

Adolfo Luis Almeida Maleski

Caracterização da secreção cutânea do anfíbio *Trachycephalus nigromaculatus* e investigação da atividade antimicrobiana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2023

Adolfo Luis Almeida Maleski

Caracterização da secreção cutânea do anfíbio *Trachycephalus nigromaculatus* e investigação da atividade antimicrobiana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr Daniel Carvalho Pimenta

São Paulo

2023

Versão corrigida

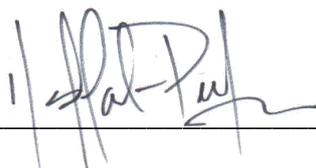
Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 16 de fevereiro, 2024.

Adolfo Luis Almeida Maleski

Aluno: Adolfo Luis Almeida Maleski

De acordo: _____



Orientador: Dr. Daniel Carvalho Pimenta

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Maleski, Adolfo Luis Almeida

Caracterização da secreção cutânea do anfíbio *Trachycephalus nigromaculatus* e investigação da atividade antimicrobiana / Adolfo Luis Almeida Maleski ; orientador(a) Daniel Carvalho Pimenta - São Paulo, 2023.

84 p. : il.

Tese (Doutorado) - Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. Linha de pesquisa: Bioproteção e desenvolvimento.

Versão corrigida final

1. Bioproteção 2. Perereca-de-capacete. 3. Proteômica. 4. Toxinologia I.
Pimenta, Daniel Carvalho. II. Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. IV. Título.

Geração por Sistema Automatizado.

Bibliotecária Bruna Marques CRB8-9303 - Responsável Técnica

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

Eu, Adolfo Luis Almeida Maleski, aluno(a) de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação de minha tese por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total desta tese após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação da tese após a data da defesa:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 20 de novembro de 2023 .

.....
Adolfo Luis Almeida Maleski

Aluno(a): Adolfo Luis Almeida Maleski

De acordo:

Orientador: Dr. Daniel Carvalho Pimenta

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS - TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

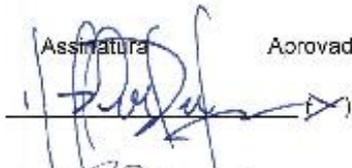
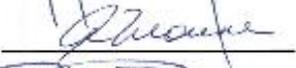
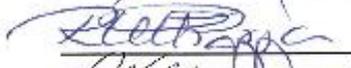
RESULTADO DA DEFESA DE TESE

DOUTORADO

NOME DO ALUNO: Adolfo Luis Almeida Maleski

DATA DO EXAME: 27/10/2023

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovado	Reprovado
Daniel Carvalho Pimenta (Presidente)		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ana Maria Moura da Silva		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Roxane Maria Fontes Piazza		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patrick Jack Spencer		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Álvaro Rossan de Brandão Prieto da Silva		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

DECISÃO FINAL: APROVADO REPROVADO

Comentários da Banca (opcional):

Rever o documento em função das comentários da banca.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Bioprospecção do veneno do anfíbio *Trachycephalus nigromaculatus* e investigação da atividade antimicrobiana", protocolada sob o CEUA nº 5670030423 (ID 003127), sob a responsabilidade de **Daniel Carvalho Pimenta e equipe; Bianca Cestari Zychar** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan de São Paulo (CEUAIB) na reunião de 26/06/2023.

We certify that the proposal "Exploring the Potential of *Trachycephalus Nigromaculatus* Venom: A Bioprospecting Study and Antimicrobial Actions", utilizing 52 Heterogenics mice (52 males), protocol number CEUA 5670030423 (ID 003127), under the responsibility of **Daniel Carvalho Pimenta and team; Bianca Cestari Zychar** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute of São Paulo (CEUAIB) in the meeting of 06/26/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 05/2023 a 09/2023 Área: Laboratório de Bioquímica E Biofísica

Origem: Biotério Central

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 5 a 7 semanas

Quantidade: 52

Linhagem: Swiss

Peso: 20 a 25 g

São Paulo, 05 de setembro de 2023



Luís Roberto de Camargo Gonçalves
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo



Milene Silva Tino
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo



Dedico esta tese à minha Mãe e à minha a Vó Djerba, que infelizmente não puderam estar presentes neste momento tão especial da minha vida. Elas foram as minhas maiores incentivadoras, as minhas melhores amigas e as minhas mais fiéis companheiras. Elas me ensinaram o valor do estudo, do trabalho e da perseverança. Elas me deram o amor, a força e a coragem que eu precisava para seguir em frente. Elas estão sempre no meu coração e na minha mente. Esta tese é uma homenagem a elas, que me fizeram ser quem eu sou!

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese de doutorado foi possível graças ao apoio e à colaboração de muitas pessoas e instituições, às quais eu gostaria de expressar o meu mais sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, agradeço aos meus orientadores, Dr Daniel Carvalho Pimenta e Dr Guilherme Rabelo Coelho, pela confiança, pela orientação, pelo incentivo e pela amizade que me dedicaram ao longo destes anos. Agradeço também pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Bioquímica, um ambiente de excelência acadêmica e de convivência harmoniosa.

Agradeço aos meus amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica, Laís, Kemellyn, Oscar, Daiane, Rodrigo, Jefferson, Carol, Emídio, Vincent e Mônica, pelo companheirismo, pela ajuda, pelo aprendizado e pelos momentos de descontração que compartilhamos. Vocês tornaram a minha jornada mais leve e divertida.

Agradeço aos meus colaboradores, pelo apoio técnico, científico e logístico que me proporcionaram. Agradeço também pela generosidade de compartilhar seus conhecimentos e experiências comigo.

Agradeço aos meus amigos do Instituto Butantan, Amanda, Priscila, Hugo, Letícia e João, pelo carinho, pela amizade e pelo apoio que me deram em todos os momentos. Vocês foram essenciais para a minha motivação e para o meu bem-estar.

Agradeço à minha mãe, Teresa, pela sua dedicação, pelo seu amor e pela sua presença constante na minha vida. Agradeço à minha avó, Djerba, pelo seu carinho, pela sua sabedoria e pela sua inspiração. Agradeço ao meu pai, Vladimir, pelo seu orgulho, pelo seu incentivo e pela sua confiança em mim. Agradeço às minhas tias, Laura, Rosangela e Mara, e a toda minha família, pelo seu afeto, pela sua torcida e pelo apoio.

Agradeço à CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado, que me permitiu dedicar-me integralmente à minha pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste sonho. Muito obrigado!

Este trabalho teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

" A ciência é mais do que uma escolha de carreira, é uma paixão pela exploração do desconhecido."

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

MALESKI, Adolfo Luis Almeida. **Caracterização da secreção cutânea do anfíbio *Trachycephalus nigromaculatus* e investigação da atividade antimicrobiana.** 2023. 84 p. Tese (Doutorado em Ciências - Toxinologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Trachycephalus nigromaculatus é uma perereca-de-capacete da família Hylidae, destacada pelo seu aparelho craniano adaptado para a fragmose, uma estratégia de defesa peculiar. Sua pele é notória pela abundância de glândulas de veneno, desempenhando um papel crucial na resistência contra predadores e patógenos em seu habitat natural. No entanto, a composição química do veneno e os efeitos da exposição à secreção cutânea em humanos e animais permanecem pouco compreendidos. Este estudo objetivou caracterizar a secreção cutânea, avaliar seus efeitos tóxicos e explorar a atividade antimicrobiana da secreção de *Trachycephalus nigromaculatus*. Empregamos análises cromatográficas, eletroforese em gel SDS-PAGE e espectrometria de massa para identificar as frações da secreção cutânea. A interação célula-inflamatória-epitelial foi examinada por microscopia intravital, enquanto o impacto na viabilidade celular foi avaliado pelo ensaio MTT. A atividade antimicrobiana foi testada in vitro contra *S. aureus*, *S. coli* e *C. albicans*. Os resultados revelaram uma mistura complexa na secreção cutânea de *T. nigromaculatus*, com proteínas variando de 8,5 a 77 kDa. Destacam-se hialuronidase, peroxirredoxina-6 e a toxina anntoxina. A análise MALDI-TOF indicou uma presença abundante de peptídeos. Concentrações baixas (1µg/mL) da secreção apresentaram notável atividade citotóxica (76%) contra células VERO. Na microscopia intravital, a secreção (3 µg e 30 µg) exibiu atividade tóxica relevante, causando perda de elasticidade, edema, infiltração e pontos hemorrágicos, impedindo a continuidade após 2h de injeção. Em 24 horas, sinais de necrose e infiltração foram evidentes, juntamente com um aumento na contagem de células aderidas e migradas. Esses efeitos foram observados após apenas 5 minutos de aplicação tópica. Observou-se inibição do crescimento microbiano na secreção bruta para *S. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. Pelo menos metade das frações testadas por HPLC exibiram atividade relevante. A atividade antimicrobiana foi especialmente eficaz contra bactérias gram-positivas (*S. aureus*) e gram-negativas (*S. coli*), além de apresentar notável ação antifúngica contra *C. albicans*. Esses resultados são significativos, pois representam a primeira

descrição da atividade antimicrobiana da secreção cutânea de *T. nigromaculatus*, destacando uma inibição importante contra fungos. Além disso, este estudo oferece a primeira descrição detalhada do conteúdo bioquímico da secreção cutânea, revelando uma composição singular de compostos que induzem efeitos tóxicos notáveis tanto in vivo quanto in vitro. Essas descobertas, aliadas ao distintivo aparelho ósseo na cabeça desta espécie, reforçam sua eficácia como uma eficiente arma de defesa.

Palavras-chave: *Trachycephalus nigromaculatus*. Proteômica. Secreção cutânea. Antimicrobiano. Envenenamento.

ABSTRACT

MALESKI, Adolfo Luis Almeida. **Characterization of the cutaneous secretion of the amphibian *Trachycephalus nigromaculatus* and investigation of antimicrobial activity.** 2023. 84 p. Doctoral dissertation (Doctorate degree in Sciences – Toxinology) – Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Trachycephalus nigromaculatus is a helmeted treefrog belonging to the *Hylidae* family, distinguished by its cranial apparatus adapted for phragmosis, a unique defense strategy. Its skin is notable for the abundance of poison glands, playing a crucial role in resistance against predators and pathogens in its natural habitat. However, the chemical composition of the venom and the effects of exposure to cutaneous secretion in humans and animals remain poorly understood. This study aimed to characterize the cutaneous secretion, assess its toxic effects, and explore the antimicrobial activity of *Trachycephalus nigromaculatus* secretion. We employed chromatographic analyses, SDS-PAGE gel electrophoresis, and mass spectrometry to identify the fractions of cutaneous secretion. The cell-inflammatory-epithelial interaction was examined through intravital microscopy, while the impact on cell viability was evaluated using the MTT assay. Antimicrobial activity was tested in vitro against *S. aureus*, *S. coli*, and *C. albicans*. Results revealed a complex mixture in *T. nigromaculatus* cutaneous secretion, with proteins ranging from 8.5 to 77 kDa. Noteworthy components include hyaluronidase, peroxiredoxin-6, and the toxin anntoxin. MALDI-TOF analysis indicated an abundant presence of peptides. Low concentrations (1 µg/mL) of the secretion exhibited significant cytotoxic activity (76%) against VERO cells. In intravital microscopy, the secretion (3 µg and 30 µg) displayed relevant toxic activity, causing loss of elasticity, edema, infiltration, and hemorrhagic points, preventing the experiment's continuation after 2 hours of injection. Within 24 hours, signs of necrosis and infiltration were evident, accompanied by an increase in adhered and migrated cells. These effects were observed within just 5 minutes of topical application. Inhibition of microbial growth was observed in crude secretion against *S. coli*, *S. aureus*, and *C. albicans*. At least half of the fractions tested by HPLC exhibited relevant activity. Antimicrobial activity was particularly effective against gram-positive bacteria (*S. aureus*) and gram-negative bacteria (*S. coli*), demonstrating notable antifungal action against *C. albicans*. These results are significant as they represent the first description of the antimicrobial activity of *T. nigromaculatus* cutaneous

secretion, highlighting substantial inhibition against fungi. Furthermore, this study provides the first detailed description of the biochemical content of cutaneous secretion, revealing a unique composition of compounds inducing notable toxic effects both in vivo and in vitro. These findings, coupled with the distinctive cranial apparatus of this species, reinforce its efficacy as an efficient defense mechanism.

Keywords: *Trachycephalus nigromaculatus*. Proteomics. Skin secretion. Antimicrobial. Envenomation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Morfologia de Pererecas-de-capacete.....	24
Figura 2 - Histologia da glândula de veneno de pererecas-de-capacete.	26
Figura 3 - <i>Tracycephalus nigromaculatus</i>	27
Figura 4 - Perfil de eletroforese em SDS-Page e perfil cromatográfico obtido por HPLC da secreção cutânea de <i>T. nigromaculatus</i>	35
Figura 5 - Esquema de fracionamento da secreção cutânea de <i>T. nigromaculatus</i> e análise poreletroforese SDS-Page das frações coletadas por HPLC.....	41
Figura 6 - Perfil proteico e peptídico da secreção cutânea de <i>Trachycephalus nigromaculatus</i>	43
Figura 7 - Avaliação da aplicação tópica da secreção cutânea de <i>Trachycephalus nigromaculatus</i> na microcirculação do músculo cremáster por técnica de microscopia intravital.....	45
Figura 8 - Avaliação após 2 horas da injeção da secreção cutânea de <i>Trachycephalus nigromaculatus</i> na microcirculação do músculo cremáster por técnica de microscopia intravital.....	49
Figura 9 - Avaliação após 24 horas da injeção da secreção cutânea de <i>Trachycephalus nigromaculatus</i> na microcirculação do músculo cremáster por técnica de microscopia intravital.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medicamentos no mercado com origem de venenos animais.....	18
Tabela 2 - Porcentagem relativa dos picos cromatográficos da secreção cutânea de <i>T. nigromaculatus</i>	36
Tabela 3 - Proteômica da secreção cutânea de <i>Trachycephalus nigromaculatus</i>	37
Tabela 4 - Análise de peptídeos por MALDI.....	42
Tabela 5 - Ação da secreção cutânea bruta de <i>Trachycephalus nigromaculatus</i> e de suas frações na inibição do crescimento de microorganismos	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Caracterização de venenos animais e aplicações	17
1.2	Anfíbios.....	18
1.3	Pererecas-de-capacete	22
1.4	<i>Trachycephalus nigromaculatus</i>	26
2	OBJETIVOS	29
2.1	Geral.....	29
2.2	Específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	Obtenção e purificação da secreção cutânea.....	30
3.2	Eletroforese em gel SDS-Page.....	30
3.3	Espectrometria de massas	30
3.4	Digestão em solução e análise proteômica	30
3.5	Determinação da atividade antimicrobiana.....	31
3.6	Efeito da secreção nas alterações de interações leucócito-endotélio na microcirculação do cremaster de camundongos	32
3.7	Citotoxicidade.....	33
4	RESULTADOS.....	35
5	DISCUSSÃO	55
5.1	Proteômica	55
5.2	Avaliação dos efeitos tóxicos in vivo e in vitro	66
5.3	Atividade antimicrobiana.....	68
6	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	ANEXO(S).....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização de venenos animais e aplicações

Os venenos animais são secreções complexas que consistem principalmente de proteínas e peptídeos bioativos que servem principalmente como um meio químico de proteção e subjugação de presas. Os venenos evoluíram independentemente em todo o reino animal (WANG *et al.*, 2012, ZANCOLLI *et al.*, 2022); conseqüentemente, estão presentes em todas as principais linhagens animais (DA SILVA *et al.*, 2014; SMALLWOOD; CLARK, 2021). Os animais venenosos são fontes ricas de novas entidades químicas que podem ser úteis para o desenvolvimento de novas terapias. Um exemplo são os escorpiões venenosos, que produzem venenos que compartilham características comuns, como composições caracterizadas por uma combinação complexa de proteínas e peptídeos com ampla diversidade estrutural. As atividades biológicas desses compostos são seletivas e específicas e dependem da ação sinérgica de vários componentes (DAS; SAVIOLA; MUKHERJEE, 2021)

A abordagem moderna usada para caracterizar vários compostos de venenos animais, usando ferramentas proteômicas e genômicas avançadas, foi denominada “venômica” (CALVETE, 2017). As tecnologias modernas atualmente disponíveis em vários laboratórios de pesquisa permitiram aos cientistas obter a identificação e caracterização funcional-estrutural de centenas de toxinas de cobras, escorpiões, aranhas, anuros e invertebrados marinhos (BORDON *et al.*, 2020), apresentando uma alta diversidade de atividades farmacológicas. O estudo das toxinas e suas isoformas permitiu uma melhor compreensão dos mecanismos tóxicos do envenenamento (Instituto Butantan). A identificação / caracterização de diferentes isoformas das toxinas do veneno, juntamente com a busca por inibidores naturais e sintéticos, como anticorpos monoclonais ou poli clonais, e moléculas com diferentes propriedades químicas, como heparina, fatores de coagulação e extratos vegetais (WANG *et al.*, 2012) aumentou a possibilidade do uso desses agentes como alternativas terapêuticas mais eficazes.

Mais recentemente, a venômica tem se concentrado em uma melhor compreensão dos aspectos clínicos do envenenamento humano, do mecanismo de ação dos venenos e suas toxinas, da prospecção de toxinas com potencial biotecnológico/farmacêutico e do desenvolvimento de novos soros antiveneno e terapias alternativas para envenenamento (MONTEIRO *et al.*, 2020). Entre os componentes tóxicos do veneno, as fosfolipases A2, as L-aminoácido oxidases e as

enzimas proteolíticas, que são classificadas como metaloproteases e serina proteases, são capazes de interromper o sistema hemostático humano por meio de diferentes mecanismos (DI NICOLA *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Medicamentos no mercado com origem de venenos animais

COMPOSTO	ESPÉCIE	NOME COMERCIAL	INDICAÇÃO
Exenatida	<i>Heloderma suspectum</i>	Byetta, Bydureon	Diabetes tipo 2
Ziconotida	<i>Conus spp.</i>	Prialt	Dor crônica severa
Captopril	<i>Bothrops spp.</i>	Capoten, Acepril, Captoril	Hipertensão, insuficiência cardíaca
Eptifibatida	<i>Crotalus spp.</i>	Integrilin	Síndrome coronariana aguda
Tirofibana	<i>Echis spp.</i>	Aggrastat	Síndrome coronariana aguda

Fonte: FERREIRA *et al.*, 2014; MILJANICH, 2004; MOHAMED *et al.*, 2019; NIELSEN; YOUNG; PARKES, 2004

Assim, entender o mecanismo de ação responsável pelos efeitos tóxicos e farmacológicos dos venenos, juntamente com suas caracterizações bioquímicas e estruturais, é essencial para que eles possam ser usados como protótipos biotecnológicos em diversas áreas médicas e científicas (VON REUMONT *et al.*, 2022).

Entre as 11 moléculas baseadas em toxinas comercializadas como medicamentos, uma é derivada do veneno de caracóis-cone (*Conus spp.*), duas são análogos de um peptídeo encontrado no veneno de lagartos (*Heloderma spp.*), duas são anticoagulantes inspirados no veneno de sanguessugas (*Hirudo spp.*) e seis são inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) ou antagonistas do receptor da glicoproteína IIb/IIIa derivados do veneno de cobras (*Bothrops, Echis, Agkistrodon spp.*) (MOHAMED ABD EL-AZIZ; GARCIA SOARES; STOCKAND, 2019). Essas moléculas têm aplicações terapêuticas em diversas áreas da medicina, como dor crônica, diabetes mellitus tipo 2, trombose e hipertensão (BORDON *et al.*, 2020).

1.2 Anfíbios

Os anfíbios representam um grupo diversificado de vertebrados, englobando ANUROS, salamandras e cecílias, que ao longo da evolução desenvolveram uma

série de adaptações para sobreviver em ambientes aquáticos e terrestres. Essas modificações envolvem características como membros, pulmões, órgãos sensoriais e glândulas cutâneas (CLARKE *et al.*, 1997; RIVERA-CORREA *et al.*, 2021).

A pele dos anfíbios destaca-se por sua riqueza em glândulas mucosas e venenosas, as quais desempenham papéis cruciais na troca gasosa, defesa química, osmorregulação e termorregulação. A composição e função dessas secreções variam entre os diversos grupos de anfíbios, refletindo sua história evolutiva e as pressões ecológicas que enfrentam (JARED *et al.*, 2018).

