI L.D.; BLOCH JR, C. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. **Peptides**, 20: 679–686, 1999.

BEATTIE, R.C.; TYLER-JONES, R.; BAXTER, M.J. The effects of pH, aluminium concentration and temperature on the embryonic development of the European common frog, *Rana temporaria*. **Journal Zoology**, London 228:557-70, 1992.

BECHINGER, B. & LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1758: 1529-1539. 2006.

BÍBLIA, Português. **Bíblia de Jerusalém**. Paulus, p. 2206, 2002.

BOMAN, H. G.; NILSSON, I. & RASMUNSON, B. Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. **Nature**, 237: 232–235. 1972.

BOMAN, H. G. Antibacterial Peptides: Key components needed in immunity, **Cell**, Vol. 65, 205-207, April 19, 1991.

BRAND, D. G.; LEITE, J. R. S. A.; MANDEL, S. M. S.; MESQUITA, D. A.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; BARBOSA, E. A.; VINECKY, F.; MARTINS, G. R.; GALASSO, J. H.; KUCKELHAUS, S. A. S.; SAMPAIO, R. N. R.; JUNIOR, J. R.; ANDRADE, A. C.; JUNIOR, C. B. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 347: 739–746, 2006.

BRAND, G. D.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; ALBUQUERQUE, S.; PRATES, M. V.; AZEVEDO, R. B.; CARREGARO, V.; SILVA, J. S.; SÁ, V. C. L.; BRANDÃO, R. A.; BLOCH JUNIOR, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: ANTI-TRYPANOSOMA CRUZIACTIVITY WITHOUT CYTOTOXICITY TO MAMMALIAN CELLS. **The Journal of Biological Chemistry**, 277:49332-49340, 2002.

BRANDÃO, R. A. Rapid ecological assessment of the herpetofauna in Pedras Negras and Currealinho extractive reserves, Costa Marques, RO. **Brasil Florestal**, 74: 61-73, 2002.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, 3: 238–250. 2005.

CARRAWAY, R.; LEEMANN, S. The isolation of a new hypotensive peptide neurotensin from bovine hypothalamus. **Journal of Biological Chemistry**, 248:6854-6861, 1973.

CARRAWAY, R.; RUANE, S.E.; FEURLE, G.E.; TAYLOR, S. Amphibian neurotensina (NT) is not xenopsin (XP): Dual presence of NT-like and XP-like peptides in various amphibia. **Endocrinology**, 110:1094-1101, 1982.

CASTRO, M. S.; FERREIRA, T. C.; CILLI, E. M.; JUNIOR, E. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SEBEN, A.; RICART, C. A. O.; SOUSA, M. V.; FONTES, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides**, 30: 291-296, 2009.

CASTRO, M. S.; MATSUSHITA, R. H.; SEBEN, A.; SOUSA, M.V.; FONTES, W. Hyllins: bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the Brazilian treefrog *Hyla biobeba*. **Protein Pept Let**, 12: 89 – 93, 2005.

CHARPENTIER, S.; AMICHE, M.; MESTER, J.; VOUILLE, V.; Le CAER, Jean-Pierre; NICOLAS, P. & DELFOUR, A. Structure, synthesis, and molecular cloning of dermaseptins B, a family of skin peptide antibiotics. **The Journal Biological Chemistry**, 273: 14690–14697. 1998.

CHEN, T. B.; XUE, Y. Z.; ZHOU, M.; SHAW, C. Molecular cloning of mRNA from toad granular gland secretion and lyophilized skin: identification of Bo8 – a novel prokineticin from *Bombina orientalis*. **Peptides**, 26:377–83. 2005.

CHEN, X.; WANG, L.; CHEN, H.; ZHOU, M.; CHEN, T.; SHAW, C. A fish bradykinin (Arg<sup>0</sup>, Trp<sup>5</sup>, Leu<sup>8</sup>-bradykinin) from the defensive skin secretion of the European edible frog, *Pelophylax kl. esculentus*: structural characterization; molecular cloning of skin kininogen cDNA and pharmacological effects on mammalian smooth muscle. **Peptides**, v. 32, n. 1, p. 26-30, Jan 2011.

CHEN, F. Y.; LEE, M. T. & HUANG, H. W. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. **Biochimica et Biophysica Acta**, 84: 3751-3758. 2003.

CHEN, F. Y.; LEE, M. T. & HUANG, H. W. Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin. **Biochimica et Biophysica Acta**, 82: 908-14. 2002.

COMELISSE, L. N.; DEUMENS, R.; COENEN, J. J.; ROUBOS, E. W.; GIELEN, C. C. A. M.; YPEY, D. L. JENKS, B. G.; SCHEENEN, W. J. J. M. Sauvagine Regulates  $Ca^{2+}$  Oscillations and Electrical Membrane Activity of Melanotrope Cells of *Xenopus laevis*. **Journal of Neuroendocrinology**, 14: 778-787, 2002.

CONCEICAO, K.; KONNO, K.; MELO, R. L.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; SCIANI, J. M.; CONCEIÇÃO, I. M.; PREZOTO, B. C.; CAMARGO, A. C. M.; PIMENTA, D. C. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, v. 28, n. 3, p. 515-523, Mar 2007.

CONLON, J. M.; JOUENNE, T.; COSETTE, P.; COSQUER, D.; VAUDRY, H.; TAYLOR, C. K.; ABEL, P. W. Bradykinin-related peptides and tryptophyllins in the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. **Gen Comp Endocrinol [S.I.]**, v. 143, n. 2, p. 193-9, 2005b.

CONLON, J. M. Bradykinin and its receptors in non-mammalian vertebrates. **Regul Pept**, v. 79, n. 2-3, p. 71-81, Feb 5 1999.

CONLON, J. M.; ABRAHAM, B.; SONNEVEND, A.; JOUENNE, T.; COSETTE, P.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; BEVIER, C. R. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the carpenter frog *Rana virgatipes* (Ranidae, Aquarana). **Regul Pept** [S.I.], v. 131, n. 1-3, p. 38-45, 2005a.

CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1788: 1556 – 1563, 2009.

COSTA, T. O. G. **Purificação e Determinação Estrutural de Substâncias Bioativas em Três Espécies de Osteocephalus (Amphibia:Anura:Hylidae)**. Tese (Doutorado) em Ciências. Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

COUTURE, R.; HARRISSON, M.; VIANNA, R. M.; CLOUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. **Eur J Pharmacol**. 429:161–76. 2001.

CRUCIANI, R.A.; BARKER, J.L.; ZASLOFF, M.; CHEN, H.C. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88:3792-3796, 1991.

CSORDAS, A.; MICHL, H. Primary structure of two oligopeptides of the toxin of *Bombina variegata*. **Toxicon**, 7: 103-108, 1969.

CUNLIFFE, R. N.; MAHIDA, Y. R. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. **Journal of Leukocyte Biology**, 75: 49-58. 2004.

DELFINO, G. DREWES, R. C.; MAGHERINI, S.; MALENTACCHI, C.; NOSI, D.; TERRENI, A. Serous cutaneous glands of the Pacific tree-frog *Hyla regilla* (Anura, Hylidae): patterns of secretory release induced by nor-epinephrine. **Tissue Cell**, v. 38, n. 1, p. 65-77, Feb 2006.

DELFINO, G.; BRIZZI, R.; NOSI, D.; TERRENI, A. Serous cutaneous glands in new world hylid frogs: an ultrastructural study on skin poisons confirms phylogenetic relationships between *Osteopilus septentrionalis* and *Phrynohyas venulosa*. **J Morphol**, v. 253, n. 2, p. 176-86, Aug 2002.

DENVER, R. J. Evolution of the Corticotropin-releasing Hormone Signalling System and Its Role in Stress-induced Phenotypic Plasticity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 897:46-53, 1999.

DOCKRAY, G. J.; HOPKINS, C. R. Caerulein Secretion by Dermal Glands in *Xenopus-Laevis*. **Journal of Cell Biology**, v. 64, n. 3, p. 724-733, 1975.

DORNELLES, M. F.; MARQUES, M. G. B.; RENNER, M. F. Revisão sobre toxinas de Anura (Tetrapoda, Lissamphibia) e suas aplicações biotecnológicas. **Ciência Em Movimento**, XII, nº 24, 2010/2.

DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. New York: McGraw-Hill Book Company Publ. 228 p., 1986.

EGAL, M.; CONRAD, M.; MacDONALD, D.; MALOY, W. L.; MOTLEY, M.; GENCO, C. A. Antiviral effects of synthetic membrane-active peptides on Herpes Simplex Virus, Type 1. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Volume 13, Issue 1, Pages 57-60. 1999.

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P.; NAKAJIMA, T.; YASUHARA, T.; ENDEAN, R. Amino acid composition and sequence of crinia-angiotensin, an angiotensin II-like endecapeptide from the skin of the Australian frog *Crinia georgiana*. **Cell Mol Life Sci**, 35:1132-3. 1979.