Um aspecto notável das secreções cutâneas dos anfíbios é a presença de peptídeos bioativos, moléculas pequenas compostas por aminoácidos, conhecidas por suas diversas atividades biológicas (XI *et al.*, 2015). Os peptídeos isolados dessas secreções abrangem uma ampla variedade, incluindo peptídeos antimicrobianos, antioxidantes, bradicininas, peptídeos liberadores de insulina e outros moduladores de processos como dor, inflamação, pressão sanguínea, contração muscular lisa e neurotransmissão (CONLON, 2011). A evolução desses peptídeos ocorreu por meio de mecanismos como duplicação gênica, mutação, modificação pós-traducional e pressão seletiva, capacitando os anfíbios a enfrentar desafios ambientais e predadores (MA *et al.*, 2010).

Dentre os anfíbios, os anuros emergem como o grupo mais extensivamente estudado no que diz respeito às suas secreções cutâneas. Os anuros possuem macrogândulas cutâneas especializadas que secretam veneno ou muco em resposta a estímulos ou situações de estresse (BRUNETTI *et al.*, 2016). Essas macrogândulas distribuem-se pelo corpo de maneira específica, variando de acordo com a espécie, e podem abrigar centenas ou milhares de glândulas individuais (KÖNIG *et al.*, 2015). As secreções cutâneas dos anuros revelam uma diversidade considerável de peptídeos, tanto em estrutura quanto em função (KÖNIG *et al.*, 2015).

Os anuros apresentam uma grande variação no tamanho corporal, desde espécies miniaturizadas com menos de 10 mm até espécies gigantes com mais de 200 mm (WOMACK; BELL, 2020). O tamanho corporal dos anuros está relacionado a fatores geográficos, ecológicos e reprodutivos. Por exemplo, os anuros maiores tendem a ter maior latitude e altitude máximas, maior amplitude latitudinal e altitudinal, maior consumo de presas vertebradas e maior desenvolvimento larval livre do que os anuros menores (GOMEZ-MESTRE; WIENS; WARKENTIN, 2008; GUO *et al.*, 2019; WOMACK; BELL, 2020).

As secreções cutâneas de anfíbios são substâncias bioativas produzidas por glândulas especializadas presentes na pele desses animais, que servem como mecanismos de defesa contra predadores e parasitas. Essas secreções podem conter uma grande variedade de compostos químicos, como alcaloides, peptídeos, esteroides, biogênicos e indóis (DALY *et al.*, 2005). Esses compostos podem ter efeitos tóxicos sobre outros organismos, incluindo humanos, dependendo da dose, da via de exposição e da sensibilidade do receptor (MEBS, 2002).

Os efeitos tóxicos das secreções cutâneas de anfíbios podem ser classificados em três categorias principais: neurotóxicos, cardiotoxinas e dermonecróticos (MEBS, 2002). Os efeitos neurotóxicos são causados por compostos que interferem na transmissão nervosa, bloqueando ou ativando receptores ou canais iônicos nas membranas celulares. Esses compostos podem provocar sintomas como convulsões, paralisia, alucinações, dor e morte por insuficiência respiratória. Alguns exemplos de compostos neurotóxicos presentes nas secreções cutâneas de anfíbios são: batracotoxina, epibatidina, pumiliotoxina e saxitoxina (DALY *et al.*, 2005). Os efeitos cardiotoxicos são causados por compostos que afetam o funcionamento do coração, alterando o ritmo cardíaco, a contratilidade ou a condução elétrica. Esses compostos podem provocar sintomas como arritmias, bradicardia, hipotensão e morte por parada cardíaca. Alguns exemplos de compostos cardiotoxicos presentes nas secreções cutâneas de anfíbios são: bufadienolídeos, bufotenina e histrionicotoxina (DALY *et al.*, 2005)

Os efeitos dermonecróticos são causados por compostos que provocam lesões na pele ou nas mucosas, causando inflamação, necrose ou ulceração. Esses compostos podem provocar sintomas como edema, eritema, bolhas, sangramento e infecção.

As toxinas de anfíbios podem atuar em diferentes alvos moleculares nas células endoteliais e nos leucócitos, modulando as interações inflamatórias entre eles. Esses alvos incluem receptores, canais iônicos, enzimas, fatores de transcrição e moléculas de sinalização celular. A seguir, serão descritos alguns exemplos de como as toxinas de anfíbios podem interferir nesses alvos e nos mecanismos das interações inflamatórias.

Receptores: As toxinas de anfíbios podem se ligar a receptores específicos na superfície das células endoteliais e dos leucócitos, ativando ou inibindo vias de sinalização intracelular que regulam a expressão de moléculas de adesão, a liberação

de mediadores inflamatórios, a permeabilidade vascular e a angiogênese. Por exemplo, a epibatidina se liga aos receptores nicotínicos colinérgicos, que são canais iônicos que permitem a entrada de sódio e cálcio nas células. Essa ligação provoca uma despolarização da membrana celular, que ativa a produção de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais. O NO é um gás que tem efeito vasodilatador e anti-inflamatório, pois inibe a adesão e a migração de leucócitos ao endotélio (CHEN *et al.*, 2005). Outro exemplo é a dermorfina, que se liga aos receptores opioides, que são acoplados a proteínas G que inibem a atividade da adenilato ciclase. Essa inibição reduz os níveis de AMP cíclico (cAMP) nas células, o que diminui a expressão de moléculas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β (NEGRI *et al.*, 2012).

Canais iônicos: As toxinas de anfíbios podem bloquear ou ativar canais iônicos na membrana das células endoteliais e dos leucócitos, alterando o potencial elétrico da membrana e o fluxo de íons entre o meio intracelular e extracelular. Essas alterações podem afetar a função celular, a comunicação intercelular e a resposta inflamatória. Por exemplo, a batracotoxina bloqueia os canais de sódio voltagem-dependentes, que são responsáveis pela geração e propagação do potencial de ação nas células excitáveis. Esse bloqueio impede a despolarização da membrana celular, o que preserva a função endotelial em condições de isquemia-reperfusão, evitando o dano oxidativo e inflamatório causado pela reentrada abrupta de oxigênio nos tecidos (WANG *et al.*, 20143). Essa ativação aumenta os níveis intracelulares de cálcio, o que estimula a expressão de fatores angiogênicos, como VEGF e FGF-2 (LIU *et al.*, 2017).

Enzimas: As toxinas de anfíbios podem inibir ou estimular enzimas envolvidas na síntese ou na degradação de mediadores inflamatórios ou na regulação da sinalização celular. Por exemplo, a bufalina é uma toxina extraída da pele do anfíbio *Bufo gargarizans*, que inibe a enzima 5-lipoxigenase, que é responsável pela síntese de leucotrienos a partir do ácido araquidônico. Os leucotrienos são moléculas que promovem a contração da musculatura lisa, o aumento da permeabilidade vascular e a quimiotaxia de leucócitos. A inibição da 5-lipoxigenase pela bufalina reduz os níveis de leucotrienos e atenua a resposta inflamatória em modelos de asma e artrite (LI *et al.*, 2011). Outro exemplo é a esculetina, uma toxina isolada da pele do anfíbio *Hyla versicolor*, que estimula a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que é responsável pela produção de NO a partir da L-arginina. O NO, como já mencionado, tem efeito vasodilatador e anti-inflamatório, pois inibe a adesão e a migração de leucócitos ao endotélio (YANG *et al.*, 2014).

Moléculas de sinalização celular: As toxinas de anfíbios podem modular a produção ou a ação de moléculas que atuam como mensageiros intracelulares ou intercelulares na transdução de sinais inflamatórios. Por exemplo, a ranatuerina é uma toxina isolada da pele do anfíbio *Rana catesbeiana*, que aumenta os níveis intracelulares de cAMP nas células endoteliais. O cAMP é um segundo mensageiro que ativa a proteína quinase A (PKA), que por sua vez fosforila e inativa o NF-κB. Dessa forma, a ranatuerina tem um efeito anti-inflamatório, pois reduz a expressão de moléculas pró-inflamatórias mediadas pelo NF-κB (LEE *et al.*, 2009).

Os peptídeos isolados das secreções cutâneas dos anuros incluem peptídeos antimicrobianos, antioxidantes, bradicininas, peptídeos liberadores de insulina e outros peptídeos que modulam a dor, inflamação, pressão sanguínea, contração muscular lisa e neurotransmissão (VIGERELLI *et al.*, 2020; MA *et al.*, 2010; MALIK *et al.*, 2015; XI *et al.*, 2015). Esses peptídeos evoluíram por meio de duplicação gênica, mutação, modificação pós-traducional e pressão seletiva para lidar com diversos desafios ambientais e predadores (WANG *et al.*, 2021). A evolução dos anuros está associada a mudanças na morfologia do esqueleto pélvico e dos membros posteriores, que permitem diferentes modos de locomoção (e.g., caminhada, salto, natação) e adaptação a diversos micro-habitats (e.g., água, solo, vegetação) (BUTTIMER; STEPANOVA; WOMACK, 2020).

Assim, as toxinas de anfíbios representam uma fonte rica de moléculas bioativas que podem interferir nas interações inflamatórias entre as células e o endotélio em diferentes níveis.

1.3 Pererecas-de-capacete

As pererecas-de-capacete são um grupo de anfíbios que pertencem a família Hylidae, que inclui 85 espécies distribuídas na América do Sul e nas Antilhas. Essas rãs se caracterizam por ter um capacete ósseo na cabeça, que é formado pela fusão dos ossos frontoparietais e esquamosais (BLOTTO *et al.*, 2021b; JARED *et al.*, 2015b). A função desse capacete ósseo não é totalmente compreendida, mas pode servir como uma proteção contra predadores ou como uma arma para combates intraespecíficos (FAIVOVICH *et al.*, 2005; JARED *et al.*, 2015a; MENDES *et al.*, 2016).

Os integrantes do grupo das Pererecas-de-capacete também são diversos em seus comportamentos, modos reprodutivos e defesas químicas. Algumas espécies põem ovos em folhas sobre a água, enquanto outras os depositam em bromélias

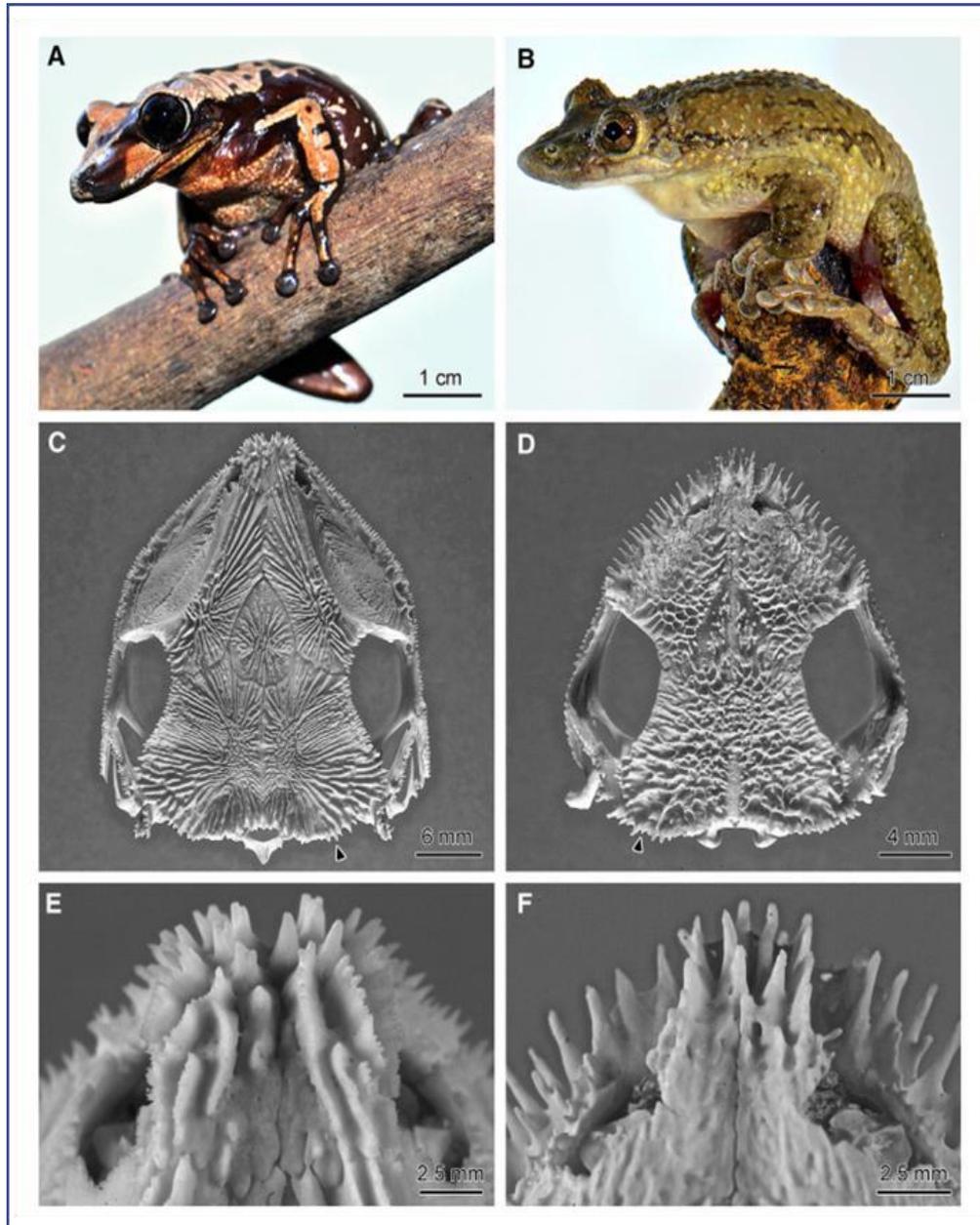
terrestres ou dentro de hastes de bambu (BLOTTO *et al.*, 2021b). Algumas espécies têm girinos que são livres-nadantes e herbívoros, enquanto outrastêm girinos que são endotróficos e se desenvolvem dentro dos ovos até a metamorfose. Diversas espécies secretam toxinas de suas glândulas cutâneas, que podem afastar predadores ou parasitas (BLOTTO *et al.*, 2021; FAIVOVICH *et al.*, 2005). A composição bioquímica e os efeitos biológicos dessas toxinas variam entre as espécies e podem incluir peptídeos, alcaloides, esteroides e aminas biogênicas (FUSCO *et al.*, 2020a; JARED *et al.*, 2015a).

O crânio das Pererecas-de-capacete é composto por vários ossos que se fundiram para formar uma única placa, que cobre o topo e os lados da cabeça (JARED *et al.*, 2015a). Os ossos frontoparietais e esquamosais são especialmente espessados e se projetam da pele, formando espinhos ou cristas ao longo da região labial. Esses espinhos são ocos e têm aberturas em suas pontas, que se comunicam com grandes glândulas de veneno que ficam abaixo deles (GARBINO *et al.*, 2020; JARED *et al.*, 2015a).

As pererecas-de-capacete usam seu crânio como uma arma quando são ameaçadas por predadores ou rivais. Elas podem flexionar seus pescoços e empurrar suas cabeças para frente, dando uma cabeçada venenosa em seu oponente (JARED *et al.*, 2015; MENDES *et al.*, 2016). Os espinhos perfuram a pele e injetam toxinas das glândulas de veneno em seus tecidos. As toxinas podem causar dor intensa, inflamação, sangramento e até morte se ingeridas (JARED *et al.*, 2015). Sua cabeçada venenosa é uma adaptação única que lhes permite se defender contra predadores e competidores maiores em seus habitats áridos.

Além do mecanismo de ataque, a anatomia do crânio dos pererecas-de-capacetes facilita um comportamento de defesa que consiste em bloquear a entrada de um refúgio com o próprio corpo, impedindo o acesso de predadores ou competidores, denominado fragmose (BLOTTO *et al.*, 2021). Este comportamento é mais comum em espécies que vivem em habitats secos ou sazonais, onde os refúgios são escassos e disputados. Por exemplo, *Corythomantis greeningi* e *Aparasphenodon brunoi* são duas espécies de Pererecas-de-capacete que habitam a Caatinga brasileira, um bioma caracterizado por longos períodos de seca e alta variação térmica (MENDES *et al.*, 2016; TEIXEIRA; SCHINEIDER; ALMEIDA, 2002).

Figura 1 - Morfologia de Pererecas-de-capacete.



Fonte: JARED, C. *et al.*, 2015

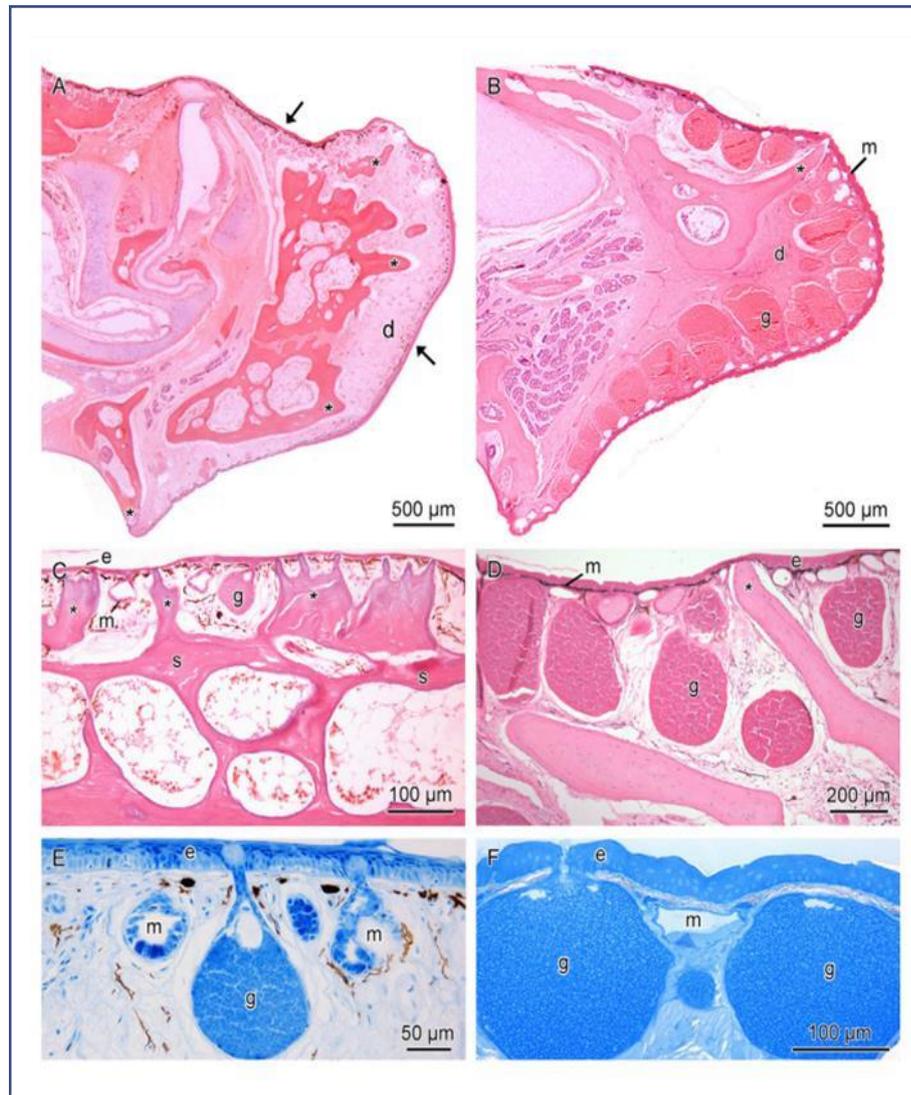
(A e B) Pererecass adultos *A. brunoi* (A) e *C. greeningi* (B). (C e D) Crânios co-ossificados de *A. brunoi* e *C. greeningi* (D); as setas apontam para a região occipital. (E e F) Maior ampliação da margem rostral do crânio de *A. brunoi* (E) e *C. greeningi* (F).

Essas espécies usam fragmose para se abrigar em bromélias ou ocos de árvores durante o dia, evitando a dessecação e a exposição ao sol. A fragmose também pode ser usada como uma forma de comunicação entre as Pererecas-de-capacete. Por exemplo, *Nyctimantis rugiceps* é uma espécie que vive nas florestas tropicais da América do Sul, onde usa fragmose para se esconder em buracos nas árvores durante o dia e vocalizar à noite (MAGALHÃES *et al.*, 2021). Essa espécie

possui uma glândula vocal especializada na região dorsal do crânio, que produz um som alto e metálico quando a perereca é perturbada em seu refúgio. Esse som pode servir como um sinal de alerta para outros indivíduos da mesma espécie ou como um sinal de agressão para potenciais intrusos.