ERSPAMER, V. **Bioactive secretions of the amphibian integument**. In: Heatwole H, Barthalmus GT, editors. *Amphibian biology: the integument*, vol. 1. Chipping Norton: Surrey Beatty and Sons. p. 178-350. 1994.

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P.; ERSPAMER, G. F.; MONTECUCCHI, P. C.; DECASTIGLIONE, R. Phyllomedusa skin – a huge factory and store-house of a variety of active peptides. **Peptides**, 6:7-12. 1985.

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P. Active polypeptides of amphibian skin and their synthetic analogues. **Pure and applied Chemistry**, 35: 463-494, 1973.

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P. Active polypeptides: from amphibian skin to gastrointestinal tract and brain of mammals. **Trends Pharmacology Sciences**, 1: 391 – 395, 1980.

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P. Proceedings: Amphibian skin polypeptides active on the gut. *J Endocrinol.*, 70: 120-13p, 1976.

FEDER, R.; NEHUSHTAI, R.; MOR, A. Affinity driven molecular transfer from erythrocyte membrane to target cells. **Peptides**, 22: 1683-1690, 2001.

FEURLE, G. E. Xenin – A review. **Peptides**, 19:609-615, 1998.

FEURLE, G. E.; HAMSCHER, G.; KUSIEK, R.; MEYER, H. E.; METZGER, J.W. Identification of xenin, a xenopsin-related peptide, in the human gastric mucosa and its effect on exocrine pancreatic secretion. **Journal Biological Chemistry**, 267:22305-22309, 1992.

FLUCHER, B. E.; LENGELACHNER-BACHINGER, C.; FEURLE, G. E. Immunocytochemical evidence for the colocalization of neurotensin/xenopsin- and gastrin/caerulein-immunoreactive substances in *Xenopus laevis* gastrointestinal tract. **General and Comparative Endocrinology**, 72:54-62, 1988.

GILLILLAND, C. D.; SUMMER, C. L.; GILLILLAND, M. G.; KANNAN, K.; VILLENEUVE, D. L.; COADY, K. K.; MUZZALL, P.; MEHNE, C.; GIESY, J. P. Organochlorine insecticides, polychlorinated biphenyls, and metals in water, sediment, and green frogs from southwestern Michigan. **Chemosphere**, 44:327-339, 2001.

HANCOCK, R. E. W. & CHAPPLE, D. S. Peptides Antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43: 1317–1323, 1999.

HAUGER, R. L.; GRIGORIADIS, D. E.; DALLMAN, M. F.; PLOTSKY, P. M.; VALE, W. W.; DAUTZENBERG, F. M. Current Status of the nomenclature for receptors for Corticotropin-Releasing Factor and their ligands. **International Union of Pharmacology**. XXXVI, 55: 21-26, 2003.

HAYES, T. B.; COLLINS, A.; LEE, M.; MENDOZA, M.; NORIEGA, N.; STUART, A.; VONK, A. Hermaphroditic, demasculinized frog after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. **PNAS** (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 99:5476-5480, 2002.

HECNAR, S.J.; M'CLOSKEY, R.T. Regional dynamics and the status of amphibians. **Ecology**, 77: 2091-97, 1996.

HILDEBRAND, M.; GOSLOW, G. **Análise da estrutura dos vertebrados**. Tradução Ana Maria de Souza, Érica Schlenz. 2. ed . São Paulo: Atheneu Editora, 2006.

HOFFMANN, W.; BACH, T. C.; SELIGER, H.; KREIL, G. Biosynthesis of caerulein in the skin of *Xenopus laevis* – partial sequences of precursors as deduced from cDNA clones. **EMBO J**, 2:111–4. 1983.

HOLZER-PETSCHKE, U.; LEMBECK, F.; SEITZ, H. Contractile effects of substance P and neurokinin A on rat stomach in vivo and in vitro. **British Journal of Pharmacology**, 90:273–279, 1987.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Review Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta**, 1778: 357 – 375, 2008.

HUANG, H. W. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. **Biochim Biophys Acta**, 1758 (9): 1292–302, 2006.

IZADPANAH, A. & GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 52: 381–390, 2005.

JACKSON, I. M. D.; REICHLIN, S. Thyrotropin-releasing hormone abundance in the skin of the frog *Rana pipiens*. **Science**, 198:414–5, 1977.

JACKWAY, R. J.; PUKALA, T. L.; MASELLI, V. M.; MUSGRAVE, I. F.; BOWIE, J. H.; LIU, Y.; SURINYA-JOHNSON, K. H.; DONNELLAN, S.C.; DOYLE, J.R.; LLEWELLYN, L.E.; TYLER, M.J. Disulfide-containing peptides from the glandular skin secretions of froglets of the genus *Crinia*: structure, activity and evolutionary trends. **Regul Pept**, 151:80–7, 2008.

KÖNIG, E.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; SHAW, C. The diversity and evolution of anuran skin peptides. **Peptides**, 63, p. 96–117, 2015.

KREIL, G. D-amino acids in animal peptides. **Annu Rev Biochem** [S.I.], v. 66, p. 337-45, 1997.

LAI, R.; LIU, H.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. A novel proline rich bombesin-related peptide (PR-bombesina) from toad *Bombina maxima*. **Peptides**, 23: 437-442, 2002.

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.; BLOCH Jr., C. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides**, USA, v. 26 (4), p. 565-573, 2005.

LI, L.; BJORSON, A. J.; HE, J.; CAI, G.; RAO, P.; SHAW, C. Bradykinins and their cDNA from piebald odorous frog, *Odorrana schmackeri*, skin. **Peptides**, v. 24, n. 6, p. 863-872, Jun 2003.

LIEM, K. F.; BEMIS, W. E.; WALKER JR, W. F.; GRANDE, L. **Anatomia funcional dos vertebrados: uma perspectiva evolutiva**. Tradução EZ2 Translate. 3. ed. norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

LIMA, A. P.; MAGNUSSON, W. E.; MENIN, M.; ERDTMAN, L. K.; RODRIGUES, D. J.; KELLER, C.; HODI, W. Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central. **Áttema Design Editorial**, 168p, 2008.

MAGALHÃES, B. S.; MELO, J. A. T.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; VINECKY, F.; BARBOSA, E. A.; VERLY, R. M.; MEHTA, A.; NICOLI, J. R.; BEMQUERER, M. P.; ANDRADE, A. C.; JUNIOR, C. B. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 377: 1057–1061, 2008.

MAGALHÃES, M. T. Q.; BARBOSA, E. A.; PRATES, M. V.; VERLY, R. M.; MUNHOZ, V. H. O.; ARAÚJO, I. E.; BLOCH JR., C. Conformational and Functional Effects Induced by D- and L-Amino Acid Epimerization on a Single Gene Encoded Peptide from the Skin Secretion of *Hypsiboas punctatus*. **PLOS ONE**. 2013.

MANDEL, S. M. S. **Prospecção de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de anfíbios do gênero *Phyllomedusa***. 2008 . 82f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília – UnB, Brasília, 2008.

MANGONI, M. L.; PAPO, N.; SAUGAR, J. M.; BARRA, D.; SHAI, Y. SIMMACO, M. RIVAS, L. Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H. **Biochemistry**. 45: 4266–4276, 2006.

MASELLI, V. M.; BRINKWORTH, C. S.; BOWIE, J. H.; TYLER, M. J. Host-defence skin peptides of the Australian Common Froglet *Crinia signifera*: sequence determination using positive and negative ion electrospray mass spectra. **Rapid Commun Mass Spectrom**, 18:2155–61, 2004.

MASELLI, V.; BILUSICH, D.; BOWIE, J., TYLER, M. Host-defence skin peptides of the Australian Streambank Froglet *Crinia riparia*: isolation and sequence determination by positive and negative ion electrospray mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, 20:797–803, 2006.

McDONALD, T. J.; JORNVALL, H.; NILSSON, G.; VAGNE, M.; GHATEI, M.; BLOOM, S. R.; MUTT, V. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. **Biochem Biophys Res Commun**, 90:227–33, 1979.

MIELE, R.; PONTI, D.; BOMAN, H.G.; BARRA, D.; SIMMACO, M. Molecular cloning of a bombinin gene from *Bombina orientalis*: detection of NF- $\kappa$ B and NF-IL6 binding sites in its promoter. **FEBS Letters**, 431:23-28, 1998.

MINAMINO, N.; KANGAWA, K.; MATSUO, H. Neuromedin-B: a novel bombesinlike peptide identified in porcine spinal cord. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 114: 541-548, 1983.

MOLLAY, C.; WECHSELBERGER, C.; MIGNOGNA, G.; NEGRI, L.; MELCHIORRI, P.; BARRA, D.; KREIL, G. Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. **Eur J Pharmacol**, 374:189–96. 1999.

MONTECUCCHI, P. C.; HENSCHEN, A.; ERSPAMER, V. Structure of sauvagine, a vasoactive peptide from the skin of a frog. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 360:1178, 1979.

MONTECUCCHI, P. C. Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins. **Peptides**, v. 6 Suppl 3, p. 187-95, 1985.

MONTECUCCHI, P. C.; GOZZINI, L.; ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P. Primary structure of tryptophan-containing peptides from skin extracts of *Phyllomedusa rhodei*. **Int J Pept Protein Res**, 23: 276-281, 1984.1984.

MOR A, N. V. H.; DELFOUR, A.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; NICOLAS, P. Isolation, aminoacide sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. **Biochemistry**. 30: 8824-8830, 1991.

NAGALLA, S. R.; GIBSON, B. W.; TANG, D. Z.; REEVE, J. R.; SPINDEL, E. R. Gastrin-releasing peptide (GRP) is not mammalian bombesin – identification and molecularcloning of a true amphibian GRP distinct from amphibian bombesin in *Bombina orientalis*. **J Biol Chem**. 67:6916–22, 1992.

NAKAJIMA, T.; TANIMURA, T.; PISANO, J. J. Isolation and structure of a new vasoactive peptide. **Feder. Proc.**, 29: 282, 1972.

NEGRI, L.; LATTANZI, R.; GIANNINI, E.; MELCHIORRI, P. Bv8/prokineticin proteins and their receptors. **Life Sci**, 81:1103–16, 2007.

NELSON, D. L.; COX M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. Traduzido por Arnaldo Antonio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi 3. ed. São Paulo. Sarvier, 2002.

NICOLAS, P.; AMIRI, C. E. The dermaseptin superfamily: A gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1788: 1537 – 1550, 2009.

NICOLAS, P.; VANHOYE, D.; AMICHE, M. Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. **Peptides**, 24: 1669 – 1680, 2003.

OHSAKI, Y.; GAZDAR, A. F.; CHEN, H. C.; JOHNSON, B. E. Antitumor activity of magainin analogues against human lung cancer cell lines. **Cancer Research**, 52:3534-3538, 1992.

OKADA, R.; YAMAMOTO, K.; KODA, A.; ITO, Y.; HAYASHI, H.; TANAKA, S.; HANAOKA, Y.; KIKUYAMA, S. Development of radioimmunoassay for bullfrog Thyroid-stimulating hormone (TSH): effects of hypothalamic releasing hormones on the release of TSH from the the pituitary in vitro. **General and Comparative Endocrinology**, 2003.

PIERRE, T. N.; SEON, A. A.; AMICHE, M.; NICOLAS, P. Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/opioid peptide precursors. **Eur J Biochem**, 267:370–8. 2000.

PIRES JÚNIOR, O. **Ocorrência de tetrodotoxina e derivados em três espécies de Brachycephalus (Amphibia: anura: Brachycephalidae)**. Tese, Brasília. Biologia Animal. Universidade de Brasília, 2002.

POHL, S.; DARLISON, M.G.; CLARKE, W.G.; LEDERIS, K.; RICHTER, D. Cloning and functional pharmacology of two corticotropin-releasing factor receptors from a teleost fish. **European journal of Pharmacology**, 430: 193-202, 2001.

POWERS, J. P. & HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, 24: 1681–1691, 2003.

PRATES, M. V.; FORÇA, M. L. S.; REGIS, W. C. B.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; PERTINHEZ, T. A.; ARAÚJO, A. L. T.; AZEVEDO, R. B.; SPISNI, A.; AND JR, C. B. The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 279, Nº 13: 13018 – 13026, 2004.

PRATES, M. V. **Peptídeos catiônicos de *Phyllomedusa tarsius* (Amphibia): estrutura e atividade biológica**. Dissertação (Mestrado) em Biologia Molecular. Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília, 1999.

PRATES, M. V.; BLOCH JÚNIOR, C. Peptídeos Antimicrobianos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Nov/Dez 17: 30-36, 2000.

PUKALA, T. L.; BOWIE, J. H.; MASELLI, V. M.; MUSGRAVE, I. F. & TYLER, M. J. Host-defense peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. **Natural Products Report**, 23: 368–393, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Pharmacology**. Churchill Livingstone, a division of Copyright Harcourt Publishers Limited, 2000.

RENDA, T.; D'ESTE, L.; BUFFA, R.; USELLINI, L.; CAPELLA, C.; VACCARO, R.; MELCHIORRI, P. Tryptophyllinlike immunoreactivity in rat adenohypophysis. **Peptides**, 6:197–202, 1985.

RINALDI, A. C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. **Current Opinion in Chemical Biology**, 6: 799–804, 2002.

ROLLINS-SMITH, L. A. The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1788: 1593-1599, 2009.

ROLLINS-SMITH, L. A.; CONLON, J. M. Review Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. **Developmental and Comparative Immunology**. 29: 589 – 598, 2005.

ROLLINS-SMITH, L.A.; DOERSAM, J.K.; LONGCORE, J.E.; TAYLOR, S.K.; SHAMBLIN, J.C.; CAREY, C.; ZASLOFF, M.A. Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. **Developmental & Comparative Immunology**, 26:63-72, 2002.

SAMGINA, T. Y. et al. Mass spectrometric study of bradykinin-related peptides (BRPs) from the skin secretion of Russian ranid frogs. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 25, n. 7, p. 933-40, Apr 15 2011.

SANDBERG, K.; JI, H. Comparative analysis of amphibian and mammalian angiotensin receptors. **Comparative Biochemistry and Physiology (CBP)**, Part A, 128:53-75, 2001.

SEBBEN, A.; SCHWARTZ, C. A.; CRUZ, J. S. A defesa química dos anfíbios. **Ciência Hoje**, 15: 25-33, 1993.

SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; LANGONE, J. A.; GARCIA, P. C. A. Brazilian Amphibians: List of Species. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, nº 2, 2014.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers**, 66: 236-48. 2002.

SHAW, C.; McKAY, D.M.; HALTON, D.W.; THIM, L.; BUCHANAN, K.D. Isotop and primary structure of an amphibian neurotensin. **Regulatory Peptides**, 38:23-31, 1992.

SIMON T. STEINBORNER, C. G., MARK J. RAFTERY, RUSSELL J. WAUGH, THOMAS BLUMENTHAL, JOHN H. BOWIE, JOHN C. WALLACE AND MICHAEL J. TYLE. The Structures of Four Tryptophyllin and Three Rubellidin Peptides from the Australian Red Tree Frog *Litoria rubella*. **Aust. J. Chem**, v. 47, p. 2099-2108, 1994.

SLIVKOFF, M. D.; WARBURTON, S. J. An endocrinological update in toads: disparity between the cardiovascular effects of two angiotensin II analogs. **General and Comparative Endocrinology**, 132:125-132, 2003.

STEINBORNER, S. T.; WABNITZ, P. A.; WAUGH, R. J.; BOWIE, J. H.; GAO, C. W., TYLER, M. J.; WALLACE, J. C. The structures of new peptides from the Australian red tree frog '*Litoria rubella*'. The skin peptide profile as a probe for the study of evolutionary trends of amphibians. **Aust J Chem**. 49:955–63, 1996.

TERRENI, A.; NOSI, D.; GREVEN, H.; DELFINO, G. Development of serous cutaneous glands in *Scinax nasica* (Anura, Hylidae): patterns of poison biosynthesis and

maturation in comparison with larval glands in specimens of other families. **Tissue Cell**, v. 35, n. 4, p. 274-87, Aug 2003.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. REVIEW Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Camp. Biochem. Physiol.** Vol. IIIA, No. I, pp. 1 – 29, 1995.

TSUSHIMA, H.; MORI, M.; FUJIWARA, N.; MORIYAMA, A. Pharmacological characteristics of bombesin receptor mediating hypothermia in the central nervous system of rats. **Brain Research**, 969: 88-94, 2003.

VANHOYE, D.; BRUSTON, F.; NICOLAS, P.; AMICHE, M. Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. **European Journal of Biochemistry**, 270: 2068-81, 2003.

VON EULER, U. S.; GADDUM, J. H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. **Journal Physiology (Lond.)**, 72: 74-87, 1931.

XIAO, D.; QU, X.; WEBER, H. C. Activation of extracellular signal-regulated kinase mediates bombesin-induced mitogenic responses in prostate cancer cells. **Cellular Signalling**, 15: 945-953, 2003.

YANG, Y.; YAO, K.; LI, Z. Similarities of SP-, NKA- and NKB-induced currents in rat dorsal root ganglion neurons. **Brain Research**, 991:18-25, 2003.

YASUHARA, T.; NAKAJIMA, T. Occurrence of Pyr-His-Pro-NH<sub>2</sub> in the frog skin. **Chem Pharm Bull**, 23:3301–3, 1975.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, 55: 27–55. 2003.