A secreção da pele dessas pererecas pode ser altamente tóxica e conter uma variedade de compostos bioativos, como peptídeos, alcaloides, esteroides e aminas biogênicas (FUSCO *et al.*, 2020). Esses compostos podem ter atividades hemolíticas, fosfolipásicas, coagulantes, proteolíticas e citotóxicas (JARED *et al.*, 2015). A composição e a potência do veneno ou secreção da pele variam entre as espécies de Pererecas-de-capacete. Por exemplo, a secreção da perereca *Aparasphenodon brunoi* é 25 vezes mais tóxica do que o veneno das serpentes *Bothrops*, enquanto a da perereca *Corythomantis greeningi* é duas vezes mais (JARED C; ANTONIAZZI MM, 2007; JARED *et al.*, 2015; MENDES *et al.*, 2016) o anfíbio desta família encontrado na Argentina *Argentoyla siemmersei* possui uma dose similar a *Aparasphenodon brunoi* (CAJADE *et al.*, 2017). Essas pererecas são consideradas os anfíbios venenosos do mundo, pois possuem um mecanismo de entrega ativo para suas toxinas o que pode caracterizar eles mecanisticamente como anfíbios peçonhentos (JARED *et al.*, 2015).

Figura 2 - Histologia da glândula de veneno de pererecas-de-capacete



Fonte: JARED, C. *et al.*, 2015

Espinho na cabeça e histologia da glândula da pele (A) Seção sagital mediana através da cabeça de *A. brunoii*; as setas apontam para regiões com grandes concentrações de glândulas. (B) Seção sagital mediana através da cabeça de *C. greeningi* mostrando um alto número de grandes glândulas granulares. O asterisco indica um espinho quase atingindo a superfície da pele. (C) Alta ampliação de uma área de co-ossificação no topo da cabeça de *A. brunoii*. (D) Alta ampliação de uma área de co-ossificação no lábio superior de *C. greeningi*. (A–D) Corados com hematoxilina-eosina. (E e F) Glândulas granulares de *A. brunoii* (E) e *C. greeningi* (F) são ricas em conteúdo proteico (coradas com azul de bromofenol). Algumas células das glândulas mucosas também apresentam proteína. e, epiderme; d, derme; g, glândula granular; m, glândula mucosa; s, crânio; asterisco (*) indica derme calcificada com espinhos

1.4 *Trachycephalus nigromaculatus*

Trachycephalus nigromaculatus é uma espécie endêmica do Brasil, onde pode ser encontrada nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Goiás (FROST, 2021). Habita florestas subtropicais ou tropicais húmidas de planície, zonas arbustivas, pântanos e áreas degradadas, os indivíduos da espécie

têm uma coloração verde acastanhada com manchas pretas e vermelhas na sua superfície dorsal e manchas brancas na sua superfície ventral tem uma cabeça grande com uma crista óssea que cobre as glândulas parotóides

Tem também grandes olhos com pupilas verticais e membranas timpânicas, podendo atingir até 10 cm de comprimento em "*snout-vent*" (FROST, 2021; IUCN, 2010), uma medida morfométrica usada em herpetologia para medir o comprimento do corpo de um animal, desde a ponta do focinho até a abertura posterior da cloaca.

Pouco se sabe sua secreção cutânea, que consiste numa substância branca-leitosa liberada quando o animal se sente ameaçado (HEYER *et al.*, 1990). A composição química e a atividade biológica desta secreção não foram totalmente caracterizadas, mas podem conter esteroides e peptídeos semelhantes aos encontrados em outras pererecas-de-capacete.

Figura 3 - *Tracycephalus nigromaculatus*



Fonte: Shutterstock (2021)

(A) Exemplar da espécie, (B) Padrão cutâneo (C) Indivíduo da espécie realizando o comportamento descrito como fragmose.

A resistência antimicrobiana é um problema global que ameaça a saúde humana e animal, bem como a segurança alimentar e o desenvolvimento sustentável (SILVA *et al.*, 2020). A escassez de novos antibióticos eficazes contra as bactérias mais perigosas e resistentes aos medicamentos limita as opções terapêuticas e aumenta os custos e a mortalidade associados às infecções bacterianas (WHO, 2021). A OMS alerta que o mundo ainda não está conseguindo desenvolver os

tratamentos antibacterianos necessários, apesar da crescente conscientização sobre a urgência do problema (WHO, 2021b). A maioria dos antibióticos em desenvolvimento clínico são derivados de classes existentes, com baixo potencial para superar a resistência (MIETHKE *et al.*, 2021). Portanto, há uma necessidade urgente de incentivar a pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos, especialmente para os patógenos prioritários identificados pela OMS (TACCONELLI *et al.*, 2018).

Assim, a caracterização bioquímica do veneno deste anfíbio pode auxiliar na explicação de seu sucesso ecológico, auxiliar na taxonomia dentro de seu grupo, bem como apoiar o estudo de sua história natural, reforçando a importância deste animal em seu habitat e auxiliando de maneira acessória em medidas de conservação desta espécie. A bioprospecção da secreção cutânea de *T. nigromaculatus* representa uma infinidade de possibilidades, e na área de atividade antimicrobiana pode revelar novas moléculas com atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas resistentes que são um grande problema de saúde pública global.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste estudo foi realizar uma caracterização bioquímica abrangente da secreção cutânea da perereca-de-capacete *Trachycephalus nigromaculatus*, investigando os efeitos tóxicos dessa secreção tanto *in vivo* quanto *in vitro* e avaliação do potencial antimicrobiano da secreção, contribuindo assim para a identificação de possíveis aplicações terapêuticas e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

2.2 Específicos

- Analisar e caracterizar a natureza bioquímica da secreção de *Trachycephalus nigromaculatus*, identificando seus componentes e inferindo seu papel biológico neste anfíbio, destacando sua contribuição para a compreensão da história evolutiva e da adaptação deste organismo único.
- Investigar os efeitos tóxicos da secreção *in vivo*, e *in vitro*, para obter uma compreensão abrangente dos impactos biológicos desta substância, promovendo assim uma visão mais completa da ecologia e do comportamento do *Trachycephalus nigromaculatus*.
- Avaliar o potencial antimicrobiano da secreção com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras e agentes antimicrobianos, consolidando a relevância biológica desta espécie na pesquisa biomédica e na preservação da biodiversidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e purificação da secreção cutânea

A secreção cutânea foi coletada e fornecida gentilmente pelo laboratório do Dr Carlos Jared, do Instituto Butantan, após coleta em PBS, filtragem e liofilização do material. Para as análises cromatográficas da secreção, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), (20A Prominence, Shimadzu Co. Kyoto, Japão). Na corrida foram empregadas colunas analíticas e preparativas octadecil (C18. Phenomex, Luna, 250X21.20mm/15 μ). As corridas foram monitoradas por um detector Shimadzu SPD-M20A PDA, utilizando os comprimentos de onda de 214 e 280nm., em esquema de gradiente, 0 a 60% de B conforme o perfil cromatográfico, utilizando como solvente A: Ácido trifluoroacético (TFA) / água (1:1000) e solvente B AC / acetonitrila / água (1:900:100).

3.2 Eletroforese em gel SDS-Page

As amostras e o marcador de massa molecular foram aplicados em géis de poliacrilamida (PAGE) 4 a 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), em condições redutoras, de acordo com o método descrito por Laemmli (1970), coradas por comassie blue. As bandas foram cortadas para identificação por espectrometria de massas. Após a excisão, as bandas foram descoradas, reduzidas com DTT (10 mM) e alquiladas com iodoacetamida (30mM), para então ocorrer a digestão por tripsina (20 ng/ μ L), overnight a 37°C. A extração dos peptídeos foi feita com lavagens em água contendo 5% ácido fórmico e acetonitrila 50% em água, contendo 5% ácido fórmico. E então, após este procedimento, cada banda foi analisada por LC-MS/MS para obter a sequência de peptídeos presentes em cada banda.

3.3 Espectrometria de massas

Análises por espectrometria de massas foram realizadas em um espectrômetro LTQ (Thermo) e MALDI-TOF (Shimadzu), para análises de MALDI/TOF foi utilizado o modo linear positivo, com a matriz alfa-ciano.

3.4 Digestão em solução e análise proteômica

Resumidamente, o muco liofilizado e os picos da cromatografia (50 μ g de proteína, conforme estimado por espectrofotômetro (Biodrop, Analítica) foram ressuspensos (0,4 mg. mL⁻¹) em 100 mM de NH₄HCO₃ contendo 8 M de ureia e

aquecidos a 30 ° C. Após 15 minutos, adicionou-se 1,4-ditiotreitol (10 mM, concentração final) à solução e reagiu durante 60 minutos a 30 ° C, após incubação com iodoacetamida (25 mM, concentração final), diluindo os reagentes. com NH_4HCO_3 100 mM pH 8 para uma concentração final de 0,8 mol.L⁻¹ de ureia. Depois, foi adicionada tripsina (Tripsin Singles, Proteomic Grade) (1 µg de tripsina:50 µg de proteína mucosa) e a reação foi realizada durante a noite, a 30 ° C devido à presença de ureia, a reação foi parada pela adição de ácido trifluoroacético a 5%, peptídeos tripticos foram extraídos com ponta de zíper (Merck Millipore, Alemanha), secos e depois dissolvidos em ácido acético a 0,1%. para análise por LC-MS / MS. Amostras digeridas de gel ou em solução foram analisadas em espectrômetro de massa LTQ-XL (Thermo Fisher Scientific, EUA). alíquotas foram injetadas e separadas por uma coluna C-18, em um sistema NanoLC-1D (Eksigent). A eluição foi realizada por um gradiente linear de B sobre A, de 0-30% em 45 minutos, 30-80% em 10 minutos e 80% de B em 5 minutos, sob vazão de 600 nL por minuto. Os solventes foram A: água contendo 0,1% de ácido acético e B: acetonitrila contendo 0,1% de ácido acético. Os perfis MS2 foram analisados por algoritmos de busca iônica MS / MS pelo PEAKS Studio 7.0 para correspondências com sequências de proteínas conhecidas depositadas na base de dados pública UniProt. As tolerâncias MS e MS/MS foram fixadas em 0,1 Da. Em paralelo, sequências de novo foram obtidas pelo PEAKS studio 7.0 e analisadas no BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) para a identificação de proteínas por sequência de peptídeos.

3.5 Determinação da atividade antimicrobiana

As bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, e a levedura *Candida albicans* ATCC 10231, foram empregados no presente estudo. O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado de acordo com o NCCLS (2003) e CLSI (2015), empregando Caldo Mueller-Hinton (bactérias) ou Caldo Sabouraud Dextrose (*C. albicans*) em microplacas de titulação de 96 poços de fundo chato. Serão adicionados 50 µl de suspensões microbianas de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL em cada poço contendo 50 µl da solução teste (secreções e frações), ficando a concentração microbiana final de $1,5 \times 10^4$ UFC / poço (NCCLS,2003).Após 24 horas de incubação a 37°C, foi feita a leitura das densidades ópticas em um comprimento de onda de 595nm em leitor de ELISA Multiskan®EX (Thermo Fisher Scientific, EUA), para observação da atividade antimicrobiana. O percentual de

inibição de crescimento microbiano pelas soluções testes foi calculado através da fórmula:

3.6 Efeito da secreção nas alterações de interações leucócito-endotélio na microcirculação do cremaster de camundongos

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \frac{\text{Absorbância do microrganismo tratado} \times 100}{\text{Absorbância do microrganismo não tratado}}$$

Essas interações foram avaliadas por ensaio de microscopia intravital. A secreção cutânea (3 µg/100µL ou 30 µg/100µL) ou PBS (100mL) foram injetados no subcutâneo da bolsa escrotal, e o leito vascular do músculo cremaster foi preparado.

Após 2 ou 24 h da injeção, os camundongos foram anestesiados com associação de Cloridrato de Quetamina (100mg/Kg), Xilazina (5mg/Kg) e Midazolam (5mg/Kg) por via s.c (o volume de administração foi padronizado para 5 ml/Kg independente de dose e associação) e com auxílio de uma tesoura de ponta fina foi realizada a exposição do músculo cremaster e a secção do epidídimo para o desprendimento do músculo cremaster. Após esse procedimento, a preparação foi mantida sobre uma placa com temperatura controlada (37 °C), dotada de uma área transparente, através da qual o leito microvascular foi visualizado (Baez *et al.*, 1973, Zychar *et al.*, 2011). Esta preparação foi montada em um microscópio (Microscópio BX51WIF Olympus) equipado com uma câmera para captação de imagens (Câmera colorida DP74 Olympus). As imagens foram transmitidas para um computador provido de um programa de análise de imagens (CellSens Dimension).

Vênulas pós-capilares foram selecionadas aleatoriamente (diâmetros entre 20-40 µm, e comprimento de, pelo menos, 100 µm) e observadas em cada animal.

Foram avaliados os leucócitos aderidos e emigrados. Os leucócitos aderidos foram contados durante um período de 5 minutos, ao longo dos 100 µm do vaso e considerados os que estavam estacionados por um tempo >30 seg. Os leucócitos emigrados foram avaliados pela contagem das células presentes em uma distância de até 50 µm da região perivascular em um segmento de 100 µm. Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão da média. O número amostral (n) por grupo foi de 5 animais e os experimentos foram realizados em duplicata.

Para avaliação do efeito tópico, a secreção cutânea (3 ug/mL e 30 ug/mL) foi aplicada sobre o músculo cremaster com auxílio de micropipeta, e o leito vascular do músculo foi avaliado. Os camundongos foram anestesiados com associação de

Cloridrato de Quetamina (100mg/Kg), Xilazina (5mg/Kg) e Midazolam (5mg/Kg) por via s.c (o volume de administração foi padronizado para 5ml/Kg independente de dose e associação).

Após o animal estar anestesiado o cremaster foi exteriorizado e montado sobre uma placa com temperatura controlada (37 °C), dotada de uma área transparente, através da qual o leito microvascular foi visualizado (Baez *et al.*, 1973). As imagens foram obtidas através de um microscópio de luz (Microscópio BX51WIF Olympus) equipado com uma câmera para captação de imagens (Câmera colorida DP74 Olympus). As imagens foram transmitidas para um computador provido de um programa de análise de imagens (CellSens Dimension). Vênulas pós-capilares foram selecionadas aleatoriamente (diâmetros entre 20-50 μm , e comprimento de, pelo menos, 100 μm) e observadas em cada animal.

Após 10 minutos de estabelecer o fluxo uniforme na microcirculação, o veneno ou a salina foram aplicadas topicamente no musculo cremaster. avaliando o diâmetro de vênulas pós-capilares e arteríolas, os leucócitos em rolling e aderidos nos tempos de 5, 10 e 15min. Os leucócitos em rolling e aderidos foram contados durante um período de 1 minuto, ao longo dos 100 μm do vaso.

3.7 Citotoxicidade

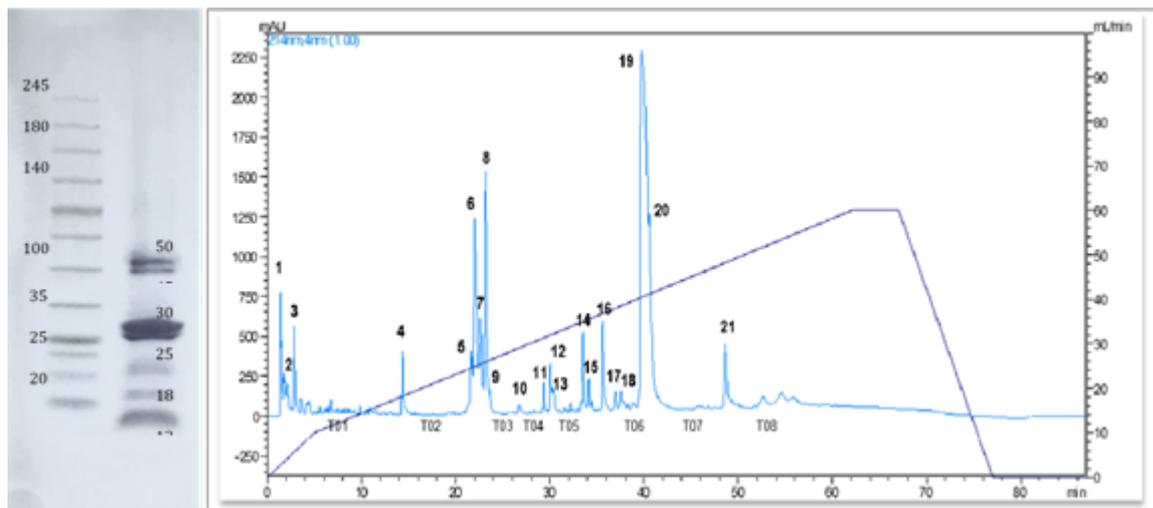
O teste de viabilidade celular das células VERO foi realizado pelo método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina) (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018; MOSMANN, 1983). Células SH-SY5Y foram cultivadas em garrafas de cultura de poliestireno, com meio de cultura DMEM/F12 completo (10% Soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C, em ambiente úmido com atmosfera de 5% de CO₂. Ao atingirem confluência de 80%, as células foram plaqueadas na concentração 1×10^5 células / poço, em placas de 96 poços. Após 24 h do plaqueamento as células foram incubadas com as seguintes concentrações de secreção cutânea: 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ e 100ng/mL, por 24h, o sobrenadante foi removido e então foram adicionados 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de solução MTT (Sigma®), diluída em DMEM/F12 (5 mg/mL) e a placa foi novamente incubada por 2h. Após a incubação, a solução de MTT foi removida e 100 μL de dimetil sulfoxido (DMSO) foram adicionados em cada poço para dissolução dos cristais de formazan. Após agitação das placas, os cristais

foram totalmente dissolvidos e a absorbância foi monitorada em espectrofotômetro (Molecular Devices®, SpectraMax M2) em leitura de 540 nm. Os resultados foram comparados com o controle negativo (células + DMEM/F12 completo). As células do controle positivo foram incubadas com DMSO 20%.

4 RESULTADOS

Inicialmente, a secreção cutânea bruta do veneno de *T. nigromaculatus* foi analisada por HPLC usando uma coluna C18 e um gradiente de eluição de 0 a 60% de acetonitrila em água, ambos contendo 0,1% de TFA, em 80 minutos. Como pode-se observar na **Figura 4**, o perfil cromatográfico mostrou 21 picos com diferentes áreas relativas e tempos de retenção. O pico mais abundante foi o de número 19, com 31,73% da área total, seguido pelo pico de número 20, com 10,16%. Esses picos correspondem também aos compostos mais hidrofóbicos da secreção cutânea do *T. nigromaculatus*.

Figura 4 - Perfil de eletroforese em SDS-Page e perfil cromatográfico obtido por HPLC da secreção cutânea de *T. nigromaculatus*.



Fonte: próprio autor.

1 mg da secreção diluída em solvente A foi injetada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), (20A Prominence, Shimadzu Co. Kyoto, Japão). Na corrida foram empregadas colunas analíticas e preparativas octadecil (C18. Phenomex, Luna, 250X21.20mm/15 μ). As corridas foram monitoradas por um detector Shimadzu SPD-M20A PDA, utilizando os comprimentos de onda de 214 e 280nm., em esquema de gradiente, 0 a 60% de B conforme o perfil cromatográfico, utilizando como solvente A: Ácido trifluoroacético (TFA) / água (1:1000) e solvente B AC / acetonitrila / água (1:900:100).

Os picos de número 6 e 8 também apresentaram áreas relativamente altas, com 8,23% e 6,63%, respectivamente. Esses picos correspondem aos compostos com polaridade moderada da secreção cutânea do *T. nigromaculatus*. Os demais picos apresentaram áreas inferiores a 4%, sendo o menor o de número 18. Esses resultados sugerem uma grande diversidade de compostos na secreção cutânea do *T. nigromaculatus*, que podem ter diferentes funções biológicas.

Além da análise por HPLC, a secreção cutânea do *T. nigromaculatus* foi submetida a análise em gel de eletroforese em SDS-PAGE para determinar o perfil proteico da amostra (Figura 4). O gel foi corado com “comassie blue”, um corante que se liga às proteínas e permite visualizar as bandas correspondentes aos diferentes pesos moleculares. O resultado mostrou seis bandas principais, com pesos moleculares estimados em 50, 45, 30, 25, 18 e 12 kDa. Essas bandas indicam a presença de proteínas de diferentes tamanhos na secreção cutânea do *T. nigromaculatus*, que podem ter diferentes atividades biológicas. As bandas mais intensas foram as de 30 e 25 kDa, sugerindo que essas proteínas são as mais abundantes na amostra.

Tabela 2 - Porcentagem relativa dos picos cromatográficos da secreção cutânea de *T. nigromaculatus*

PICO	(%)	PICO	(%)	PICO	(%)
1	1.69	8	6.63	15	0.70
2	0.66	9	0.55	16	2.72
3	1.17	10	0.34	17	0.55
4	1.66	11	0.50	18	0.37
5	1.90	12	0.95	19	31.73
6	8.23	13	0.42	20	10.16
7	3.72	14	1.56	21	2.48

Fonte: próprio autor.