ZASLOFF, M. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, 4:3-7. 1992.

ZETLER, G. Caerulein and analogues: neuropharmacological properties. **Peptides**, 6: 33-46, 1985.

**CAPÍTULO I****CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE PEPTÍDEOS  
DA SECREÇÃO CUTÂNEA DO ANURO**  
*Hypsiboas boans*

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE PEPTÍDEOS DA SECREÇÃO CUTÂNEA DO  
ANURO *Hypsiboas boans*

\*Souza, B. B. P., \*\*\*Cardozo Fh, J. L., \*\*\*Barbosa, E. A., \*\*\*\*Prates, M. V., \*\*Costa, T. O.  
G., \*\*\*\*Bloch Jr., C. \*Fantin, C.

\*Universidade do Estado do Amazonas; \*\* Universidade Federal do Amazonas;  
\*\*\*Universidade de Brasília; \*\*\*\*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Recursos  
Genéticos e Biotecnologia

## Resumo

A pele dos anuros é uma fonte rica de diversas substâncias biologicamente ativas, como aminas biogênicas, alcalóides, esteroides, peptídeos e proteínas. Nas últimas décadas uma quantidade admirável de estudos têm sido realizados visando ao conhecimento da constituição química das secreções cutâneas dos anuros. Os peptídeos são alvos de muitas investigações devido às potenciais atividades biológicas de que são dotados. Constituem parte do sistema imune inato dos anuros, sendo, portanto, potencialmente ativos contra uma larga variedade de microrganismos patogênicos e especificamente utilizados em estratégias defensivas contra predadores. A espécie *Hypsiboas boans* pertencente a família Hylidae, uma das famílias mais estudadas no que tange ao conhecimento das secreções cutâneas de anuros, não teve até o presente momento nenhum estudo realizado com suas secreções. Assim, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar peptídeos bioativos da secreção cutânea de *Hypsiboas boans*. Foram coletados 20 espécimes de *H. boans* na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Am. Destes espécimes as secreções cutâneas foram obtidas por estimulação elétrica, congeladas, filtradas e purificadas. O perfil peptídico de *H. boans* mostrou uma grande diversidade de moléculas com potenciais atividades biológicas. Sete peptídeos foram caracterizados a partir do uso das técnicas de purificação por RP-HPLC, sequenciamento *de novo* por Espectrometria de Massa e Degradação de Edman e por sequenciamento dos genes codificadores dos peptídeos precursores por análise de cDNA.

## 1 INTRODUÇÃO

A história natural dos anfíbios é marcada por diversas adaptações comportamentais, fisiológicas e morfológicas muito particulares se considerada a natureza ambivalente do grupo, transitando por ambientes aquáticos e terrestres ao longo da evolução (BARRA & SIMMACO, 1995; NASCIMENTO *et al.*, 2003). Ante as hostilidades naturais dos contextos biológicos nos quais estão inseridos, os anfíbios dispõem de um peculiar sistema defensivo fomentado por um sistema glandular responsável pela elaboração e liberação de secreções ricas em moléculas biologicamente ativas, tais como alcalóides, aminas biogênicas, e peptídeos, os quais são dotados de um largo espectro farmacológico (BRAND *et al.*, 2002). As décadas recentes renderam um montante admirável de estudos científicos visando ao conhecimento da constituição química dos componentes liberados nas secreções cutâneas dos

anfíbios e suas respectivas atividades biológicas. Os peptídeos constituintes da secreção foram, e ainda o são, objeto de exaustiva investigação devido às potenciais atividades biológicas de que são dotados.

Os peptídeos bioativos das secreções de anuros são considerados como um dos principais fatores de sucesso evolutivo do grupo. Dentre as atividades biológicas apresentadas por peptídeos de anuros, são destacadas na literatura, atividades contra fungos patogênicos, bactérias gram-positivas e gram-negativas (MOR et al., 1991; BOMAN, 1991; BATISTA, 1999; ABDEL-WAHAB et al., 2008; PRATES et al., 2004), atividades anti-tumorais (CRUCIANI et al., 1991; BAKER et al., 1993), hipotensora e vasodilatadora (BRAND et al., 2006), anti-*Trypanosoma cruzi* (BRAND et al., 2002), analgésica (NEGRI et al., 1992), inibitória de proteases (GEBHAD et al., 2004), entre outras. Conforme mostrado por Magalhães (2011), essas substâncias podem funcionar como protetores iniciais na defesa dos anfíbios, por exemplo, em virtude das suas características químico-sensoriais, sugerindo o papel de alguns peptídeos nas estratégias defensivas dos anfíbios contra predadores. Em função destas características químico-sensoriais, os animais podem apresentar gosto, odor repelente, e propriedades adesivas que interferem na ingestão pelo predador, podendo causar náuseas, perda de consciência e de coordenação e eventual morte (NEUWIRTH et al., 1979; DUELLMAN, 1986; PRATES, 2003).

*Hypsiboas boans*, que até o presente momento, segundo a literatura, não teve suas secreções estudadas, apresenta um perfil peptídico diverso com potenciais atividades biológicas. Dentre dezenas de moléculas isoladas a partir de *H. boans* relatamos 7 novos peptídeos caracterizados por meio de purificação por Cromatografia Líquida de Alta Performance em Fase Reversa (RP-HPLC), Espectrometria de Massa por Tempo de Voo acoplada à Ionização Dessortiva de Matriz por Laser (MALDI-TOF-TOF-MS/MS), Sequenciamento N-terminal por degradação automatizada de Edman, e sequenciamento dos genes codificadores dos peptídeos precursores a partir de construção de biblioteca de cDNA.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta de anfíbios e extração de secreção cutânea**

Vinte indivíduos adultos de *Hypsiboas boans* foram coletados manualmente às margens do Igarapé Tinga na Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus - AM, conforme licença cedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) de número 41722-1. As

secreções de *H. boans* foram obtidas por estimulação elétrica (6Volts) das glândulas serosas da pele, coletadas em água purificada (Milli - Q), congeladas a -80°C e liofilizadas.

## 2.2 Purificação dos peptídeos

O extrato liofilizado foi solubilizado em 10 mL de H<sub>2</sub>O purificada (Milli - Q), centrifugado a 13000 RPM, filtrado em filtro de 22 µm (Millipore) e fracionado por RP-HPLC utilizando coluna semipreparativa (Jupiter 4µ Proteo, C<sub>12</sub>, 90A, 250 x 10 mm (Phenomenex) e coluna analítica (Kromasil C<sub>18</sub>, 150 x 10mm), acoplada a sistema cromatográfico HPLC Prominence (Shimadzu Corporation, Japão). Os peptídeos foram eluídos em H<sub>2</sub>O (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos contendo 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA), em gradiente linear segmentado: 5% (0 a 9 min); 5 a 15% (9 a 15 min); 15 - 65% (15 a 65 min) e 65 - 95% (65 a 75 min) de solvente B. A eluição dos peptídeos foi monitorada nos comprimentos de ondas de 216 e 280 nm e as frações foram coletadas manualmente, liofilizadas e posteriormente analisadas por espectrometria de massa.

## 2.3 Sequenciamento e determinação da massa molecular monoisotópica dos peptídeos

A massa molecular monoisotópica e a sequência de aminoácidos dos peptídeos purificados foram determinadas por espectrometria de massa em espectrômetro Ultra Flex III MALDI-TOF<sup>2</sup> (Bruker Daltonics). O espectrômetro foi operado no modo linear e refletido para a aquisição dos espectros MS e MS/MS adquiridos no modo LIFT<sup>TM</sup>. O sequenciamento dos peptídeos foi realizado por interpretação manual dos espectros MS/MS usando o programa FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics). As informações complementares para determinação dos resíduos de aminoácidos K/Q e L/I foram obtidas por meio do sequenciamento N-terminal por degradação de Edman em sequenciador automático de proteínas/peptídeos PPSQ-23 (Shimadzu Co., Japan) conforme recomendações do fabricante e por sequenciamento de cDNA.

## 2.4 Construção da biblioteca de cDNA a partir do tecido cutâneo de *H. boans*

A pele de *H. boans* previamente extraída e congelada foi pulverizada em nitrogênio líquido. Aproximadamente 10 mg da pele pulverizada foram utilizados para extração do RNA total utilizando o reagente Trizol (Invitrogen). A integridade e a quantificação do RNA foram analisadas respectivamente por eletroforese em gel de agarose 1% e por espectrofotometria. A síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada conforme protocolo estabelecido

anteriormente (BRAND et al., 2006). Os ciclos térmicos realizados para as PCRs foram: pré-aquecimento a 95 °C/120s, 4 ciclos de 95 °C/60s, 68 °C/60s e 72 °C/150s e 29 ciclos de 94 °C/30s, 68 °C/30s e 72 °C/60s. Posteriormente, alíquotas de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para análise dos fragmentos amplificados, onde os fragmentos entre 300 a 400pb foram isolados, purificados e ligados em vetores conforme protocolo estabelecido (BRAND et al., 2006). Os plasmídeos de interesse foram isolados e submetidos ao sequenciamento automático de nucleotídeos, realizado pela empresa MACROGEN. As sequências foram analisadas utilizando o software EditSeq (DNASTAR).

## 2.5 Análise e alinhamento das sequências nucleotídicas e peptídicas

As sequências nucleotídicas e peptídicas foram alinhadas com sequências depositadas no banco de dados GeneBank, utilizando os algoritmos Blastn e Blastp, para análise da identidade e similaridade entre as sequências. As sequências também foram alinhadas pelo CLUSTALW, utilizando o software BioEdit.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Purificação e elucidação da estrutura primária dos peptídeos

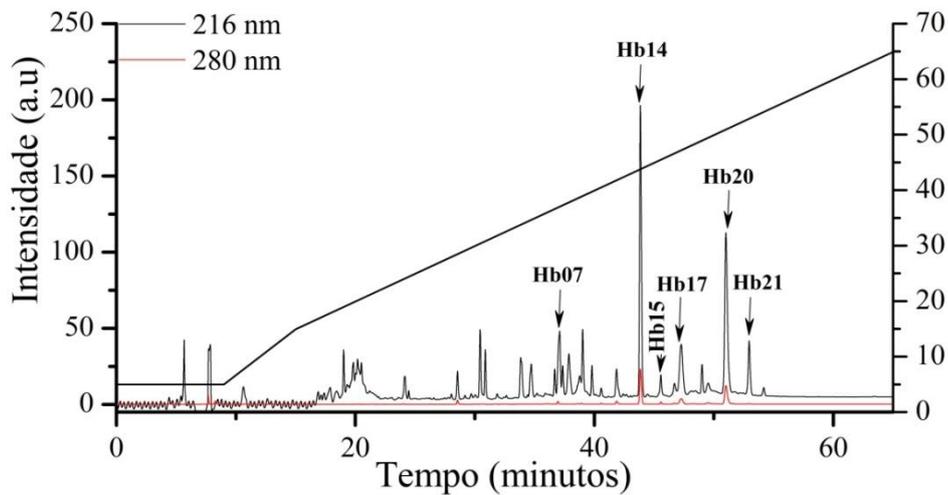
O perfil cromatográfico da secreção cutânea de *H. boans* mostrou uma grande diversidade de peptídeos. As frações majoritárias foram nomeadas de Hb01 a Hb22 (figura 1) e as frações Hb07, Hb14, Hb15, Hb17, Hb20 e Hb21 foram recromatografadas em RP-HPLC utilizando coluna analítica a fim de se obter maior homogeneidade dos peptídeos isolados para posterior sequenciamento por espectrometria de massa e por degradação de Edman. Cada peptídeo obtido das frações foi nomeado conforme o nome de suas referidas frações.

#### Hb07

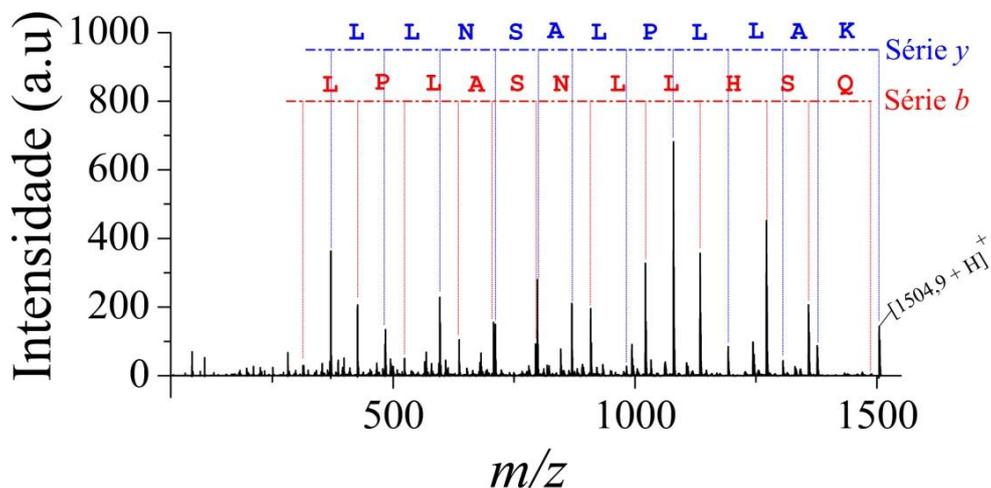
A fração Hb07 após ser recromatografada em coluna analítica, apresentou dois peptídeos que eluem no mesmo tempo de retenção e mesma concentração de ACN. Os peptídeos foram denominados Hb07a e Hb07b cujas massas monoisotópicas determinadas por MS foram  $[M+H]^+ = 1389,8$  Da e  $[M+H]^+ = 1504,9$  Da, respectivamente. O sequenciamento por MS/MS permitiu elucidar parte da estrutura primária de Hb07a (dados não mostrados) e toda a estrutura primária de Hb07b (figura 2). A fração Hb07, contendo os dois peptídeos, foi submetida ao sequenciamento N-terminal por degradação de Edman confirmando as

sequências obtidas por MS/MS, sendo Hb07a um peptídeo com 13 resíduos de aminoácidos, cuja sequência é **GLMDMLKEVGKVA-NH<sub>2</sub>** e Hb07b um peptídeo com 14 resíduos de aminoácidos cuja sequência é **KALLPLASNLLHSQ-OH**.

**Figura 1-** Cromatograma do perfil peptídico da secreção de *H.boans*. Cromatografia realizada em coluna semipreparativa, com gradiente segmentado de 5 a 95% de ACN com 0,1% de TFA.



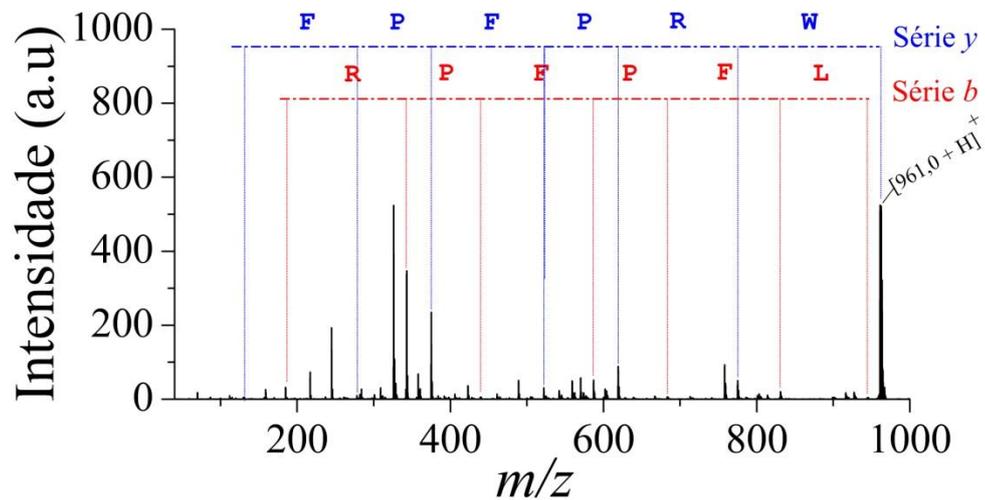
**Figura 2 -** Hb07b sequenciado por MS/MS em MALDI-TOF-TOF e submetido posteriormente ao sequenciamento *de novo* por degradação de Edman.



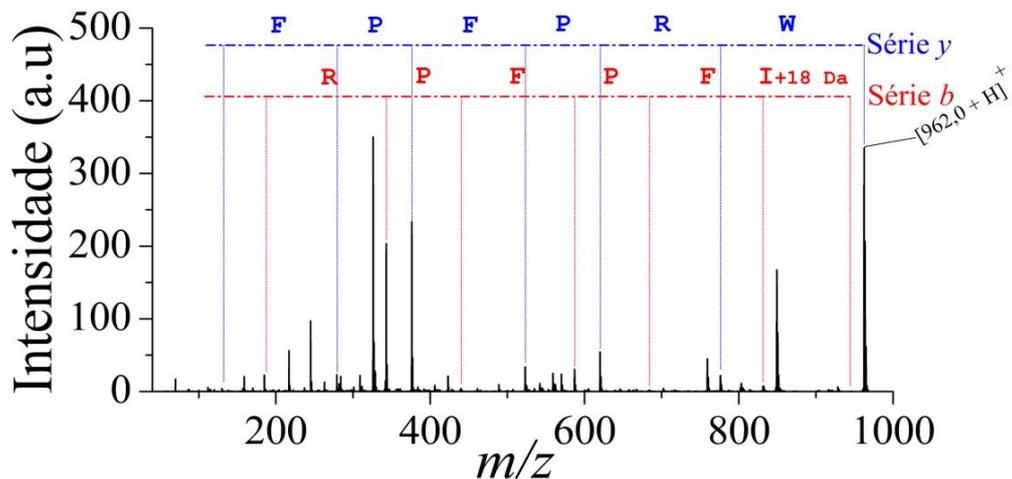
### Hb14 e Hb15

As sequências de Hb14 e Hb15 foram elucidadas por MS/MS e confirmadas posteriormente pelo sequenciamento dos genes codificadores dos respectivos peptídeos. Ambos, possuem a mesma sequência de 7 resíduos de aminoácidos, porém, Hb14 apresenta amidação C-terminal (**WRPFPF<sub>L</sub>-NH<sub>2</sub>**) e massa monoisotópica  $[M+H]^+ = 961,5$  Da (figura 3), enquanto Hb15 apresenta C-terminal carboxilado (**WRPFPF<sub>L</sub>-OH**) e massa molecular monoisotópica é  $[M+H]^+ = 962,5$  Da (figura 4).