Para identificação das proteínas presentes na secreção cutânea do *T. nigromaculatus*, as bandas do gel de eletroforese foram recortadas e submetidas a uma digestão enzimática com tripsina e os peptídeos resultantes foram então analisados por espectrometria de massas para identificação proteômica.

Os resultados da análise por espectrometria de massas foram processados pelo software Peaks, que realiza a busca e a identificação dos peptídeos e das proteínas a partir dos espectros de massas, utilizando o banco de dados Anfíbios, que contém as sequências de todas as proteínas conhecidas de anfíbios, para comparar os peptídeos da amostra com as possíveis proteínas correspondentes. O software Peaks também calculou um valor de $-10\lg P$ para cada peptídeo e proteína identificados, que representa a probabilidade de que a identificação seja correta. Quanto maior o valor de $-10\lg P$, maior a confiança na identificação.

A partir da análise, foram encontradas as seguintes quantidades de proteínas e fragmentos com -10lgP de pelo menos 30 para cada banda: Banda 1:51, banda 2: 40 proteínas, banda 3: 28 proteínas, banda 4: 8 proteínas, banda 5: 17 proteínas; banda 6: 42 proteínas e 156 fragmentos. Esses dados indicam a complexidade e a diversidade das proteínas presentes na secreção cutânea do *T. nigromaculatus*.

A **Tabela 2** mostra as proteínas identificadas que apresentaram uma massa molecular calculada (Avg. Mass) compatível com as bandas observadas no gel de eletroforese, de 72 a 8 kDa. **A Tabela 2** também mostra a descrição no banco de dados, a origem, o valor de -10lgP e o percentual de cobertura de cada proteína. Baseando-se na análise por espectrometria de massas e na comparação com as massas moleculares das bandas do gel de eletroforese, foi possível encontrar na secreção cutânea do *T. nigromaculatus* a proteína “78 kDa glucose-regulated protein” (78 kDa), “Heat shock protein family A (Hsp70)” (70 kDa), “Glucose-6-phosphate isomerase” (63 kDa), “Methanethiol oxidase” (60 kDa), “Elongation factor 1-alpha” (50 kDa), “Adenosylhomocysteinase” (47 kDa), “Isocitrate dehydrogenase” (45 kDa), “Peroxiredoxin-6” (25 kDa), “Hyaluronidase” (29 kDa), “Anntoxin” (18 kDa) e a “Triosephosphate isomerase” (12 kDa).

Para realizar a caracterização da secreção cutânea do *T. nigromaculatus*, foi realizado um fracionamento por HPLC, utilizando um total de 5mg da secreção. O fracionamento consistiu em separar os compostos presentes na secreção de acordo com a sua polaridade. O fracionamento resultou em 21 picos distintos no cromatograma. Além dos picos, também foram coletadas 8 frações foram denominadas de inter-tempos, correspondendo às regiões do cromatograma sem picos definidos ou grandes absorbâncias de UV. Para identificar em quais picos as proteínas mencionadas acima estavam presentes, foi realizado um gel de eletroforese em SDS-PAGE para cada pico e também para os inter-tempos coletados no fracionamento por HPLC.

Tabela 3 - Proteômica da secreção cutânea bruta de *Trachycephalus nigromaculatus*

DESCRIPTION	Avg. Mass	-10lgp	Cov (%)	Accesion
78 kDa glucose-regulated protein OS=Leptobranchium leishanense OX=445787GN=HSPA5 PE=3 SV=1	77296	71.54	4	tr A0A8C5QLA7
78 kDa glucose-regulated protein OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=hspa5 PE=3SV=1	75856	76.85	5	tr A0A803K8T4

78 kDa glucose-regulated protein OS=Leptobranchium leishanense OX=445787 GN=HSPA5 PE=3 SV=1	72905	71.54	4	tr A0A8C5QLW8
Uncharacterized protein OS=Xenopus tropicalis OX=8364 PE=3 SV=4	72835	99.00	9	tr L7N2X7
78 kDa glucose-regulated protein OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=hspa5.L PE=1 SV=1	72687	76.85	5	tr A0A1L8F6I3
78 kDa glucose-regulated protein OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=LOC397850 PE=2 SV=1	72669	76.85	5	tr Q6DD68
78 kDa glucose-regulated protein OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=hspa5 PE=3 SV=1	72496	76.85	5	tr A0A6I8RVN9
Heat shock protein family A (Hsp70) member 8 OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=hspa8 PE=3 SV=2	72367	141.89	22	tr A0A6I8RPG4
Heat shock protein family A (Hsp70) member 8 OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=hspa8 PE=3 SV=2	71937	141.89	22	tr A0A6I8Q687
heat shock protein family A (Hsp70) member 1A S homeolog OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=hspa1a.S PE=2 SV=1	71380	119.22	16	tr Q6AZH8
Heat shock protein family A (Hsp70) member 8 OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=hspa8 PE=3 SV=4	71377	141.89	23	tr F6QKL0
Uncharacterized protein OS=Leptobranchium leishanense OX=445787 PE=3 SV=1	71312	141.62	23	tr A0A8C5QB17
heat shock cognate 71 kDa protein-like OS=Geotrypetes seraphini OX=260995 GN=LOC117369096 PE=3 SV=1	71221	137.07	19	tr A0A6P8SX13
heat shock 70 kDa protein-like OS=Microcaecilia unicolor OX=1415580 GN=LOC115466260 PE=3 SV=1	71215	71.13	7	tr A0A6P7XRG8
Uncharacterized protein OS=Leptobranchium leishanense OX=445787 PE=3 SV=1	71196	113.22	11	tr A0A8C5MR37
Uncharacterized protein OS=Leptobranchium leishanense OX=445787 PE=3 SV=1	71069	140.28	22	tr A0A8C5QNA7
Heat shock protein 70 OS=Ambystoma mexicanum OX=8296 GN=HSP70 PE=2 SV=1	71055	137.74	21	tr Q8UV14
Uncharacterized protein OS=Leptobranchium leishanense OX=445787 PE=3 SV=1	71023	116.93	14	tr A0A8C5R9W3
Hsp70 protein OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=hsp70 PE=2 SV=1	70992	64.06	6	tr Q6DCD3
Heat shock protein family A (Hsp70) member 8 OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=hspa8 PE=3 SV=2	70872	141.89	23	tr A0A6I8QKR0
heat shock cognate 71 kDa protein isoform X1 OS=Geotrypetes seraphini OX=260995 GN=HSPA8 PE=3 SV=1	70762	138.12	21	tr A0A6P8PDP3
Heat shock cognate protein 70 OS=Andrias davidianus OX=141262 GN=hsc70 PE=2 SV=1	70747	138.12	21	tr E1AQZ2
Heat shock protein cognate 70 OS=Pleurodeles waltl OX=8319 GN=hsc70 PE=2 SV=1	70537	113.07	15	tr Q13120
Heat shock protein 70 OS=Pelophylax lessonae OX=45623 GN=hsp70 PE=2 SV=1	70526	95.28	9	tr D8L539
Methanethiol oxidase OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=XELAEV_18042984mg PE=3 SV=1	64749	100.69	12	tr A0A1L8F551
Glucose-6-phosphate isomerase OS=Ranitomeya imitator OX=111125 GN=RIMITATOR_LOCUS4737026 PE=3 SV=1	61802	62.85	8	tr A0A821UTM2
4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase isoform X1 OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=aldh9a1 PE=3 SV=3	56354	71.92	5	tr F6VC33
Aldedh domain-containing protein OS=Leptobranchium leishanense OX=445787 PE=3 SV=1	55844	78.26	6	tr A0A8C5QJM1
Methanethiol oxidase OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=selenbp1 PE=3 SV=2	54136	160.16	18	tr A0A6I8QEM2
4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=aldh9a1 PE=2 SV=1	54051	71.92	5	tr Q6DJQ3
Methanethiol oxidase OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=selenbp1 PE=2 SV=1	52660	160.16	19	sp Q569D5
Methanethiol oxidase OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=selenbp1 PE=3 SV=1	52660	160.16	19	tr A0A1B8Y1Y9
Methanethiol oxidase OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=selenbp1.L PE=3 SV=1	52614	104.15	16	tr A0A1L8FDB9
Methanethiol oxidase OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=selenbp1-b PE=2 SV=1	52509	100.69	15	sp Q6DCH7
Methanethiol oxidase OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=selenbp1.S PE=3 SV=1	52509	100.69	15	tr A0A1L8F568
Uncharacterized protein OS=Leptobranchium leishanense OX=445787 PE=3 SV=1	50633	131.38	9	tr A0A8C5R2X4
Elongation factor 1-alpha OS=Leptobranchium leishanense OX=445787 PE=3 SV=1	50255	65.79	6	tr A0A8C5R637
Elongation factor 1-alpha OS=Dryophytes japonicus OX=109175 GN=ef_1a PE=2 SV=1	50132	111.26	12	tr Q4H447

Hyaluronidase OS=Ranitomeya imitator OX=111125 GN=RIMITATOR_LOCUS3096040 PE=3 SV=1	49786	138.76	29	tr A0A821NWXJ3
Elongation factor 1-alpha OS=Ranitomeya imitator OX=111125 GN=RIMITATOR_LOCUS7631796 PE=3 SV=1	48149	65.79	7	tr A0A822BX72
Elongation factor 1-alpha OS=Ranitomeya imitator OX=111125 GN=RIMITATOR_LOCUS3899755 PE=3 SV=1	48110	65.77	6	tr A0A821S3U5
Elongation factor 1-alpha OS=Ranitomeya imitator OX=111125 GN=RIMITATOR_LOCUS10496191 PE=3 SV=1	48088	65.77	6	tr A0A822G8R0
Adenosylhomocysteinase OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=ahcy PE=2 SV=1	47749	70.17	10	tr Q28IH7
Adenosylhomocysteinase OS=Microcaecilia unicolor OX=1415580 GN=AHCY PE=3SV=1	47649	70.17	10	tr A0A6P7YT28
Elongation factor 1-alpha OS=Ranitomeya imitator OX=111125 GN=RIMITATOR_LOCUS10003457 PE=3 SV=1	47594	65.77	6	tr A0A822F715
Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=idh1.S PE=3SV=1	46909	123.94	13	tr A0A1L8EPX4
Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Geotrypetes seraphini OX=260995 GN=IDH1PE=3 SV=1	46894	117.07	14	tr A0A6P8QX08
Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Microcaecilia unicolor OX=1415580 GN=IDH1PE=3 SV=1	46892	132.59	23	tr A0A6P7YQY8
Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=idh1 PE=3SV=3	46864	130.23	17	tr F6WI63
intermediate filament protein ON3-like isoform X2 OS=Geotrypetes seraphiniOX=260995 GN=LOC117360755 PE=3 SV=1	46241	65.83	5	tr A0A6P8QUH1
Putative 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase (Fragment)OS=Hymenochirus curtipes OX=8362 PE=2 SV=1	45338	102.81	10	tr G5E3Q5
Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Ranitomeya imitator OX=111125GN=RIMITATOR_LOCUS8072318 PE=3 SV=1	44814	113.20	10	tr A0A822D1G8
Adenosylhomocysteinase OS=Ranitomeya imitator OX=111125 GN=RIMITATOR_LOCUS15037688 PE=3 SV=1	44497	66.06	9	tr A0A822I956
Peroxiredoxin-6 OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=prdx6 PE=3 SV=1	29365	228.73	35	tr A0A803JUV5
Triosephosphate isomerase OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=tpi1 PE=3 SV=1	26791	77.63	19	tr A0A6I8RW99
Triosephosphate isomerase (Fragment) OS=Pipa carvalhoi OX=191480 PE=2 SV=1	26758	73.67	21	tr G5DYM1
Peroxiredoxin-6 OS=Microcaecilia unicolor OX=1415580 GN=PRDX6 PE=3 SV=1	25380	92.97	22	tr A0A6P7YH93
Peroxiredoxin-6 OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=prdx6.L PE=2 SV=1	25363	216.53	40	tr Q7SYT1
Peroxiredoxin-6 OS=Geotrypetes seraphini OX=260995 GN=LOC117346417 PE=3SV=1	25339	96.11	24	tr A0A6P8NSL4
Peroxiredoxin-6 OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=prdx6 PE=2 SV=1	25156	228.73	42	tr Q6P624
Peroxiredoxin-6 OS=Xenopus laevis OX=8355 GN=prdx6.S PE=1 SV=1	25070	233.62	46	tr Q7SYQ4
Peroxiredoxin-6 OS=Ranitomeya imitator OX=111125 GN=RIMITATOR_LOCUS1283076 PE=3 SV=1	25060	145.88	42	tr A0A821GWL3
Peroxiredoxin-6 OS=Geotrypetes seraphini OX=260995 GN=LOC117346647 PE=3SV=1	25026	61.10	8	tr A0A6P8NUF0
Peroxiredoxin-6 OS=Leptobrachium leishanense OX=445787 PE=3 SV=1	25004	115.43	29	tr A0A8C5R8J0
Triosephosphate isomerase (Fragment) OS=Ambystoma mexicanum OX=8296GN=TPI PE=2 SV=1	24988	69.65	18	tr Q76BG2
Peroxiredoxin-6 OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=prdx6 PE=2 SV=1	24601	88.85	18	tr Q5M8E1
Peroxiredoxin-6 OS=Xenopus tropicalis OX=8364 GN=MGC76137 PE=2SV=1	23988	228.73	44	tr B5DFS7
Triosephosphate isomerase OS=Ranitomeya imitator OX=111125GN=RIMITATOR_LOCUS3842788 PE=3 SV=1	23597	79.22	29	tr A0A821RK94
Peroxiredoxin-6 (Fragment) OS=Hymenochirus curtipes OX=8362 PE=2 SV=1	23400	111.85	28	tr G5DY64
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Ranitomeya imitator OX=111125GN=RIMITATOR_LOCUS7328695 PE=3 SV=1	22936	80.41	20	tr A0A822B7X1
Uncharacterized protein OS=Leptobrachium leishanense OX=445787 PE=4 SV=1	17243	35.45	10	tr A0A8C5QCP3
Uncharacterized protein OS=Eleutherodactylus coqui OX=57060 GN=GDO78_011964PE=4 SV=1	15629	31.61	9	tr A0A8J6F2D9
Anntoxin S5 OS=Hyla simplex OX=334658 PE=2 SV=1	8706	44.24	20	tr H6SWL5
Anntoxin S1 OS=Hyla simplex OX=334658 PE=2 SV=1	8625	44.24	20	tr H6SWL1
Anntoxin S3 OS=Hyla simplex OX=334658 PE=2 SV=1	8595	44.24	20	tr H6SWL2

Anntoxin S4 OS=Hyla simplex OX=334658 PE=2 SV=1	8565	44.24	20	tr H6SWL3
Anntoxin S2 OS=Hyla simplex OX=334658 PE=2 SV=1	8552	44.24	20	tr H6SWL4

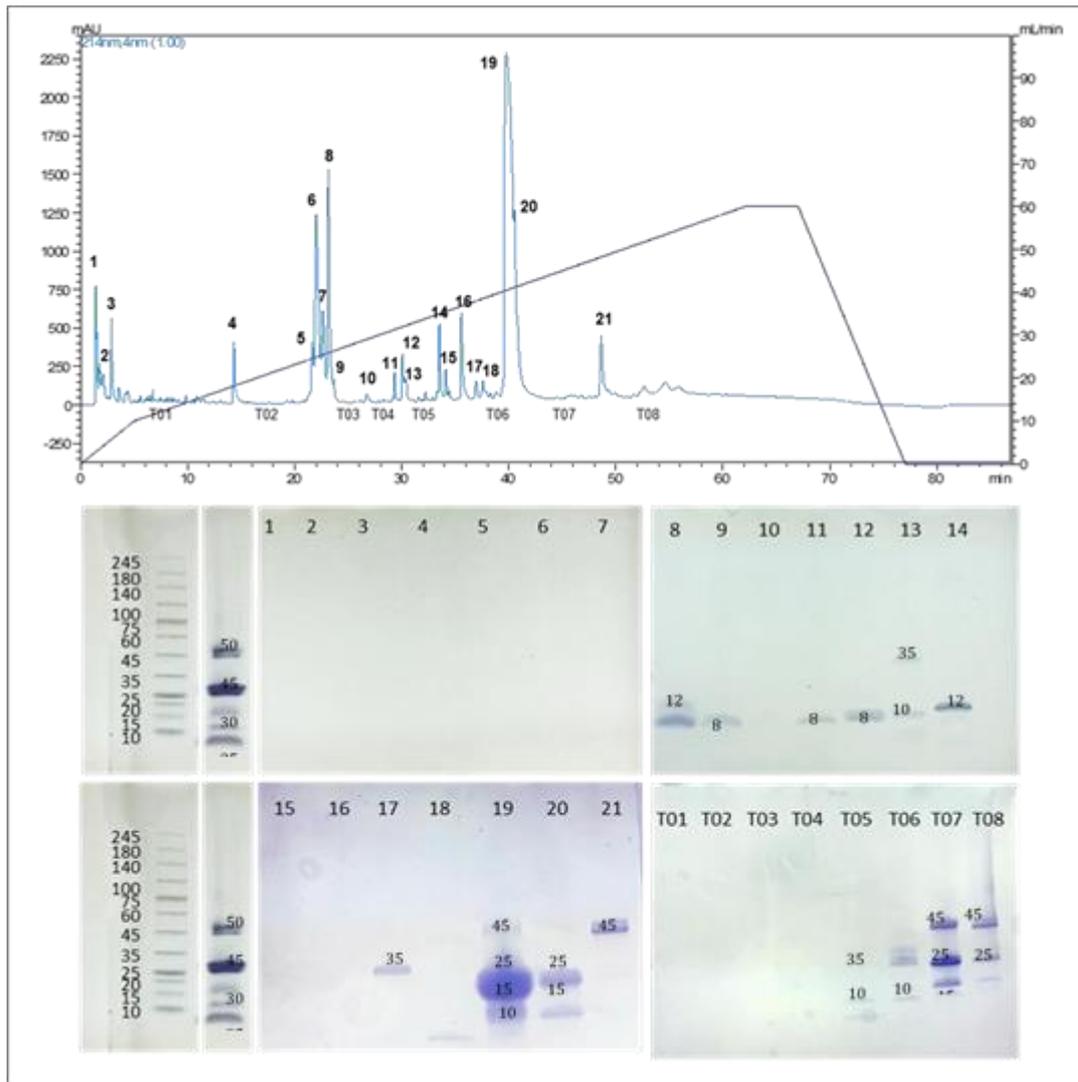
Fonte: próprio autor.

O resultado da eletroforese mostrou que os picos 1 a 7, 10, 15 e 16 e os inter-tempos 1 a 4 não geraram bandas visíveis no gel de eletroforese, indicando que essas frações não continham proteínas ou que as proteínas presentes eram muito pequenas ou muito grandes para serem separadas pelo gel. Os demais picos e inter-tempos geraram bandas no gel de eletroforese correspondentes às seguintes proteínas: Pico 8: uma proteína de baixo massa molecular (8 kDa); Pico 9: uma proteína de baixo massa molecular (8 kDa); Pico 11: uma proteína de baixo massa molecular (8 kDa); Pico 12: uma proteína de baixo massa molecular (8 kDa); Pico 13: duas proteínas de massa molecular intermediário (35 e 10 kDa); Pico 14: uma proteína de massa molecular baixo (12 kDa); Pico 18: uma proteína de massa molecular baixo (10 kDa); Pico 19: três proteínas de massa molecular alto (45, 25 e 15 kDa); Pico 20: duas proteínas de massa molecular alto (25 e 15 kDa); Pico 21: uma proteína de massa molecular alto (45 kDa); Intertempo 5: uma proteína de massa molecular baixo (10 kDa); Intertempo 6: duas proteínas de massa molecular intermediário (35 e 10 kDa); Intertempo 7: três proteínas de massa molecular alto (45, 25 e 15 kDa); Intertempo 8: três proteínas de massa molecular alto (45, 25 e 15 kDa).

Esses resultados mostram que alguns picos e inter-tempos continham as proteínas com massa semelhante às observadas na eletroforese do veneno bruto. Por exemplo, o pico 19, o que tem maior abundância relativa no UV, contém três proteínas (45, 25 e 15 kDa), sendo que a banda majoritária deste pico tem um peso similar à banda majoritária do veneno bruto (25 kDa). Enquanto o pico 20 continha apenas as duas proteínas menos abundantes (25 e 15 kDa). Outros picos e inter-tempos contém proteínas que não estavam presentes na secreção bruta ou que não foram detectadas inicialmente pelo gel de eletroforese do veneno bruto, como uma proteína de baixo massa molecular (8 kDa) e uma de 35 kDa que não foi observada na concentração utilizada de secreção bruta. Esses resultados indicam que o fracionamento por HPLC foi capaz de separar e concentrar as proteínas presentes na secreção cutânea do *T. nigromaculatus* e que elas estão distribuídas por todo o veneno. Os picos e os intertempos fracionados mostraram a presença do que, baseado em seus pesos moleculares, parecem ser as proteínas encontradas na análise da secreção bruta. No

entanto, para confirmar suas identidades e funções, será necessário realizar uma nova análise proteômica, que permitirá obter informações mais precisas sobre a identidade distribuição dessas moléculas.

Figura 5 - Esquema de fracionamento da secreção cutânea de *T. nigromaculatus* e análise por eletroforese SDS-Page das frações coletadas por HPLC



Fonte: próprio autor

Para identificação de peptídeos presentes nos picos e intertempo do veneno de *Trachycephalus nigromaculatus* fracionados por HPLC, foi realizada uma análise por MALDI/MS que indicou a presença de peptídeos mostrados na **Tabela 4**.

Esses dados permitem comparar as massas dos peptídeos encontrados nas diferentes frações. Por exemplo, observa-se que os peptídeos com massa aproximada

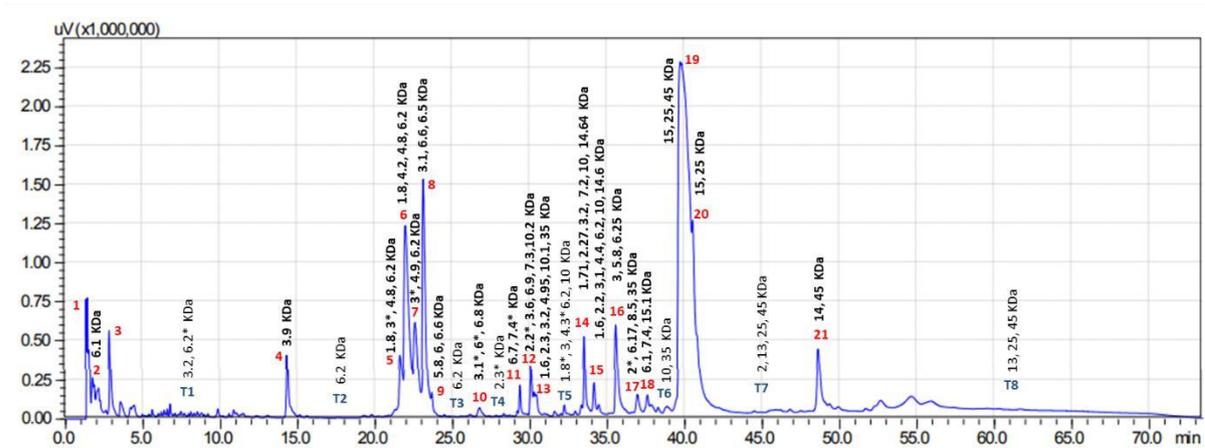
de 6.2 kDa estão presentes em várias frações (T01, T02, T03, T05 e T06), o que pode indicar que se trata de uma classe de peptídeos abundante do veneno. Já o peptídeo de massa 2.3 kDa foi detectado apenas na fração T04, o que pode sugerir que ele é um componente específico dessa fração. Essas informações podem auxiliar na elucidação da estrutura e da função dos peptídeos presentes no veneno de *Trachycephalus nigromaculatus*, indicando uma variedade grande de peptídeos presentes na secreção, bem como sugerindo a presença de uma classe importante de peptídeos importante para este animal na faixa de 6 kDa. A combinação de SDS-PAGE com MALDI/MS permitiu obter um perfil proteico e peptídico do veneno de *Trachycephalus nigromaculatus*, como ilustrado na **Figura 6**.

Tabela 4 - Análise de peptídeos por MALDI

PEAK	m/z	PEAK	m/z
1	-	12	2200, 3600, 6900, 7300
2	6100	13	1600, 2300, 3200, 4950
3	-	T05	1800, 3000, 4300, 6200
T01	3200, 6200	14	1710, 2270, 3200, 7200
4	3900	15	1600, 2200, 3100, 4400, 6200
T02	6200	16	3000, 5800, 6250
5	1800, 3000, 4800, 6200	17	2000, 6170, 8500
6	1800, 4200, 4800, 6200	18	6100, 7400
7	3000, 4900, 6200	T06	-
8	3100, 6600, 6500	19	-
9	5800, 6600	20	-
T03	6200	T07	2000
10	3100, 6000, 6800	21	-
T04	2300	T08	-
11	6700, 7400		

Fonte: próprio autor.

Figura 6 - Perfil proteico e peptídico da secreção cutânea de *Trachycephalus nigromaculatus*



Fonte: próprio autor.

A microscopia intravital é uma técnica que permite a visualização de células e tecidos vivos em tempo real, sem a necessidade de fixação ou coloração (Pittet; Weissleder, 2011). Essa técnica é especialmente útil para o estudo da ação de toxinas animais, pois permite observar os efeitos dessas substâncias sobre o sistema vascular, o sistema imunológico e a interação entre as células hospedeiras e as bactérias (Pittet; Weissleder, 2011).

Iniciamos com uma análise abrangente para investigar os efeitos da aplicação tópica (Figura 7) de diferentes concentrações da substância (Tn 3 e Tn 30) em comparação com um grupo de controle tratado com salina. Após a aplicação tópica das soluções, a análise abordou três momentos de observação distintos: 5, 10 e 15 minutos após a aplicação.

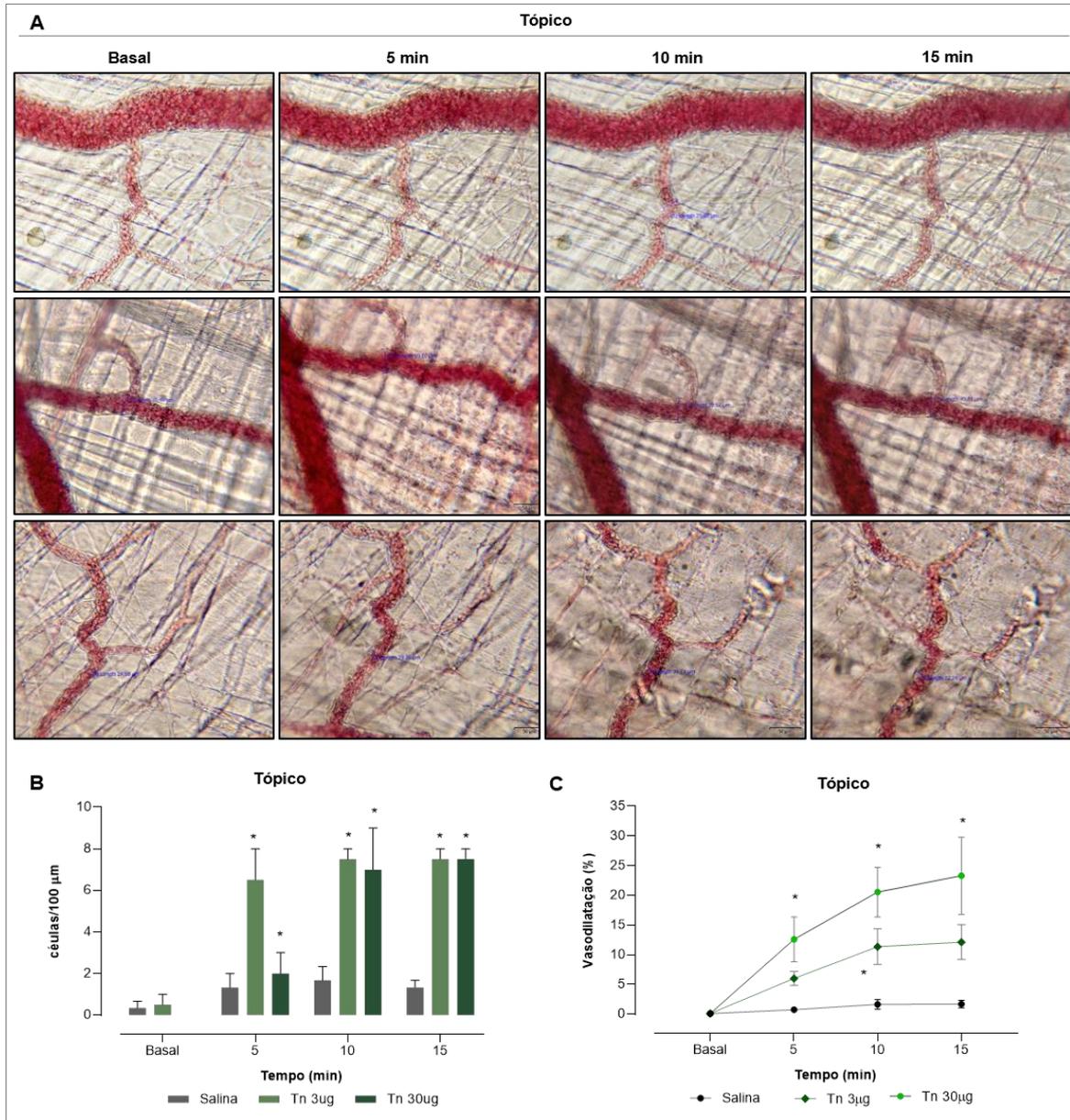
Aos 5 minutos, no grupo controle, a dilatação do diâmetro vascular foi relativamente baixa, registrando uma expansão de apenas 0,7358%. Em contrapartida, o grupo Tn 3 mostrou uma dilatação notável de 6,007%, e o grupo Tn 30 apresentou uma resposta ainda mais marcante, atingindo 12,58%.

Esses resultados evidenciam claramente a influência das concentrações da substância na dilatação vascular, com concentrações mais altas resultando em maiores dilatações. Em relação ao "rolling", contabilizamos as células em movimento em um período de 1 minuto. O grupo controle registrou, em média, 11,33 células realizando esse processo. Enquanto isso, o grupo Tn 3 contabilizou uma média superior de 12,20 células em "rolling", e o grupo Tn 30 manteve uma média

semelhante, com 11,00 células nesse processo. As diferenças nas médias de "rolling" começam a se tornar aparentes, com os grupos de tratamento exibindo uma tendência de maior atividade em comparação com o grupo controle. Em relação à "adesão", medimos a quantidade de células que aderiram em uma área de 100 micrômetros.

O grupo controle registrou, em média, 1,333 células aderentes. Por sua vez, o grupo Tn 3 demonstrou uma adesão média de 6,500 células, e o grupo Tn 30 manteve uma adesão de 7,000 células. Esses resultados continuam a destacar as diferenças nas respostas entre os grupos, com os grupos de tratamento apresentando consistentemente médias mais elevadas. Ao atingirmos os 10 minutos, notamos uma estabilidade na dilatação vascular no grupo controle, que alcançou 1,639%. No entanto, o grupo Tn 3 registrou uma dilatação notável de 11,36%, e o grupo Tn 30 apresentou uma dilatação ainda mais expressiva, atingindo 20,54%. Esses resultados indicam uma clara relação entre a concentração da substância e a expansão vascular, que se torna mais evidente à medida que o tempo avança. Na análise do "rolling", o grupo controle manteve uma média de 13,33 células realizando esse processo.

Figura 7 Avaliação da aplicação tópica da secreção cutânea de *Trachycephalus nigromaculatus* na microcirculação do músculo cremáster por técnica de microscopia intravital.



Fonte: próprio autor

A secreção cutânea (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi aplicada sobre o músculo cremaster com auxílio de micropipeta, e o leito vascular do músculo foi avaliado. Imagens foram obtidas através de um microscópio de luz (Microscópio BX51WIF Olympus) equipado com uma câmera para captação de imagens (Câmera colorida DP74 Olympus).

Em contraste, o grupo Tn 3 registrou uma média superior de 15,75 células em "rolling", enquanto o grupo Tn 30 apresentou uma média semelhante, com 13,50 células. Em relação à "adesão" em células contadas em uma área de 100 micrômetros, o grupo controle apresentou uma média de 1,667 células aderentes.

Enquanto isso, o grupo Tn 3 demonstrou uma adesão média de 7,500 células, e o grupo Tn 30 manteve uma adesão de 7,000 células. Esses resultados continuam a enfatizar as diferenças nas respostas observadas em relação à concentração e ao tempo.

Aos 15 minutos, a dilatação no grupo controle atingiu 1,680%, enquanto o grupo Tn 3 registrou 12,14% e o grupo Tn 30 uma dilatação significativa de 23,29%. Esses resultados destacam o aumento progressivo da dilatação vascular ao longo do tempo e em resposta às concentrações da substância e pode ser explicado pela presença de substâncias vasodilatadoras na secreção. A vasodilatação tem implicações diretas na inflamação e na permeabilidade vascular.

Na análise do "*rolling*", o grupo controle registrou uma média de 12,50 células realizando esse processo, enquanto o grupo Tn 3 demonstrou uma média mais elevada de 17,50 células em "*rolling*". O grupo Tn 30 registrou uma média mais baixa de 9,250 células nesse processo. Esses resultados destacam a complexidade das respostas ao longo do tempo e entre os grupos, indicando uma dinâmica de "*rolling*" influenciada tanto pela concentração da substância quanto pelo tempo.

Em relação à "adesão", o grupo controle manteve uma média de 1,333 células aderentes em uma área de 100 micrômetros. O grupo Tn 3 e o grupo Tn 30 apresentaram médias mais elevadas de 7,500 células aderentes. Mais uma vez, esses resultados sublinham as diferenças nas respostas observadas entre os grupos e enfatizam a influência das concentrações da substância e do tempo.

Em resumo, este estudo proporciona uma visão detalhada das complexas respostas vasculares sob diferentes condições experimentais, destacando a influência direta das concentrações da substância e do tempo. A dilatação vascular, o "*rolling*" e a adesão celular são claramente afetados por essas variáveis, evidenciando a complexidade das respostas vasculares observadas na microscopia intravital.

A análise tópica foi uma etapa crucial para entender os efeitos imediatos da substância na resposta vascular. No entanto, é sabido que os processos biológicos e vasculares podem evoluir significativamente ao longo do tempo. Portanto, seguimos com a análise do efeito da injeção subcutânea da secreção após 2 e 24 horas, para capturar as respostas tardias, avaliar a duração dos efeitos da substância e identificar possíveis mudanças na dinâmica vascular que podem não ser evidentes durante a análise tópica de curto prazo.

No entanto, ao realizar as análises após 2h, nesse intervalo de tempo, deparamo-nos com um cenário notavelmente distinto e desafiador, que impediu a obtenção de dados significativos como é possível observar na **Figura 8**. O tecido vascular em questão apresentou mudanças profundas e preocupantes, evidenciando alterações consideráveis em sua integridade e função.

Primeiramente, observou-se uma perda notável de elasticidade do tecido conjuntivo. O tecido vascular, que normalmente exhibe flexibilidade e capacidade de acomodar mudanças no fluxo sanguíneo, tornou-se rígido e menos responsivo a variações nas pressões intravasculares, ocasionando a hemorragias pontuais. Esse fenômeno pode ser um indicativo de alterações estruturais nas camadas vasculares ou da atuação direta da substância sobre a elasticidade tecidual.

Em conjunto com a perda de elasticidade, externamente, o local apresentou sinais de edema, caracterizado pelo acúmulo anormal de fluido nos espaços intersticiais. O edema é um indicativo de resposta inflamatória e pode ter contribuído para a perda da função vascular.

A presença de rubor nas áreas afetadas também foi notada. Esse rubor é sugestivo de aumento do fluxo sanguíneo local e pode ser um sinal de resposta inflamatória aguda ou de vasodilatação fortemente reativa. Além disso, a integridade do tecido foi prejudicada a tal ponto que ocorreu “esfarelamento” em algumas áreas. Isso sugere danos significativos ao endotélio e às camadas vasculares subjacentes, comprometendo a estrutura e a função dos vasos.

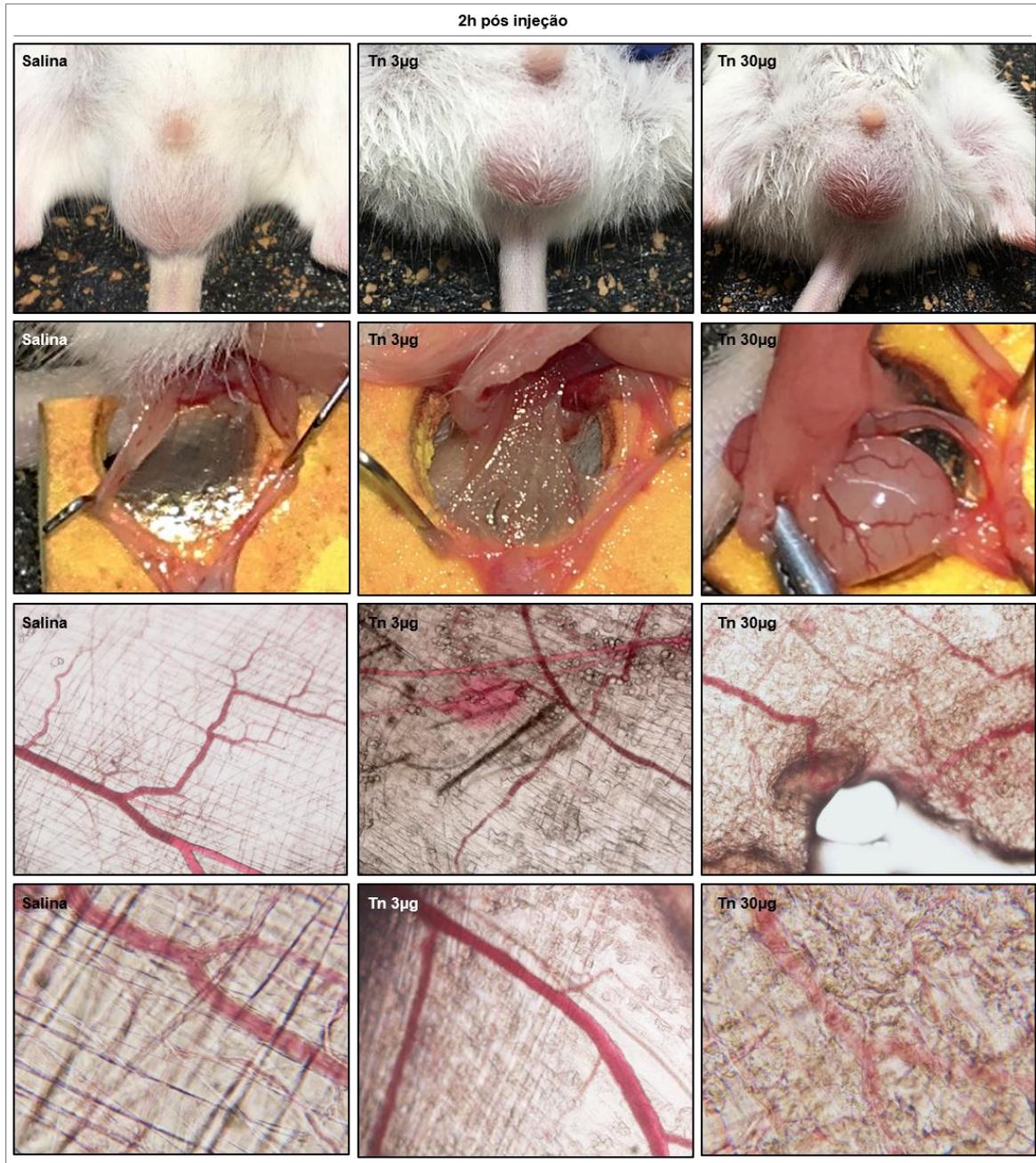
A observação mais preocupante foi a parada da circulação em certas áreas. Isso indica que as alterações vasculares impactaram seriamente o fluxo sanguíneo, resultando em áreas onde a circulação foi interrompida, possivelmente devido a trombose ou obstrução vascular.

Por último, houve evidências de infiltração celular significativa nas áreas afetadas. Isso sugere que células inflamatórias e outros componentes celulares podem ter migrado para os locais de alteração vascular em resposta a essas mudanças drásticas.

Já após 24 horas, apesar do tecido também se apresentar visivelmente danificado e com alterações morfológicas (Figura 9), foi possível avaliar os parâmetros *rolling*, adesão e migração. Os dados de rolagem mostram que, no grupo tratado com 3 µg da secreção de *Trachycephalus nigromaculatus*, a contagem média de células por minuto foi de 17,67 no grupo Salina (grupo controle) e de 11,67 no grupo tratado.

Isso representa uma redução de aproximadamente 34,1% na contagem média de células. No grupo tratado com 30 μg da secreção, a contagem média foi ainda menor, com 7,667 células por minuto, representando uma diferença de aproximadamente 56,6% em relação ao grupo controle. Essa variação sugere uma possível relação dose-dependente, onde concentrações mais elevadas da secreção levam a uma inibição mais pronunciada da rolagem celular.