**Figura 3** - Hb14 sequenciado por MS/MS e posteriormente confirmado por sequenciamento do gene codificador do pré-pró-peptídeo. A perda de 17 Da na região do íon parental evidencia a presença do grupo NH<sub>2</sub> ligado ao C-terminal.



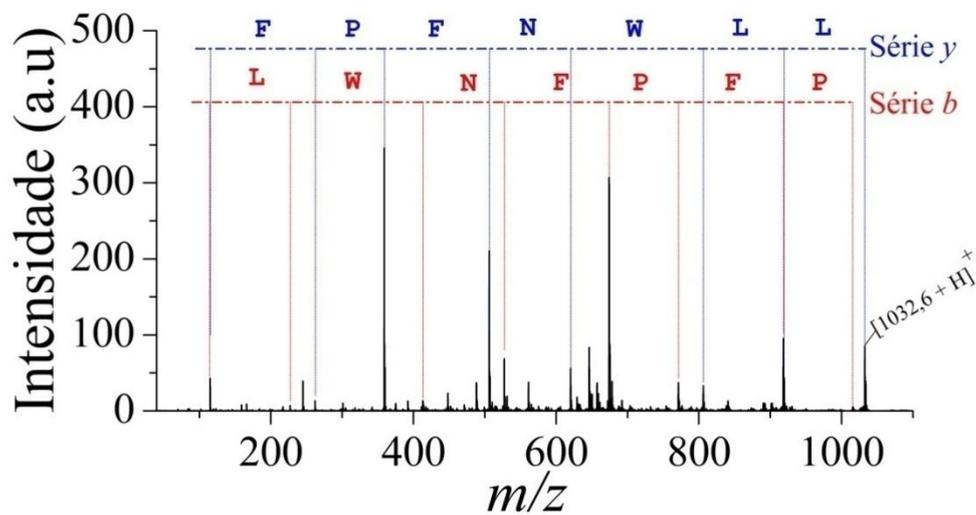
**Figura 4** - Hb15 sequenciado por MS/MS e posteriormente confirmado por sequenciamento do gene codificador do pré-pró-peptídeo. A perda de 18 Da na região do íon parental evidencia a presença do grupo OH ligado ao C-terminal.



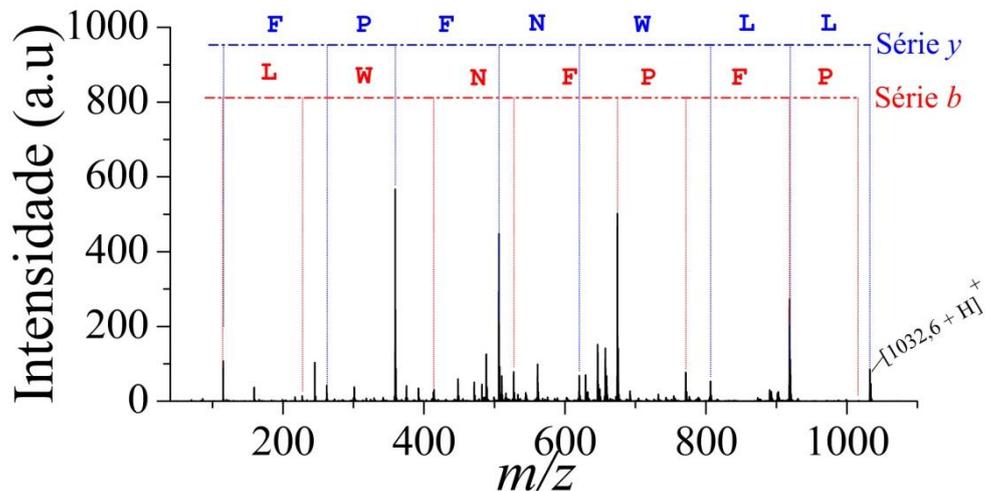
### Hb17 e Hb20

As seqüências de Hb17 e Hb20 foram determinadas por MS/MS (figura 5 e 6, respectivamente) e confirmadas pelo sequenciamento do gene codificador do pré-pró-peptídeo (figura 8). Ambos, apesar de eluírem em tempos de retenção e em concentrações de acetonitrila diferentes (figura 1), apresentam a mesma massa monoisotópica  $[M+H]^+ = 1032,6$  Da. A estrutura primária dos peptídeos é **LLWNFPFP-NH<sub>2</sub>**.

**Figura 5** - Hb17 sequenciado por MS/MS e posteriormente confirmado por sequenciamento do gene codificador do pré-pró-peptídeo. A perda de 17 Da na região do íon parental evidencia a presença do grupo NH<sub>2</sub> ligado ao C-terminal.

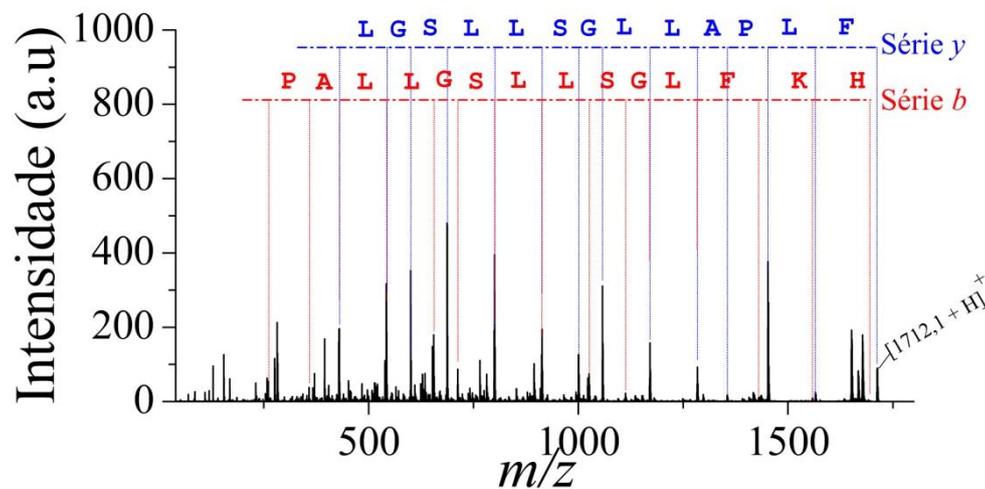


**Figura 6** - Hb20 sequenciado por MSMS e posteriormente confirmado por sequenciamento do gene codificador do pré-pró-peptídeo. A perda de 17 Da na região do íon parental evidencia a presença do grupo NH<sub>2</sub> ligado ao C-terminal.



A sequência **FLPALLGSLLSGLFKH-NH<sub>2</sub>** do Hb21 ( $[M+H]^+ = 1712,1$  Da) foi determinada por MS/MS (figura 7) e confirmada pelo sequenciamento do gene codificador do seu respectivo pré-pró-peptídeo.

**Figura 7** - Hb21 sequenciado por MSMS e posteriormente confirmado por sequenciamento do gene codificador do pré-pró-peptídeo. A perda de 18 Da na região do íon parental evidencia a presença do grupo NH<sub>2</sub> ligado ao C-terminal.



### 3.2 Análise e alinhamento das sequências nucleotídicas e peptídicas

A partir da construção da biblioteca de cDNA foi possível confirmar as sequências peptídicas das frações que apresentavam ambiguidades quanto aos resíduos K/Q e L/I e que não foram elucidadas por degradação de Edman.