Figura 8 - Avaliação após 2 horas da injeção da secreção cutânea de *Trachycephalus nigromaculatus* na microcirculação do músculo cremáster por técnica de microscopia intravital



Fonte: próprio autor

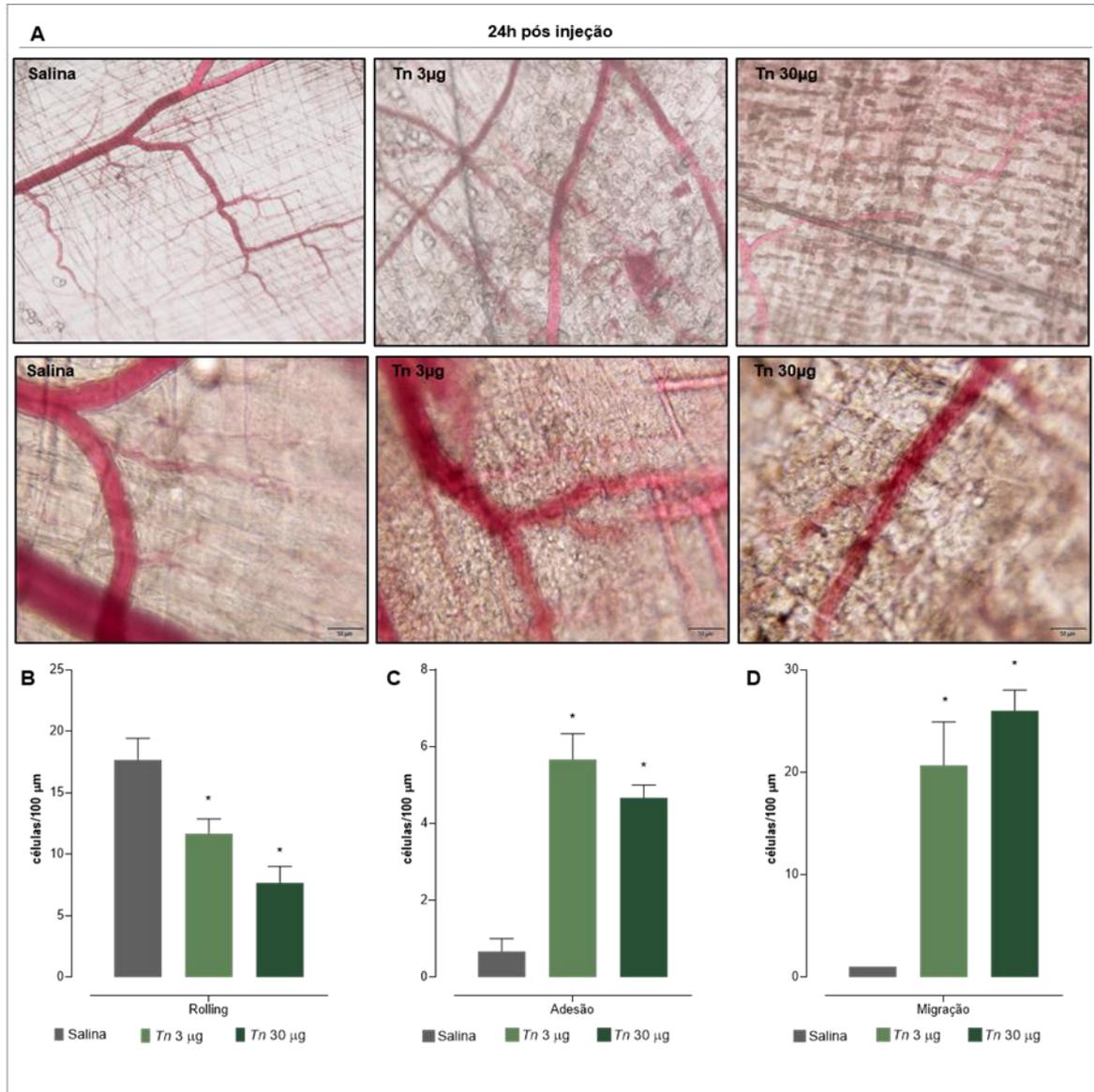
Na análise de células aderidas, no grupo tratado com 3 µg da secreção, a média de adesão das células foi de 5,667, enquanto no grupo controle (Salina), foi de 0,6667. Resultando um aumento significativo na adesão. No grupo tratado com 30 µg da secreção, a média de adesão foi de 4,667. Embora a concentração seja mais alta, a

adesão celular se mostrou levemente reduzida quando comparada ao grupo de 3 μg , porém ainda foi significativamente maior do que no grupo controle.

Nos dados de migração celular, no grupo tratado com 3 μg da secreção, a média de migração foi de 20,67, enquanto no grupo controle (Salina), foi de 1,000m enquanto que no grupo tratado com 30 μg da secreção, a média de migração foi ainda maior, chegando a 26,00, representando em ambos um aumento relevante em relação ao grupo controle. Mais uma vez, observamos uma possível relação dose-dependente, com concentrações mais elevadas da secreção resultando em uma migração celular ainda mais pronunciada.

Esses dados evidenciam uma clara relação entre as concentrações de secreção de *Trachycephalus nigromaculatus* e os efeitos nas respostas celulares. A secreção dessa espécie de perereca-de-capacete demonstrou ter propriedades tanto inibitórias quanto pró-migratórias, afetando a rolagem, adesão e migração das células de forma significativa. Essa pesquisa pode ter implicações importantes na área biomédica, na terapia celular e em aplicações relacionadas à saúde. A compreensão desses efeitos pode abrir portas para o desenvolvimento de tratamentos inovadores e terapias regenerativas.

Figura 9 - Avaliação após 24 horas da injeção da secreção cutânea de *Trachycephalus nigromaculatus* na microcirculação do músculo cremáster por técnica de microscopia intravital



Fonte: próprio autor

O ensaio MTT é um método colorimétrico que avalia a viabilidade celular baseado na redução do sal tetrazólico MTT em cristais de formazan pelas mitocôndrias de células viáveis. Para avaliação, foram utilizadas células VERO, que são células renais de macaco verde africano, para testar o efeito citotóxico de duas concentrações da secreção cutânea. Os dados mostram a média da absorvância dos cristais de formazan em cada grupo, avaliado 24 horas após exposição. O grupo controle corresponde aos poços que não foram expostos a nenhum tratamento. O

grupo Veículo, que recebeu o solvente usado nas soluções testes; Tn 100 ng/mL, que recebeu uma concentração baixa de Tn; e Tn 1 ug/mL, que recebeu uma concentração alta de Tn. O grupo Tn 100 ng/mL apresentou uma redução leve na viabilidade celular, demonstrando que essa concentração de Tn não foi muito citotóxica para as células VERO, já o grupo Tn 1 ug/mL apresentou uma redução acentuada na viabilidade celular de 75%, revelando que essa concentração de Tn foi altamente citotóxica para as células VERO. Portanto, os dados indicam que o Tn tem um efeito dose-dependente na viabilidade das células VERO, sendo mais tóxico quanto maior for a concentração.

Por fim, para investigar a ação antimicrobiana, veneno de *Trachycephalus nigromaculatus*, foi testado contra três microrganismos: a bactéria *S. aureus*, a bactéria *S. coli* e o fungo *C. albicans*. O veneno foi fracionado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cada fração foi testada para avaliar a sua capacidade de inibir o crescimento dos microrganismos. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de crescimento para cada pico e intertempo analisados.

Os resultados mostraram (**Tabela 5**) que o veneno apresentou uma atividade antibacteriana moderada contra *S. aureus* (22,04%) e *S. coli* (43,26%), e uma atividade antifúngica moderada contra *C. albicans* (53,86%). Entre as frações obtidas por HPLC, as frações 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 19 apresentaram uma atividade antibacteriana baixa a moderada contra *S. aureus*, mas não tiveram efeito sobre *S. coli*. As frações 14, 20 e 21 apresentaram uma atividade antibacteriana moderada contra *S. aureus* e *S. coli*. As frações 2 e 5 não apresentaram atividade antibacteriana contra nenhum dos microrganismos testados.

Os intertempos T04, T05, T06, T07 e T08 apresentaram uma atividade antibacteriana moderada a alta contra *S. aureus* e *S. coli*. Os intertempos T01 e T02 não apresentaram atividade antibacteriana significativa contra nenhum dos microrganismos. Entre as frações obtidas por HPLC, as frações 1, 4, 5, 7 e 8 apresentaram uma atividade antifúngica baixa a moderada contra *C. albicans*, mas não tiveram efeito sobre *S. aureus* e *S. coli*. As frações 13, 15, 16 e 17 apresentaram uma atividade antifúngica moderada a alta contra *C. albicans*, mas não tiveram efeito sobre *S. aureus* e *S. coli*. As frações 18 e 19 não apresentaram atividade antifúngica significativa contra nenhum dos microrganismos testados.

Tabela 5 - Ação da secreção cutânea bruta de *Trachycephalus nigromaculatus* e de suas frações na inibição do crescimento de microorganismos

INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%)							
FRAÇÃO	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. coli</i> ATCC 25922	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	FRAÇÃO	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. coli</i> ATCC 25922	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Veneno	22,04	43,26	53,86	11	10,54	0	14,21
1	17,01	0	6,77	12	12,59	0	10,76
2	0	0	1,06	13	7,48	0	47,54
3	4,08	0	0	T05	36,14	16,27	36,67
T01	10,54	0	3,85	14	26,87	7,91	33,73
4	14,97	0,74	23,9	15	18,71	0	46,08
T02	5,44	0	17,53	16	21,09	0	46,35
5	7,48	0	15,8	17	17,01	0	58,03
6	8,16	2,47	1,86	18	13,95	0,74	40,24
7	14,97	0,25	9,69	T06	39,88	13,79	67,66
8	9,18	0	6,24	19	28,57	3,21	32,27
9	11,22	0	0	20	34,01	5,81	40,64
T03	0	0	26,03	T07	35,51	22,82	57,92
10	1,36	0	0	21	28,23	4,94	39,31
T04	28,97	15,59	27,88	T08	44,24	17,85	56,97

Fonte: próprio autor

As frações 2, 3, 6 e 9 não apresentaram atividade antifúngica contra nenhum dos microrganismos testados. As frações 14, 18 e 19 apresentaram uma atividade antifúngica moderada contra *C. albicans* e uma atividade antibacteriana baixa a moderada contra *S. aureus* e *S. coli*. As frações 20 e 21 apresentaram uma atividade antifúngica moderada contra *C. albicans* e uma atividade antibacteriana moderada contra *S. aureus* e *S. coli*. Os intertempos T03, T04, T05, T06, T07 e T08 apresentaram uma atividade antifúngica moderada a alta contra *C. albicans* e uma atividade antibacteriana moderada a alta contra *S. aureus* e *S. coli*. Os intertempos T01 e T02 apresentaram uma atividade antifúngica baixa contra *C. albicans*, mas não tiveram efeito sobre *S. aureus* e *S. coli*. Ao comparar os resultados entre os picos e intertempos, pode-se observar que os intertempos apresentaram uma atividade antimicrobiana geralmente maior do que os picos, sugerindo que os compostos responsáveis pela atividade estão presentes em baixa concentração nas frações ou

que há um efeito sinérgico entre eles. Ao comparar os resultados com o veneno bruto, pode-se observar que algumas frações e intertempos apresentaram uma atividade maior do que o veneno, indicando que o fracionamento por HPLC permitiu separar e concentrar os compostos ativos.

5 DISCUSSÃO

5.1 Proteômica

O estudo bioquímico da secreção cutânea de *Trachycephalus nigromaculatus* mostrou uma mistura complexa de substâncias de alto e baixo massa molecular, tal como visto por HPLC e identificação por espectrometria de massa. Estes compostos, como em outros anfíbios, são essenciais para a proteção do animal, tanto do ambiente em que vive como de predadores. Aqui, trazemos uma discussão sobre os principais compostos encontrados e a sua possível função na secreção do animal

Hsp70 é uma família de proteínas de choque térmico que atuam como chaperonas moleculares com várias funções biológicas (KOMAROVA *et al.*, 2021). As chaperonas Hsp70 regulam o metabolismo proteico, incluindo dobramento, desdobramento, localização subcelular, agregação/desagregação e incorporação em complexos proteicos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021). As chaperonas Hsp70 também desempenham papéis importantes nas respostas celulares ao estresse, como choque térmico, estresse oxidativo e lesão por isquemia-reperfusão (ROSENZWEIG *et al.*, 2019). As proteínas Hsp70 consistem em dois domínios: um domínio de ligação ao nucleotídeo (NBD) que liga e hidrolisa ATP, e um domínio de ligação ao substrato (SBD) que liga segmentos peptídicos hidrofóbicos curtos de proteínas substrato. A ligação e liberação dos substratos são reguladas pelo ciclo de ATPase da Hsp70, que é modulado por co-chaperonas como as proteínas do domínio J (JDPs), fatores de troca de nucleotídeos (NEFs) e fatores específicos do substrato (KOMAROVA *et al.*, 2021; ROSENZWEIG *et al.*, 2019).

Um dos aspectos interessantes das chaperonas Hsp70 é sua interação como sistema imunológico. A Hsp70 pode ser liberada das células tanto na forma solúvel quanto encapsulada em vesículas extracelulares (EVs) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021). As EVs contendo Hsp70 podem ativar a imunidade adaptativa em modelos de melanoma e carcinoma de cólon em camundongos, aumentando a resposta positiva do CD8 e o acúmulo de citocinas antitumorais (YOUNG, 2010). As EVs contendo Hsp70 também podem modular a contração vascular afetando os mecanismos de manuseio do Ca²⁺ (KOMAROVA *et al.*, 2021).

Os anfíbios são vertebrados ectotérmicos que dependem da temperatura ambiental para manter sua temperatura corporal. Eles estão expostos a vários estresses térmicos durante seu ciclo de vida, como mudanças sazonais, flutuações diurnas e alterações de habitat (GERICK *et al.*, 2014). Portanto, os anfíbios evoluíram

vários mecanismos para lidar com o estresse térmico, incluindo a expressão de proteínas Hsp70 em diferentes tecidos (PROTOPOPOVA; PAVLICHENKO; LUCKENBACH, 2020). As proteínas Hsp70 podem proteger ascélulas dos anfíbios de danos induzidos pelo calor, prevenindo a agregação de proteínas, facilitando a renaturação de proteínas e promovendo a degradação de proteínas (MAYER; BUKAU, 2005).

Além de modular a atividade e a função de peptídeos, as proteínas Hsp70 também participam da defesa imune e da atividade antimicrobiana dos anfíbios. Como padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs), as proteínas Hsp70 extracelulares podem estimular as células imunes por meio de receptores específicos e induzir respostas antitumorais ou antimicrobianas (BAEK *et al.*, 2015; MAYER; BUKAU, 2005).

Além disso, as proteínas Hsp70 podem auxiliar a apresentação cruzada de antígenos por moléculas do MHC classe I, aumentando o reconhecimento e a eliminação de células infectadas ou transformadas por células T citotóxicas (ROSENZWEIG *et al.*, 2019). Adicionalmente, algumas proteínas Hsp70 têm atividade antimicrobiana direta contra bactérias, fungos e parasitas, rompendo suas membranas ou interferindo em suas funções essenciais (HUAN *et al.*, 2020). Assim, as proteínas Hsp70 são reguladores cruciais da imunidade inata e adaptativa, bem como da atividade antimicrobiana em anfíbios

A peroxirredoxina-6 (PRDX6) é uma enzima multifuncional que pertence à família das peroxirredoxinas, enzimas antioxidantes (PACIFICI *et al.*, 2019). Ela possui três atividades catalíticas distintas: glutathione peroxidase (Gpx), que reduz o peróxido de hidrogênio e os hidroperóxidos orgânicos; fosfolipase A2 independente de cálcio ácida (aiPLA2), que hidrolisa fosfolípidios; e aciltransferase de lisofosfatidilcolina (LPCAT), que transfere ácidos graxos para a lisofosfatidilcolina (AREVALO; VÁZQUEZ-MEDINA, 2018). A PRDX6 desempenha também papéis importantes na homeostase redox celular, no metabolismo lipídico, na inflamação e na sinalização (PACIFICI *et al.*, 2019; SHARAPOV; NOVOSELOV; GUDKOV, 2019).

Fisiologicamente, a PRDX6 é amplamente expressa em vários tecidos e órgãos, incluindo o cérebro. No sistema nervoso central (SNC), a PRDX6 é principalmente expressa por astrócitos, que são células gliais que apoiam a função neuronal e protegem os neurônios do estresse oxidativo (PANKIEWICZ *et al.*, 2020). A PRDX6 tem sido implicada em várias doenças cerebrais, como doença de

Alzheimer, doença de Parkinson, acidente vascular cerebral, traumatismo cranioencefálico e glioblastoma. Nessas doenças, a PRDX6 pode ter efeitos protetores ou prejudiciais dependendo do seu nível de expressão, atividade e interação com outras moléculas (LIAO *et al.*, 2021).

A atividade de fosfolipase A2 (PLA2) da PRDX6 é outra característica importante dessa enzima que a distingue de outras peroxirredoxinas (PRIYATHILAKA *et al.*, 2016). Enzimas PLA2 catalisam a hidrólise da ligação éster sn-2 dos fosfolipídios, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídios (BURKE; DENNIS, 2009). A PRDX6 possui uma atividade específica de PLA2 que é independente de cálcio e pH ácido, e prefere fosfolipídios oxidados como substratos (MANEVICH; FISHER, 2005). A atividade de PLA2 da PRDX6 está localizada em um local catalítico separado da atividade Gpx, e requer uma tríade serina-histidina-aspártico para sua função (FISHER *et al.*, 2016).

A atividade de PLA2 da PRDX6 tem sido implicada em vários processos fisiológicos e patológicos, como remodelagem de fosfolipídios, reparo de membranas, inflamação e morte celular (FISHER *et al.*, 2016). Por exemplo, PRDX6-PLA2 pode modular a composição do surfactante pulmonar hidrolisando o fosfatidilcolina dipalmitoil (DPPC) e transferindo o ácido araquidônico para a lisofosfatidilcolina (LPC) (KRISHNAIAH *et al.*, 2016). PRDX6-PLA2 também pode reparar membranas celulares peroxidadas removendo ácidos graxos oxidados e gerando LPC para reaciliação por sua atividade LPCAT. Além disso, PRDX6-PLA2 pode regular a sinalização inflamatória produzindo eicosanóides derivados do ácido araquidônico ou ativando a NADPH oxidase 2 (NOX2) (VÁZQUEZ-MEDINA *et al.*, 2016).

A atividade de PLA2 da PRDX6 também pode ter um papel no desenvolvimento e progressão do câncer. Estudos mostraram que a PRDX6-PLA2 pode promover ou inibir o crescimento, invasão e metástase de células cancerosas, dependendo do contexto (GAO *et al.*, 2021; LU *et al.*, 2019)..

A PRDX6 também foi identificada em algumas espécies de anfíbios, como a enguia japonesa (*Anguilla japonica*) e o sapo-de-unhas-africanas (*Xenopus laevis*). Na enguia japonesa, a PRDX6 é expressa em vários tecidos, incluindo células mucosas da pele, exibindo propriedades antioxidantes potentes e relevância imune contra infecções bacterianas (PRIYATHILAKA *et al.*, 2016). Em *Xenopus laevis*, a PRDX6 é expressa em oócitos e embriões. Ela participa do desenvolvimento precoce, regulando a progressão do ciclo celular e a apoptose (SHAFER; WILLSON;

DAMJANOVSKI, 2011). No entanto, ainda não havia sido relatada a presença de PRDX6 na secreção cutânea de anfíbios.

A PRDX6 também foi identificada em algumas espécies de anfíbios, como a enguia japonesa (*Anguilla japonica*) e o sapo-de-unhas-africanas (*Xenopus laevis*). Na enguia japonesa, a PRDX6 é expressa em vários tecidos, incluindo células mucosas da pele, exibindo propriedades antioxidantes potentes e relevância imune contra infecções bacterianas (PRIYATHILAKA *et al.*, 2016). Em *Xenopus laevis*, a PRDX6 é expressa em oócitos e embriões. Ela participa do desenvolvimento precoce, regulando a progressão do ciclo celular e a apoptose (SHAFER; WILLSON; DAMJANOVSKI, 2011). No entanto, ainda não havia sido relatada a presença de PRDX6 na secreção cutânea de anfíbios.

Uma possível razão para a presença de Prdx6 na secreção cutânea de pererecas-de-capacete é que ela pode ajudar a rã a lidar com estressores ambientais, como radiação UV, patógenos ou toxinas que podem causar danos oxidativos à sua pele. Prdx6 também pode modular a resposta inflamatória da pele da rã a lesões ou infecções. Além disso, Prdx6 pode ter um efeito citotóxico sobre predadores ou competidores potenciais, desestabilizando suas membranas celulares similares a fosfolipases de venenos de serpentes.

A proteína reguladora de glicose de 78 kDa (GRP78) é uma chaperona molecular que reside no retículo endoplasmático (ER) e ajuda no dobramento e controle de qualidade de proteínas (GONZALEZ-GRONOW *et al.*, 2021). GRP78 pertence à família de proteínas de choque térmico de 70 kDa e é induzida por várias condições de estresse celular, como privação de glicose, hipóxia, estresse oxidativo e infecção viral (LEE, 2014). Além disso, GRP78 também desempenha um papel fundamental na regulação da resposta a proteínas não dobradas (UPR), um mecanismo adaptativo celular que restaura a homeostase do ER e protege as células da apoptose (MARTELLI *et al.*, 2020).

Além de suas funções no ER, o GRP78 pode translocar para a superfície celular (csGRP78) em certas circunstâncias e interagir com vários ligantes e receptores que modulam a sinalização, sobrevivência, proliferação, migração e inflamação celular (NI; ZHANG; LEE, 2011). O csGRP78 foi implicado em vários processos patológicos, como entrada viral, progressão do câncer, angiogênese, neurodegeneração e doenças autoimunes (ZHANG *et al.*, 2010).

Os mecanismos subjacentes à translocação do GRP78 do ER para a superfície celular não são totalmente compreendidos, mas podem envolver o tráfego vesicular induzido pelo estresse do ER, a inserção da membrana mediada por raft delipídios ou a clivagem proteolítica do GRP78 (VIG *et al.*, 2019). A regulação da expressão e atividade do csGRP78 pode depender do tipo celular, do estímulo e do microambiente. A modulação do csGRP78 pode ter potencial terapêutico para várias doenças que envolvem estresse do ER e inflamação (DOERFLINGER *et al.*, 2021).

GRP78 também pode ter um papel no sistema imunológico e atividade antimicrobiana. O GRP78 pode ser secretado por macrófagos após a estimulação do lipopolissacarídeo (LPS) e induzir a morte celular em células-alvo, como células cancerosas ou infectadas (DOERFLINGER *et al.*, 2021; HEBBAR *et al.*, 2022). A proteína GRP78 também pode atuar como um receptor de superfície celular para células CAR T que visam células de leucemia mieloide aguda (LMA) sem prejudicar células progenitoras hematopoiéticas normais.

Os anfíbios possuem uma pele altamente permeável que está exposta a vários estressores ambientais, como desidratação, hipóxia, mudanças de temperatura e infecções microbiana 58. Esses estressores podem induzir estresse do ER e ativar a UPR nos tecidos de anfíbios, incluindo a pele (WINNING *et al.*, 1992).. O papel do GRP78 na secreção da pele de anfíbios não está claro, mas pode atuar como um fator protetor contra a morte celular induzida pelo estresse do ER ou como um modulador de respostas imunológicas.

Metanotiol oxidase (MTO) é uma enzima que catalisa a oxidação do metanotiol (CH₃SH), um composto orgânico sulfurado volátil que tem um cheiro característico de repolho podre, para formaldeído (HCHO), sulfeto de hidrogênio (H₂S) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O metanotiol é um produto da degradação da metionina microbiana e é principalmente produzido por bactérias no intestino grosso em mamíferos (SCHMITZ *et al.*, 2022).

O MTO é encontrado em vários organismos, como plantas, fungos, bactérias e animais 70. O MTO tem diferentes funções dependendo do organismo e do contexto. Por exemplo, o MTO pode atuar como uma enzima de desintoxicação que remove o excesso de metanotiol e impede sua acumulação nos tecidos (LI *et al.*, 2020). O MTO também pode modular os níveis de H₂S e H₂O₂, que são moléculas sinalizadoras que regulam vários processos fisiológicos, como vasodilatação, inflamação e apoptose (BAZHANOV *et al.*, 2017). Além disso, o MTO pode participando ciclo do

enxofre convertendo o metanotiol em H₂S, que pode ser posteriormente oxidado ou reduzido por outros microorganismos (LOMANS *et al.*, 2002).

Uma isoforma de MTO foi encontrada em *Xenopus Tropicallis* (Q28CY4_XENTR). Neste estudo, relatamos pela primeira vez a presença de MTO na secreção da pele de uma espécie de anfíbio, *Trachycephalus nigromaculatus*. Uma possível função da metanotiol oxidase na secreção da pele do anfíbio é proteger contra patógenos ou predadores, produzindo formaldeído, sulfeto de hidrogênio e peróxido de hidrogênio, que são substâncias tóxicas ou irritantes (BAZHANOV *et al.*, 2017).

Outra possível função é modular o sistema imunológico ou o processo de cicatrização de feridas, interagindo com outras moléculas bioativas na secreção da pele (SCHMITZ *et al.*, 2022). Além disso, isso pode estar relacionado ao cheiro, já que o metanotiol tem um odor característico, podendo ser produzido por algumas bactérias e fungos que podem colonizar a pele dos anfíbios ou viver em seu ambiente (BARROS *et al.*, 2021). Portanto, a metanotiol oxidase pode ajudar a reduzir ou eliminar o odor desagradável do metanotiol, convertendo-o em substâncias menos voláteis e com menos odor. Isso pode ter algumas vantagens para os anfíbios, como evitar a detecção por predadores ou atrair companheiros.

Ubiquitina é uma proteína de 76 aminoácidos que é expressa ubiquitadamente em células eucarióticas (KOMANDER; RAPE, 2012). Ela pode ser covalentemente ligada a proteínas-alvo através do seu resíduo glicina C-terminal, formando modificações de monoubiquitinação ou poliubiquitinação. A ubiquitinação regula vários processos celulares, como a degradação de proteínas, reparo de DNA, transdução de sinal e autofagia (DAMGAARD, 2021). A ubiquitinação é reversível e é controlada por enzimas desubiquitinantes que removem a ubiquitina dos substratos (CLAGUE; COULSON; URBÉ, 2012). A sinalização da ubiquitina é essencial para a vida eucariótica e sua desregulação está implicada em muitas doenças humanas (DAMGAARD, 2021; KOMANDER; RAPE, 2012).

A poliubiquitinação é a formação de cadeias de moléculas de ubiquitina ligadas por resíduos de lisina específicos ou pela metionina N-terminal da ubiquitina. O tipo e o comprimento da cadeia de poliubiquitina determinam seu papel biológico e sinal. A poliubiquitinação pode direcionar proteínas para degradação pelo proteassoma ou pela autofagia seletiva (LI; YE, 2008). A poliubiquitinação também pode modular a atividade, localização ou interações de proteínas envolvidas em várias vias, como

tolerância a danos no DNA, tráfego endocítico e inflamação (LI;YE, 2008). A poliubiquitinação também pode atuar como um sinal de perigo, ativando receptores imunes inatos que desencadeiam respostas inflamatórias e defesas antimicrobianas.

As secreções da pele de anfíbios são ricas em moléculas bioativas que servem a diversas funções defensivas contra predadores, patógenos e estressores ambientais (BARROS *et al.*, 2021). A presença de Ubiquitina e poliubiquitina pode contribuir para essas funções, modulando a atividade, estabilidade ou interações de outras moléculas nas secreções (KOMANDER; RAPE, 2012).

AHCY (adenosil homocisteína hidrolase) é uma enzima que catalisa a reação reversível da S-adenosilhomocisteína (SAH) em homocisteína e adenosina (VIZÁN; DI CROCE; ARANDA, 2021). AHCY é uma proteína altamente conservada em organismos vivos, desde bactérias até mamíferos, desempenhando um papel chave no controle das metilações, já que a SAH é um inibidor potente de metiltransferases dependentes de SAM, que transferem grupos metil para vários substratos celulares, como DNA, RNA e proteínas (CHICCO; SANAVIA; JURMAN, 2023). AHCY também está envolvida no ciclo metabólico de um carbono, que regula a biossíntese de purinas, timidina, cisteína, serina e metionina (VIZÁN; DI CROCE; ARANDA, 2021).

Em anfíbios, AHCY foi detectada em vários tecidos de *Xenopus laevis*, como cérebro, coração, fígado, rim e pele e também está presente nas secreções cutâneas de *Xenopus laevis* e outras espécies de anfíbios (SEERY *et al.*, 1994)]. Por exemplo, AHCY pode regular a atividade de peptídeos antimicrobianos ou outras moléculas bioativas que são metiladas por metiltransferases dependentes de SAM e também pode modular a resposta inflamatória da pele de anfíbios afetando os níveis de adenosina e homocisteína (CHEN *et al.*, 2022; ZASLOFF, 1987). Em resumo, AHCY é uma enzima versátil que participa de múltiplas vias metabólicas e processos epigenéticos em anfíbios.

Isocitrato desidrogenase (IDH) é uma enzima que catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato, produzindo alfa-cetoglutarato (α -cetoglutarato) e CO₂ (FUJII *et al.*, 2016). Este é um processo de duas etapas, que envolve a oxidação do isocitrato (um álcool secundário) para oxalosuccinato (uma cetona), seguida da descarboxilação do grupo carboxila beta para acetona, formando o alfa-cetoglutarato¹⁰³. IDH existe em três isoformas: IDH3 catalisa a terceira etapa do ciclo do ácido cítrico enquanto converte NAD⁺ em NADH nas mitocôndrias. As isoformas IDH1 e IDH2 catalisam a

mesma reação fora do contexto do ciclo do ácido cítrico e usam NADP⁺ como cofator em vez de NAD⁺ (CHAKRAVARTY *et al.*, 2013).

Mutações no IDH foram encontradas em vários tipos de câncer, como glioma, leucemia mieloide aguda (AML), colangiocarcinoma e condrossarcoma. As mutações no IDH1 e IDH2 produzem uma enzima anormal que converte o alfa-cetoglutarato em 2-hidroxioglutarato, um metabólito que promove a tumorigênese e a progressão maligna. As mutações no IDH estão associadas a uma idade mais jovem no diagnóstico e um melhor prognóstico em alguns tipos de gliomas (TREMBATH, 2017).

O papel do IDH em anfíbios e suas secreções cutâneas não é bem compreendido. No entanto, alguns estudos sugerem que o IDH pode estar envolvido na biossíntese de peptídeos que possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antivirais e antitumorais (CHAKRAVARTY *et al.*, 2013; TREMBATH, 2017).

O fator de alongação 1-alfa (EF1 α) é uma proteína que desempenha um papel fundamental na síntese de proteínas, entregando aminoacil-tRNAs ao ribossomo. O EF1 α é altamente conservado em todos os três domínios da vida e pertence à superfamília de translacional GTPases (TALAPATRA; WAGNER; THOMPSON, 2002). Em eucariotos, o EF1 α tem duas isoformas: EF1 α -1 e EF1 α -2, que são codificadas por diferentes genes e têm diferentes padrões de expressão tecidual. O EF1 α -1 é mais amplamente expresso do que o EF1 α -2, que é encontrado principalmente no cérebro, coração e músculo esquelético (ÁLVAREZ; WENDEL, 2003; INFANTE *et al.*, 2008).

Algumas proteínas relacionadas, como EF1 γ (WU *et al.*, 2011) e EF2 (BAI *et al.*, 2013), foram detectadas na secreção cutânea de algumas espécies de anfíbios. Essas proteínas podem ter algumas funções na regulação da síntese proteica, sinalização celular ou resposta imunológica na pele. Além disso, alguns peptídeos derivados de precursores de EF1 α foram identificados na secreção cutânea de algumas espécies de anfíbios (BRUNETTI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2012). Esses peptídeos podem ter atividades antimicrobianas ou anti-predatórias na pele. Portanto, é possível que EF1 α ou seus derivados também estejam presentes ou tenham algumas funções na secreção cutânea de anfíbios, mas mais pesquisas são necessárias para confirmar esta hipótese.

A triose fosfato isomerase (TPI) é uma enzima que catalisa a interconversão reversível dos isômeros de triose fosfato diidroxiacetona fosfato (DHAP) e D-

gliceraldeído 3-fosfato (GAP), que desempenha um papel importante na glicólise e na gliconeogênese, que são vias metabólicas que produzem e consomem energia (MYERS; PALLADINO, 2023). A TPI também está envolvida no metabolismo lipídico e na síntese de fosfolípidios, pois o DHAP pode ser convertido em glicerol 3-fosfato, um precursor de triglicerídeos e fosfolípidios (HELLIWELL, 2021).

A TPI está amplamente distribuída em organismos vivos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. No entanto, algumas bactérias que não realizam glicólise não possuem TPI. Em humanos, mutações no gene da TPI podem causar uma doença rara e grave chamada deficiência de isomerase de triosefosfato (TPIDf), que é caracterizada por anemia hemolítica crônica e disfunção neurológica progressiva (LIU *et al.*, 2017; WIERENGA; KAPETANIOU; VENKATESAN, 2010). A TPI pode ter diferentes funções em diferentes tecidos, dependendo da demanda metabólica e das condições ambientais. Por exemplo, a TPI pode ajudar a regular o equilíbrio osmótico e o transporte de água na em tecidos, modulando os níveis de glicerol 3-fosfato (MYERS; PALLADINO, 2023). A TPI também pode facilitar a replicação do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), um patógeno que infecta crustáceos e anfíbios, interagindo com proteínas virais e aumentando a expressão gênica viral (HELLIWELL, 2021).

O papel do TPI nas secreções de pele de anfíbios não é muito claro, mas alguns estudos sugerem que ele pode ter efeitos protetores ou moduladores na pele ou nas moléculas secretadas. Por exemplo, TPI pode atuar como um antioxidante ou um chaperone molecular para prevenir danos oxidativos ou agregação de proteínas (LIU *et al.*, 2021). Alternativamente, TPI pode modular a atividade ou estabilidade de outras moléculas bioativas, como peptídeos antimicrobianos, bradicininas, peptídeos liberadores de insulina e outros peptídeos que têm vários papéis defensivos ou regulatórios contra patógenos ou predadores (LIU *et al.*, 2015; MYERS; PALLADINO, 2023).

Anntoxin é uma neurotoxina peptídica de 60 resíduos, que foi identificada pela primeira vez em anfíbios (YOU *et al.*, 2009). Ela atua como um inibidor do canal de sódio voltagem-dependente sensível à tetrodotoxina (TTX-S), que está envolvido na transmissão da dor (WEI *et al.*, 2011). Anntoxin também possui atividade anti-tripsina e homologia com as toxinas do tipo Kunitz, que são encontradas em répteis e peixes. Anntoxin é expressa em vários tecidos do sapo *Hyla annectans*, especialmente na pele, onde pode servir como um mecanismo de defesa contra predadores (YOU *et al.*,

2009). Além disso, anntoxin demonstrou ter efeitos analgésicos e anti-inflamatórios em modelos animais de dor inflamatória eneuropática, reduzindo as secreções de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (WEI *et al.*, 2011).

Anntoxin possui uma estrutura tridimensional semelhante às toxinas do tipo Kunitz, porém a terceira ponte dissulfeto típica das toxinas do tipo Kunitz está ausente em anntoxin. A superfície da molécula apresenta uma distribuição assimétrica de cargas elétricas, sendo a região N-terminal mais positiva e a região C-terminal mais negativa. Essa característica pode estar relacionada com a interação de anntoxin com o canal de sódio e a trypsin. A análise filogenética de anntoxin e outras peptídeos que contêm repetições do tipo Kunitz revelou que anntoxin é mais próxima das toxinas dendrotoxinas de serpentes do que das toxinas de peixes ou mamíferos. Isso sugere uma possível origem evolutiva comum entre as neurotoxinas de anfíbios e répteis (CHAI *et al.*, 2021; WEI *et al.*, 2011; YOU *et al.*, 2009).

A secreção da pele dos anfíbios é uma fonte rica de peptídeos bioativos que desempenham um papel na defesa contra a invasão microbiana, o estresse oxidativo e a radiação UV (DEMORI *et al.*, 2019; PATOCKA *et al.*, 2019). Peptídeos são cadeias curtas de aminoácidos que podem ter vários efeitos biológicos dependendo de sua estrutura e função. Alguns peptídeos são antimicrobianos, ou seja, podem matar ou inibir o crescimento de bactérias, fungos, protozoários e vírus (ZASLOFF, 2002). Outros são antioxidantes, ou seja, podem proteger as células dos danos causados pelos radicais livres (ROS) (FENG *et al.*, 2021). Peptídeos também podem modular as respostas imunes, a inflamação, a cicatrização de feridas e outros processos fisiológicos (PATOCKA *et al.*, 2019).

Um dos métodos para identificar e caracterizar peptídeos da secreção da pele de anfíbios é a dessorção/ionização assistida por matriz (MALDI), que é um tipo de espectrometria de massa que permite a detecção de moléculas com base em sua relação massa/carga (KARAS; HILLENKAMP, 1988). A técnica MALDI pode ser usada para analisar misturas complexas de peptídeos e proteínas sem separação ou purificação prévias e também pode fornecer informações sobre a sequência, estrutura e modificações pós-traducionais dos peptídeos (KJELDSSEN *et al.*, 2003).

Para lidar com diversos desafios e patógenos ambientais, os anfíbios evoluíram um sistema complexo e diverso de secreções cutâneas que contêm uma variedade de moléculas bioativas, como mucinas, mucopolissacarídeos, alcaloides, esteroides, aminas biogênicas e peptídeos (XU; LAI, 2015). Entre essas moléculas, os peptídeos

são os componentes mais abundantes e diversos das secreções cutâneas dos anfíbios e têm atraído considerável atenção por suas potenciais aplicações em biotecnologia e medicina (DEMORI *et al.*, 2019) Os peptídeos isolados das secreções cutâneas dos anfíbios têm demonstrado diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, analgésica, neuroativa, liberadora de insulina e semelhante à bradiginina (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; CONLON *et al.*, 2014; GUO *et al.*, 2014). Esses peptídeos são sintetizados nas glândulas granulares da derme e armazenados em vesículas secretoras até serem liberados mediante estímulo ou lesão (BRUNETTI *et al.*, 2018)

Os peptídeos presentes na secreção de anfíbios geralmente são curtos (5 a 50 aminoácidos), lineares ou cíclicos, catiônicos ou aniônicos, e frequentemente contêm modificações pós-traducionais como pontes dissulfeto, amidação, glicosilação, fosforilação ou hidroxilação (GUO *et al.*, 2014). A estrutura e a função desses peptídeos são influenciadas por diversos fatores como espécie, habitat, dieta, estação, sexo, idade, nível de estresse e flora microbiana (WANG *et al.*, 2012). Alguns desses peptídeos foram identificados e caracterizados a partir de diferentes espécies de pererecas-de-capacetes, como *Aparasphenodon brunoi* e *Corythomantis greeningi*, com atividade antimicrobiana, citotóxica, hemolítica e de fosfolipase A2 descritas. (BLOTTO *et al.*, 2021a; FUSCO *et al.*, 2020; MENDES *et al.*, 2016), O mecanismo de ação sugerido é baseado primariamente em perturbação da membrana celular ou modulação de alvos intracelulares (CONLON; KOLODZIEJEK; NOWOTNY, 2009; ROLLINS-SMITH; CONLON, 2005)

Assim, o estudo dos peptídeos provenientes da secreção cutânea do *Trachycephalus nigromaculatus* pode fornecer informações valiosas sobre a evolução e a diversidade das secreções da pele dos anfíbios, bem como suas potenciais aplicações em biotecnologia e medicina. Esses peptídeos podem ser usados como agentes antimicrobianos naturais ou como modelos para projetar novos análogos sintéticos com propriedades melhoradas e menor toxicidade Além disso, esses peptídeos também podem servir como ferramentas para investigar a relação estrutura-função e o mecanismo de ação de moléculas bioativas

5.2 Avaliação dos efeitos tóxicos *in vivo* e *in vitro*

A microscopia intravital é uma técnica que permite visualizar as células e o endotélio em tempo real e em seu ambiente fisiológico, sem necessidade de fixação ou coloração dos tecidos (BENJAMIN *et al.*, 2018). Essa técnica tem sido amplamente utilizada para estudar os mecanismos moleculares e celulares envolvidos nas interações inflamatórias, bem como para avaliar os efeitos de diferentes fatores e tratamentos sobre esses processos (MULLER *et al.*, 2010).

Um dos principais eventos das interações inflamatórias é a adesão das células sanguíneas, especialmente os leucócitos, ao endotélio ativado por estímulos inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e produtos microbianos (CHEN *et al.*, 2019). Essa adesão envolve a expressão e a regulação de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais e dos leucócitos, como as selectinas, as integrinas e as imunoglobulinas (LEY *et al.*, 2007). A microscopia intravital permite quantificar o número e a velocidade das células que rolam e aderem ao endotélio, bem como observar a morfologia e a deformação das células durante esse processo.