As sequências nucleotídicas e peptídicas foram submetidas a buscas por identidade e similaridade e alinhadas com sequências depositadas nos bancos de dados. Apenas para o peptídeo Hb21 houve alinhamento, cuja identidade da sequência nucleotídica foi acima de 90% e similaridade da sequência foi de 70,5% com peptídeos pertencentes à classe filoseptina (figura 8), um grupo de PAMs que só foi descrito nos gêneros *Phyllomedusa* e *Hylomantis* (LEITE et al., 2005 & CONLON et al., 2007). No entanto, a classificação de Hb21 como pertencente à filoseptina necessita ainda de outros experimentos, tais como, determinação de estruturas secundárias e atividade biológica, que nos permitam fazer tal afirmação de forma conclusiva.





catiônico, um grande número de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, assim como elevado momento hidrofóbico e resíduos não polares. Os mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos agem ainda não são totalmente conhecidos, mas se sabe que a disposição dos resíduos de aminoácidos ao longo da cadeia, elevada hidrofobicidade, cargas positivas, momento hidrofóbico, resíduos L-aminoácidos e formação de estrutura secundária hélice  $\alpha$  anfipática são indícios que constituem peptídeos com atividade antimicrobiana (HANCOCK & CHAPPLE, 1999; ZASLOFF, 2002; BROGDEN, 2005; CONLON et al., 2005 e 2007).

A estruturação da molécula em hélice  $\alpha$  anfipática favorece a interação entre os peptídeos e a estrutura anfifílica das membranas biológicas (DATHE & WIEPRECHT, 1999). Esta estrutura parece ser mais favorecida em Hb07b e Hb21 (figura 9) enquanto em Hb07a a hélice  $\alpha$  é menos enovelada, o que pode ser explicado pelo menor número de resíduos de aminoácidos e pela presença de consecutivos resíduos de aminoácidos com grupos R longos ou volumosos, que impedem a aproximação suficiente uns dos outros para formação de hélice firmemente enovelada (COX et al., 2012). Entretanto, a predição para formação de hélice  $\alpha$  em Hb07a pode ser explicada pela presença próxima dos resíduos D, E e K com cadeias laterais com cargas opostas que favorecem a estabilização desse tipo de estrutura mediante a formação de pares iônicos (COX et al., 2012). Além disso, com exceção dos peptídeos Hb07b e Hb15, todos os outros peptídeos apresentam o grupamento  $\text{NH}_2^+$  ligado ao C-terminal, como resultado de processamento pós-traducional. Este tipo de processamento altera a distribuição eletrônica da molécula, onde a carga negativa do carboxilato ( $\text{COO}^-$ ) é substituída pelo grupamento carboxiamida ( $\text{NH}_2^+$ ). Acredita-se que o principal efeito da amidação, seja a modulação da atividade biológica dos peptídeos em virtude da estabilização da estrutura hélice  $\alpha$ , por fornecer uma ponte de hidrogênio adicional (WHITE & WIMLEY, 1999; SHALEV et al., 2002). A presença, portanto, de amidação em Hb07a e Hb21 favorece também a helicidade, propriedade que está também relacionada à toxicidade para células compostas por fosfolipídios neutros (YEAMAN & YOUNT, 2003).

Hb21, apesar de apresentar características de filoseptinas (LEITE et al., 2005), que são peptídeos antimicrobianos, não pode ser ainda classificado como tal, sem que as demais características que classificam as filoseptinas sejam elucidadas.

Já nos demais peptídeos (Hb14, Hb15, Hb17 e Hb20) a estrutura secundária definida é pouco provável, primordialmente devido ao curto tamanho da cadeia peptídica, que determina a assunção de estruturas randômicas por esses peptídeos quando em solução, de tal modo que não pudessem ser preditas pelo o algoritmo HeliQuest.

É interessante observar que, no cromatograma (figura 1), o peptídeo Hb14 (**WRPF<sub>2</sub>PFL-NH<sub>2</sub>**) é majoritário frente ao Hb15 (**WRPF<sub>2</sub>PFL-OH**). As razões que levam a prevalência por amidação deste peptídeo ainda não podem ser totalmente explicadas, mas conforme já discutido, a amidação pode modular atividade biológica em virtude de arranjos diferentes que o grupo NH<sub>2</sub><sup>+</sup> pode proporcionar, modificando as propriedades das moléculas primárias, alterando a estabilidade, as interações com os receptores ou com outras proteínas, a solubilidade, bem como alteração de transdução de sinal (KREIL, 1997).

Hb14, Hb15, Hb17 e Hb20, apresentam características em comum quanto à presença de resíduos hidrofóbicos e aromáticos (W, P, L e F). De todo o perfil peptídico da espécie, estes peptídeos (com exceção de Hb15) são majoritários nas secreções cutâneas de *H. boans*. Roudot-Algaron (1996), em estudo com peptídeos de diversas fontes naturais, detectou vários peptídeos com sabores amargos e concluiu que todos esses peptídeos são ricos em leucina, isoleucina e fenilalanina, este último, com presença constante nos peptídeos, é considerado o aminoácido central na predição do sabor amargo. Ishibashi e colaboradores (1988) verificaram que anéis hidrofóbicos presentes em alguns aminoácidos funcionam como um sítio de ligação para receptores de amargor, e grupamentos guanidínicos, como os presentes em arginina, atuam como uma unidade estimuladora, sugerindo, portanto, que o sabor amargo, se manifesta quando estas duas situações ocorrem, as quais podem ser vistas nos peptídeos Hb14 (**WRPF<sub>2</sub>PFL-NH<sub>2</sub>**), Hb15 (**WRPF<sub>2</sub>PFL-OH**), Hb17 (**LLWNFPFP-NH<sub>2</sub>**) e Hb20 (**LLWNFPFP-NH<sub>2</sub>**), que possuem os grupos guanidínicos referentes aos resíduos de aminoácidos R, F, P e L, e anéis hidrofóbicos, além de possuírem o resíduo polar não carregado asparagina (N), que segundo Nei et al (2008) é uma característica também determinante no sabor amargo.

O amargor inerente às moléculas secretadas na pele dos animais é um dos fatores associados a impalatabilidade. Muitos estudos têm demonstrado que uma diversidade de anfíbios e girinos são impalatáveis aos predadores, o que está intimamente relacionado à referida característica (MADISON et al., 2002; TAYLOR et al., 2003; DARST e CUMMINGS, 2006; MAGALHÃES, 2011). Em *H. boans* já foi descrito que os girinos são impalatáveis aos peixes (LIMA, 2008). Sobre os indivíduos adultos não existem relatos a respeito da impalatabilidade, precisamente pela ausência de estudos realizados com a espécie. No entanto, a presença majoritária destes peptídeos na secreção, bem como a expressão elevada dos seus precursores, revelam a grande importância destas moléculas para este anfíbio, seja por demanda relacionada à predação, onde *H. boans* se utiliza de um sistema

defensivo baseado nas características químico-sensoriais das moléculas de suas secreções ou seja por qualquer outra atividade biológica que estas exercem.

Portanto, do ponto de vista químico-sensorial, estes peptídeos (Hb14, Hb15, Hb17 e Hb20) são fortes candidatos a apresentarem amargor, quando se considera a existência de características fundamentais que conferem o sabor às moléculas.

Hb17 e Hb20 apresentam a mesma sequência peptídica com a mesma modificação pós-traducional (amidação), no entanto, eluem em tempo e concentrações de acetonitrila diferentes, o que pode ser explicado pela presença de isomeria Cis-Trans ou pela presença de um ou mais resíduos de D-aminoácidos.

Apesar de esta configuração ser mais rara, alguns estudos já descreveram a presença de D-aminoácidos em anfíbios (MANGONI et al., 2006; BARRA et al., 1994.; MAGALHÃES et al., 2013). Magalhães e colaboradores (2013), isolaram e caracterizam um peptídeo de *H. punctatus*, denominando Fenilseptina e concluíram que este peptídeo existe naturalmente nas duas configurações, D e L-aminoácidos. As distintas configurações modulam atividades biológicas também distintas, o que foi observado ainda por Magalhães e colaboradores, quando testadas as atividades antimicrobianas dos referidos peptídeos. Apesar da diferença na atividade antimicrobiana, os dois peptídeos D e L-Fenilseptina apresentam amargor, e provocam aversão nos animais testados, sugerindo, portanto, que estas moléculas podem atuar em estratégias defensivas contra predadores.

## 5 CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou parte de um perfil de peptídeos da secreção cutânea de *H. boans*, espécie que não teve até o momento nenhum estudo relatado quanto à composição, caracterização e atividade biológica de suas moléculas. A caracterização destes peptídeos fornece diversas informações a respeito da biologia de *H. boans*, como, o motivo de o animal produzir tais moléculas, o compartilhamento de características em comum com outras espécies, a finalidade destas moléculas para o próprio anfíbio diante dos contextos em que está inserido, bem como auxilia na caracterização da espécie do ponto de vista da quimiotaxonomia. A respeito das análises feitas, cabe ressaltar que nenhuma das atividades biológicas discutidas podem ser afirmadas para estas moléculas sem que sejam sintetizadas e devidamente testadas. Outros estudos são necessários para finalizar a caracterização desde a constituição química até as finalidades biológicas destas moléculas para o animal, podendo,

portanto, servir como modelo para compreensão sobre síntese, processamento e atividade biológica de peptídeos.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, Y. H. A.; POWER, G. J.; FLATT, P. R.; WOODHAMS, D. C.; ROLLINS-SMITH, L. A.; CONLON, J. M. A peptide of the phylloseptin family from the skin of the frog *Hylomantis lemur* (Phyllomedusinae) with potent in vitro and in vivo insulin-releasing activity. **Peptides**, 29: 2136 – 2143, 2008.
- BAKER, M. A.; MALOY, W. L.; ZASLOFF, M.; JACOB, L. S. Anticancer of magainina 2 and analogue Peptides. **Cancer Research**, 53: 3052-3057, 1993.
- BATISTA, C. V. F.; ROSENDO DA SILVA, L. A.; SEBBEN, A.; SCALONI, FERRARA, L.; PAIVA, G.R.; OLAMENDI–PORTUGAL, T.; POSSANI L.D.; BLOCH JR, C. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. **Peptides**, 20: 679–686, 1999.
- BARRA, D.; MIGNOGNA, G.; SIMMACO, M.; PUCCI, P.; SEVERINI, C.; FALCONIERI–ERSPAMER, G.; NEGRI, L.; ERSPAMER, V. [D-eu2] deltorphin, a 17 amino acid opioid peptide from the skin of the Brazilian hylid frog, *Phyllomedusa burmeisteri*. **Peptides**, 15: 199–202, 1994.
- BARRA, D. & SIMMACO, M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. **Trends in Biotechnology**, 13: 205–209, 1995.
- BOMAN, H. G. Antibacterial Peptides: Key components needed in immunity, **Cell**, Vol. 65, 205-207, April 19, 1991.
- BRAND, D. G.; LEITE, J. R. S. A.; MANDEL, S. M. S.; MESQUITA, D. A.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; BARBOSA, E. A.; VINECKY, F.; MARTINS, G. R.; GALASSO, J. H.; KUCKELHAUS, S. A. S.; SAMPAIO, R. N. R.; JUNIOR, J. R.; ANDRADE, A. C.; JUNIOR, C. B. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 347: 739–746, 2006.
- BRAND, G. D.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; ALBUQUERQUE, S.; PRATES, M. V.; AZEVEDO, R. B.; CARREGARO, V.; SILVA, J. S.; SÁ, V. C. L.; BRANDÃO, R. A.; BLOCH JUNIOR, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. **The Journal of Biological Chemistry**, 277:49332-49340, 2002.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, 3: 238–250, 2005.
- CONLON, J. M.; ABRAHAN, B.; GALADARI, S; KNOOP, F. C.; SONNEVEND, A. & PÁL, T. Antimicrobial and cytolytic properties of the frog skin peptide, kassinatuerin-1 and its L- and D-lysine-substituted derivatives. **Peptides**, 26: 2104–2110, 2005.
- CONLON, J. M.; AL-GHAFFERI, N.; ABRAHAN, B. & LEPRINCE, J. Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. **Methods**, 42: 349–357, 2007.
- CONLON, J. M.; WOODHAMS, D. C.; RAZ, H., COQUET, L.; LEPRINCE, J.; JOUENNE, T., VAUDRY, H.; ROLLINS-SMITH, L. A. Peptides with differential cytolytic activity from

skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). **Toxicon**, v. 50, p. 498-506, 2007.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. *Biologia Molecular* [recurso eletrônico]: princípios e prática. Tradução: Gaby Renard. Porto Alegre: **Artmed**, 2012.

CRUCIANI, R. A.; BARKER, J. L.; ZASLOFF, M.; CHEN, H. C. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88:3792-3796, 1991.

DARST, C. R.; CUMMINGS, M. E. Predator learning favours mimicry of a less-toxic model in poison frogs. **Nature** [S.I.], v. 440, n. 7081, p. 208-11, 2006.

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1462: 71–87, 1999.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. New York: McGraw-Hill Book Company Publ. 228 p., 1986.

GEBHARD, L. G.; CARRIZO, F. U.; STERN, A. L.; BURGATDT, N. L.; FAIVOVICH, J.; LAVILLA, E.; ERMÁCORA, M. R. A Kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of *Phyllomedusa sauvagii*. **Eur. J. Biochem.** v. 271, p. 2117–26, 2004.

HANCOCK, R. E. W. & CHAPPLE, D. S. Peptides Antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43: 1317–1323, 1999.

ISHIBASHI, N.; KUBO, T.; CHINO, M.; FUKUI, H.; SHINODA, I.; KIKUCHI, E.; OKAI, H.; FUKUI, S. Taste of prolinecontaining peptides. **Agric. Biol. Chem.** [S.I.], v. 52, n. 3, 1988.

KREIL, G. D-amino acids in animal peptides. **Annu Rev Biochem** [S.I.], v. 66, p. 337-45, 1997.

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

LIMA, A. P.; MAGNUSSON, W. E.; MENIN, M.; ERDTMAN, L. K.; RODRIGUES, D. J.; KELLER, C.; HODI, W. **Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke**, Amazônia Central. Áttema Design Editorial, 168p, 2008.

MADISON, D. M.; SULLIVAN, A. M.; MAERZ, J. C.; MCDARBY, J. H.; ROHR, J. R. A complex, crosstaxon, chemical releaser of antipredator behavior in Amphibians. **J Chem Ecol** [S.I.], v. 28, n. 11, p. 2271-82, 2002.

MAGALHÃES, M. T. Q. **Caracterização Estrutural e Funcional de Fenilseptinas: Peptídeos com atividades antimicrobiana e químico-sensorial presentes na secreção**

**cutânea de *Hypsiboas punctatus*.** Tese (doutorado) em Biologia Molecular. Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília. 2011.

MAGALHÃES, M. T. Q.; BARBOSA, E. A.; PRATES, M. V.; VERLY, R. M.; MUNHOZ, V. H. O. ; ARAÚJO, I. E.; BLOCH JR., C. Conformational and Functional Effects Induced by D- and L-Amino Acid Epimerization on a Single Gene Encoded Peptide from the Skin Secretion of *Hypsiboas punctatus*. **PLOS ONE**, 2013.

MANGONI, M. L.; PAPO, N.; SAUGAR, J. M.; BARRA, D.; SHAI, Y. SIMMACO, M. RIVAS, L. Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H. **Biochemistry**. 45: 4266–4276, 2006.

MOR A, N.V.H.; DELFOUR, A.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; NICOLAS, P. Isolation, aminoacide sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. **Biochemistry**. 30: 8824-8830, 1991.

NASCIMENTO, A. C. C.; FONTES, W.; SEBEN, A. & CASTRO, M. S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. **Protein and Peptide Letters**, 10: 227–238, 2003.

NEGRI, L.; ERSPAMER, G. F.; SEVERINI, C.; POTENZA, R. L.; MELCHIORRI, P.; ERSPAMER, V. Dermorphinrelated peptides from the skin of *Phyllomedusa bicolor* and their amidated analogs activate two  $\mu$  opioid receptor subtypes that modulate antinociception and catalepsy in the rat. **Proc. Nael. Acad. Sci. USA**. V. 89, p. 720307, 1992.

NEI, M.; NIIMURA, Y.; NOZAWA, M. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. **Nat Rev Genet** [S.I.], v. 9, n. 12, p. 951-63, Dec 2008.

NEUWIRTH, M.; DALY, J. W.; MYERS, C. W.; TICE, L. W. Morphology of the granular secretory glands in skin of poison-dart frogs (*Dendrobatidae*). **Tissue Cell** [S.I.], v. 11, n. 4, p. 755-71, 1979.

PRATES, M. V. **Peptídeos bioativos de *Hyla punctata***. (Ph.D) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília - UnB, Brasília, 2003.

PRATES, M. V.; FORÇA, M. L. S.; REGIS, W. C. B.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; PERTINHEZ, T. A.; ARAÚJO, A. L. T.; AZEVEDO, R. B.; SPISNI, A.; AND JR, C. B. The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 279, N° 13: 13018 – 13026, 2004.

ROUDOT-ALGARON, F. Le gout des acides amines, des peptides et des proteines. **Lait** [S.I.], v. 76, 1996.

SHALEV, D. E.; MOR, A.; KUSTANOVICH, I. Structural consequences of carboxyamidation of dermaseptin S3. **Biochemistry**, 41 (23): 7312-7, 2002.

TAYLOR, R. B.; LINDQUIST, N.; KUBANEK, J.; HAY, M. E. Intraspecific variation in palatability and defensive chemistry of brown seaweeds: effects on herbivore fitness. **Oecologia** [S.I.], v. 136, n. 3, p. 412-23, 2003.

WHITE, S. H.; WIMLEY, W. C. Membrane protein folding and stability: physical principles. **Annu Rev Biophys Biomol Struct** 28: 319-65, 1999.

YEAMAN, M. R. & YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, 55: 27–55. 2003.

ZASLOFF, MICHAEL. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.