Após a adesão, os leucócitos transmigram através do endotélio para o espaço intersticial, onde podem exercer suas funções efetoras, como fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios e apresentação de antígenos. A transmigração pode ocorrer por dois mecanismos: paracelular, quando os leucócitos passam pelas junções entre as células endoteliais; ou transcelular, quando os leucócitos atravessam o citoplasma das células endoteliais. A microscopia intravital permite visualizar esses mecanismos em diferentes leitos vasculares e sob diferentes condições inflamatórias (CARMAN; SPRINGER, 2004).

As interações inflamatórias entre as células e o endotélio também podem afetar a função vascular, alterando o tônus, a permeabilidade e a angiogênese. A microscopia intravital permite medir esses parâmetros em diferentes modelos experimentais, como isquemia-reperfusão, hipertensão, diabetes e sepse (SCHULZ *et al.*, 2015).

Além dos agentes infecciosos e das lesões teciduais, as interações inflamatórias entre as células e o endotélio também podem ser moduladas por toxinas animais, como as produzidas por artrópodes, anfíbios, répteis e peixes. Essas toxinas possuem uma grande diversidade estrutural e funcional, podendo atuar em diferentes alvos moleculares nas células endoteliais e nos leucócitos, alterando a expressão de

moléculas de adesão, a liberação de mediadores inflamatórios, a permeabilidade vascular e a angiogênese (GIAMPETRAGLIA *et al.*, 2021)

A microscopia intravital tem sido utilizada para investigar os efeitos de toxinas animais nas interações inflamatórias *in vivo*, em diferentes modelos experimentais. Por exemplo, alguns estudos demonstraram que a toxina crotoxina, extraída do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, induz uma forte resposta inflamatória no músculo esquelético de camundongos, caracterizada por um aumento da adesão e da transmigração de leucócitos ao endotélio capilar, bem como por uma elevação da permeabilidade vascular e da expressão de moléculas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e ICAM-1 (SANTOS *et al.*, 2014; ZOCCAL *et al.*, 2016). Neste estudo, demonstro pela primeira vez que a secreção do *Trachycephalus nigromaculatus* foi capaz de induzir efeitos altamente danosos ao tecido conjuntivo do músculo cremaster de camundongos, além de aumentar a adesão e migração celular em aplicação tópica e injetável. Também produziu uma vasodilatação significativa, ou seja, um aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos. Esses resultados sugerem que a secreção do *Trachycephalus nigromaculatus* tem um potencial de causar inflamação e lesão tecidual, podendo afetar a função e a integridade do tecido conjuntivo.

Apesar de, à primeira vista, a caracterização bioquímica da secreção não apontar toxinas com tal efeito, como demonstrado anteriormente, existe uma grande presença de hialuronidases na secreção. Essas enzimas têm sido descritas em microrganismos, tumores malignos e em peçonhas de animais. Nas peçonhas, a hialuronidase é considerada um fator de dispersão, pois facilita a difusão de outros componentes tóxicos no tecido alvo. A hialuronidase pode degradar a matriz extracelular do tecido conjuntivo, alterando sua estrutura e função. Além disso, a hialuronidase pode aumentar a permeabilidade vascular e facilitar a migração celular, contribuindo para o processo inflamatório e lesivo. Portanto, a hialuronidase presente na secreção do *Trachycephalus nigromaculatus* pode ser um dos fatores responsáveis pelos efeitos observados no tecido conjuntivo do músculo cremaster de camundongos. No entanto, outros componentes da secreção podem ter papel importante nessa resposta, como peptídeos, proteases e lectinas. Mais estudos são necessários para identificar e caracterizar os componentes químicos e as vias moleculares envolvidos nesses processos.

Esses achados corroboram com estudos utilizando toxinas de outros animais. Por exemplo, a toxina melitina, presente no veneno da abelha *Apis mellifera*, provoca

uma intensa reação inflamatória na pata traseira de ratos, evidenciada por um aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos, da adesão e da migração de leucócitos ao endotélio venular e da produção de óxido nítrico (NO) (KIM *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2010). A melitina também foi capaz de induzir a formação de novos vasos sanguíneos no tecido subcutâneo de camundongos, através da estimulação da expressão de fatores angiogênicos, como VEGF e FGF-2 (LEE *et al.*, 2011).

Por outro lado, algumas toxinas animais podem apresentar efeitos anti-inflamatórios ou protetores sobre o endotélio vascular. Por exemplo, a toxina epibatidina, isolada da pele do anfíbio *Epipedobates tricolor*, exerceu um efeito inibitório sobre a adesão de leucócitos ao endotélio arterial de ratos, mediado pela ativação dos receptores nicotínicos colinérgicos (CHEN *et al.*, 2005). Da mesma forma, a toxina tetrodotoxina, encontrada em diversos peixes venenosos, como o baiacu, reduziu a adesão e a migração de leucócitos ao endotélio venular de ratos, através da inibição dos canais de sódio voltagem-dependentes (CHEN *et al.*, 2007).

5.3 Atividade antimicrobiana

A secreção cutânea de anfíbios é uma fonte rica de moléculas bioativas com diversas atividades biológicas, como propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitárias, antitumorais e analgésicas (XU; LAI, 2015). Neste estudo, testamos a secreção cutânea de *Trachycephalus nigromaculatus* três patógenos comuns: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Os resultados mostraram que o veneno bruto apresentou uma boa atividade contra *C. albicans* (53,86% de inibição), e uma atividade moderada contra *S. aureus* (22,04% de inibição) e *S. coli* (43,26% de inibição). Entre as frações testadas, as que apresentaram maior atividade foram T06, T07 e T08, com mais de 50% de inibição para os três microrganismos. Essas frações podem conter peptídeos ou proteínas com amplo espectro antimicrobiano, semelhantes aos encontrados em outros venenos de anfíbios (ASHCROFT *et al.*, 2007; CONLON; KOLODZIEJEK; NOWOTNY, 2009; LIU *et al.*, 2013).

Algumas frações apresentaram atividade específica para um determinado microorganismo, como T01 e T02 para *S. aureus*, T04 para *S. coli* e T03 para *C. albicans*. Essas frações podem conter peptídeos ou proteínas com alvos moleculares específicos, como receptores ou enzimas, que interferem no metabolismo ou na fisiologia dos microrganismos (CONLON *et al.*, 2014; RÁDIS- BAPTISTA, 2021). A

especificidade em antimicrobianos é importante porque pode reduzir os efeitos colaterais e a resistência bacteriana ao tratamento.

Esses resultados indicam que o *T. nigromaculatus* tem um amplo potencial antimicrobiano que poderia ser útil para o desenvolvimento de novos medicamentos ou terapias contra doenças infecciosas.

Uma possível explicação para o fato de que algumas frações apresentaram maior atividade contra alguns dos microrganismos do que o veneno bruto é que elas contêm moléculas que interferem com a atividade antimicrobiana de outras moléculas presentes no veneno bruto. Por exemplo, alguns venenos de animais contêm moléculas que se ligam aos peptídeos antimicrobianos e reduzem sua eficácia ou estabilidade (YACOUB *et al.*, 2020). Essas moléculas podem ter um papel na regulação da liberação ou da ação dos peptídeos antimicrobianos, ou na proteção do animal contra os efeitos tóxicos dos seus próprios venenos. Alguns exemplos de moléculas que podem interferir com a atividade antimicrobiana de peptídeos são as acilpoliaminas, as fosfolipases A2 e as metaloproteínas (LAMIYAN; DALAL; KUMAR, 2020; PERUMAL SAMY *et al.*, 2017)

Outra possível explicação para o fato de que algumas frações apresentaram maior atividade contra alguns dos microrganismos do que o veneno bruto é que elas contêm moléculas que potencializam a atividade antimicrobiana de outras moléculas presentes no veneno bruto. Alguns exemplos de moléculas que podem potencializar a atividade antimicrobiana de peptídeos são as lectinas, as hialuronidases e as neurotoxinas (PERUMAL SAMY *et al.*, 2017; ZASLOFF, 2002)

A atividade antimicrobiana da secreção cutânea dos *pererecas-de-capacetes* como o *Trachycephalus nigromaculatus* é importante para sua sobrevivência em seus habitats naturais, onde são expostos a vários patógenos e predadores. A secreção cutânea fornece uma barreira química que protege as pererecas contra infecções microbianas e dissuade potenciais predadores de atacá-las (TOLEDO; SAZIMA; HADDAD, 2011). Além disso, a secreção cutânea também pode desempenhar um papel na comunicação e interações sociais entre os conspecíficos, como defesa territorial, comportamento de acasalamento e cuidado parental (WELLS, 2007).

A diversidade e complexidade da secreção cutânea das pererecas-de-capacete refletem sua adaptação a diferentes nichos ecológicos e pressões evolutivas. Portanto, estudar a secreção cutânea das pererecas pode não apenas

revelar novos conhecimentos sobre sua biologia e ecologia, mas também fornecer pistas valiosas para descoberta de medicamentos e aplicações de biotecnologia, como visto pela caracterização bioquímica e promissora atividade antimicrobiana apresentada aqui na secreção cutânea do *Trachycephalus nigromaculatus* .

6 CONCLUSÕES

A pesquisa desenvolvida proporcionou uma compreensão da secreção cutânea do *Trachycephalus nigromaculatus*, evidenciando sua complexidade por meio da identificação de uma ampla variedade de compostos de alta e baixa massa molecular, e seus relevantes efeitos tóxicos *in vivo* e *in vitro*. Além disso, destaca-se também a atividade antimicrobiana da secreção, revelando sua eficácia contra bactérias, como *S. aureus* e *S. coli*, bem como contra o fungo *C. albicans*. Não apenas a secreção bruta, mas também diversos picos e intertempos isolados demonstraram essa notável capacidade antimicrobiana.

Contudo, reconhecemos a necessidade de investigações mais abrangentes para a identificação e caracterização precisa dos componentes ativos presentes na secreção. Além disso, compreender os mecanismos de ação e toxicidade destas substâncias é crucial para garantir sua segurança e eficácia em futuras aplicações biomédicas. Acreditamos que este trabalho não apenas contribui significativamente para o entendimento da biologia do *Trachycephalus nigromaculatus*, mas também serve como um estímulo para pesquisas futuras sobre as secreções cutâneas de anfíbios com estratégias defensivas semelhantes.

REFERÊNCIAS¹

- ÁLVAREZ, I.; WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 417–434, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2).
- AREVALO, José A.; VÁZQUEZ-MEDINA, José Pablo. The Role of Peroxiredoxin 6 in Cell Signaling. **Antioxidants** (Basel, Switzerland), Switzerland, v. 7, n. 12, 2018. DOI: 10.3390/antiox7120172.
- ASHCROFT, Jonathan W.; ZALINGER, Zachary B.; BEVIER, Catherine R.; FEKETE, Frank A. Antimicrobial properties of two purified skin peptides from the mink frog (*Rana septentrionalis*) against bacteria isolated from the natural habitat. Comparative biochemistry and physiology. **Toxicology & pharmacology** : CBP, [S. l.], v. 146, n. 3, p. 325–30, 2007. DOI: 0.1016/j.cbpc.2007.04.003.
- BAEK, Kyung-Hwa; ZHANG, Haiying; LEE, Bo Ryeong; KWON, Young-Guen; HA, Sang-Jun; SHIN, Injae. A small molecule inhibitor for ATPase activity of Hsp70 and Hsc70 enhances the immune response to protein antigens. **Scientific reports**, England, v. 5, p. 17642, 2015. DOI: 10.1038/srep17642.
- BAI, Bing; ZHANG, Yingqi; WANG, Hui; ZHOU, Mei; YU, Yang; DING, Sijia; CHEN, Tianbao; WANG, Lei; SHAW, Chris. Parallel peptidome and transcriptome analyses of amphibian skin secretions using archived frozen acid-solvated samples. **Molecular biotechnology**, United States, v. 54, n. 2, p. 187–197, 2013. DOI: 10.1007/s12033-012-9551-6.
- BARROS, Ana L. A. N.; HAMED, Abdelaaty; MARANI, Mariela; MOREIRA, Daniel C.; EATON, Peter; PLÁCIDO, Alexandra; KATO, Massuo J.; LEITE, José Roberto S. A. The Arsenal of Bioactive Molecules in the Skin Secretion of Urodele Amphibians. **Frontiers in pharmacology**, Switzerland, v. 12, p.810821, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.810821.
- BAZHANOV, Nikolay; ANSAR, Maria; IVANCIUC, Teodora; GAROFALO, Roberto P.; CASOLA, Antonella. Hydrogen Sulfide: A Novel Player in Airway Development, Pathophysiology of Respiratory Diseases, and Antiviral Defenses. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, [S. l.], v. 57, n. 4, p. 403–410, 2017. DOI: 10.1165/rcmb.2017-0114TR.
- BENJAMIN, C. L. *et al.* Intravital microscopy of the peripheral lymph node microvasculature in the mouse. **Journal of Immunological Methods**, v. 459, p. 76-82, 2018.
- BLOTTO, Boris L. *et al.* The phylogeny of the Casque-headed Treefrogs (Hylidae: Hylinae: Lophophyllini). **Cladistics: the international journal of the Willi Hennig Society**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 36–72, 2021. a. DOI: 10.1111/cla.12409.
- BORDON, Karla de Castro Figueiredo *et al.* From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. **Frontiers in pharmacology**, Switzerland, v. 11, p. 1132, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.01132.
- BRUNETTI, Andrés E.; HERMIDA, Gladys N.; IURMAN, Mariana G.; FAIVOVICH, Julián. Odorous secretions in anurans: morphological and functional assessment of serous glands as a source of volatile compounds in the skin of the treefrog *Hypsiboas pulchellus* (Amphibia: Anura: Hylidae). **Journal of anatomy**, England, v. 228, n. 3, p. 430–442, 2016. DOI: 10.1111/joa.12413.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2023

- BRUNETTI, Andrés E.; MARANI, Mariela M.; SOLDI, Rafael A.; MENDONÇA, Jacqueline Nakau; FAIVOVICH, Julián; CABRERA, Gabriela M.; LOPES, Norberto P. Cleavage of Peptides from Amphibian Skin Revealed by Combining Analysis of Gland Secretion and in Situ MALDI Imaging Mass Spectrometry. **ACS omega**, United States, v. 3, n. 5, p. 5426–5434, 2018. DOI: 10.1021/acsomega.7b02029.
- BURKE, John E.; DENNIS, Edward A. Phospholipase A2 biochemistry. **Cardiovascular drugs and therapy**, United States, v. 23, n. 1, p. 49–59, 2009. DOI: 10.1007/s10557-008-6132-9.
- BUSTILLO, Soledad. Biochemical characterization and cytotoxic effect of the skin secretion from the red-spotted Argentina frog *Argenteohyla siemersi* (Anura: Hylidae). **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 26, 2020. DOI: 10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0078.
- BUTTNER, Shannon M.; STEPANOVA, Natasha; WOMACK, Molly C. Evolution of the Unique Anuran Pelvic and Hind limb Skeleton in Relation to Microhabitat, Locomotor Mode, and Jump Performance. **Integrative and comparative biology**, England, v. 60, n. 5, p. 1330–1345, 2020. DOI: 10.1093/icb/icaa043.
- CALVETE, J. J. (2017). Venomics: integrative venom proteomics and beyond. **Biochem J.**, 474(5), 611-634. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160577>. PMID: 28219972.
- CAMPBELL, Jonathan A.; WHEELER, Ward C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, [S. l.], n. 294, p. 1–227, 2005. DOI: 10.1206/0003-0090(2005)294[0001:srotff]2.0.co;2.
- CARMAN, C.V.; SPRINGER, T.A. Transcellular migration: a leukocyte's journey via endothelial cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 532-536, 2004.
- CHAI, Longhui; YIN, Chuanlin; KAMAU, Peter Muiruri; LUO, Lei; YANG, Shilong; LU, Xiancui; ZHENG, Dong; WANG, Yunfei. Toward an understanding of tree frog (*Hyla japonica*) for predator deterrence. **Amino Acids**, [S. l.], v. 53, n. 9, p. 1405–1413, 2021. DOI: 10.1007/s00726-021-03037-0.
- CHAKRAVARTY, Sumana; REDDY, Bommana R.; SUDHAKAR, Sreesha R.; SAXENA, Sandeep; DAS, Tapatee; MEGHAH, Vuppapapaty; BRAHMENDRASWAMY, Cherukuvada V.; KUMAR, Arvind; IDRIS, Mohammed M. Chronic Unpredictable Stress (CUS)-Induced Anxiety and Related Mood Disorders in a Zebrafish Model: Altered Brain Proteome Profile Implicates Mitochondrial Dysfunction. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 5, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0063302.
- CHEN *et al.* Epibatidine inhibits leukocyte adhesion to arterial endothelium through activation of nicotinic receptors on endothelial cells in vivo: an intravital microscopic study in mice and rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, n. 7, p. 1019-1027, 2005.
- CHEN, L. *et al.* Endothelial cell activation and dysfunction in the pathogenesis of sepsis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2568, 2019.
- CHEN, Xi *et al.* Peptides Isolated from Amphibian Skin Secretions with Emphasis on Antimicrobial Peptides. **Toxins**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 722, 2022. DOI: 10.3390/toxins14100722. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/14/10/722>.
- CHEN, Y.H. *et al.* Epibatidine inhibits leukocyte adhesion to arterial endothelium through activation of nicotinic receptors on endothelial cells in vivo: an intravital microscopic study in mice and rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, n. 7, p. 1019-1027, 2005.

- CHEN, Y.H. *et al.* Tetrodotoxin inhibits leukocyte rolling and adhesion in the microcirculation through blockade of sodium channels on endothelial cells and leukocytes in vivo: an intravital microscopic study in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 8, p. 1239-1248, 2007.
- CHICCO, Davide; SANAVIA, Tiziana; JURMAN, Giuseppe. Signature literature review reveals AHCY, DPYSL3, and NME1 as the most recurrent prognostic genes for neuroblastoma. **BioData mining**, England, v. 16, n. 1, p. 7, 2023. DOI: 10.1186/s13040-023-00325-1.
- CLAGUE, Michael J.; COULSON, Judy M.; URBÉ, Sylvie. Cellular functions of the DUBs. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 125, n. 2, p. 277–286, 2012. DOI: 10.1242/jcs.090985.
- CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. Biological reviews of the Cambridge **Philosophical Society**, England, v. 72, n. 3, p. 365–379, 1997. DOI: 10.1017/s0006323197005045.
- CONCEIÇÃO, Katia; KONNO, Katsuhiko; RICHARDSON, Michael; ANTONIAZZI, CONLON, J. Michael. The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. **Cell and tissue research**, Germany, v. 343, n. 1, p. 201–212, 2011. DOI: 10.1007/s00441-010-1014-4.
- CONLON, J. Michael; KOLODZIEJEK, Jolanta; NOWOTNY, Norbert. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. **Biochimica et biophysica acta**, [S. l.], v. 1788, n. 8, p. 1556–63, 2009. DOI:
- CONLON, J. Michael; MECHKARSKA, Milena; LUKIC, Miodrag L.; FLATT, Peter R. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. **Peptides**, [S. l.], v. 57, p. 67–77, 2014. DOI: 10.1016/j.peptides.2014.04.019.
- DA SILVA, S. L.; ROWAN, E. G.; ALBERICIO, F.; STÁBELI, R. G.; CALDERON, L. A.; SOARES, A. M. Animal toxins and their advantages in biotechnology and pharmacology. **BioMed research international**, United States, 2014. DOI: 10.1155/2014/951561.
- DALY *et al.* An overview of the chemistry and pharmacology of the skin secretions of poison frogs (Family Dendrobatidae). **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 8, p. 757-771, 2005.
- DAMGAARD, Rune Busk. The ubiquitin system: from cell signalling to disease biology and new therapeutic opportunities. **Cell death and differentiation** England, 2021. DOI: 10.1038/s41418-020-00703-w.
- DAS, Bhabana; SAVIOLA, Anthony J.; MUKHERJEE, Ashis K. Biochemical and Proteomic Characterization, and Pharmacological Insights of Indian Red Scorpion Venom Toxins. **Frontiers in pharmacology**, Switzerland, v. 12, p. 710680, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.710680.
- DE OLIVEIRA, Amanda A.; PRIVIERO, Fernanda; TOSTES, Rita C.; WEBB, R. Clinton; NUNES, Kenia P. Dissecting the interaction between HSP70 and vascular contraction. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1420, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-80966-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-80966-6>.
- DEMORI, Ilaria *et al.* Peptides for Skin Protection and Healing in Amphibians. **Molecules** (Basel, Switzerland), Switzerland, v. 24, n. 2, 2019. DOI: 10.3390/molecules24020347.
- DI NICOLA, Matteo R.; PONTARA, Andrea; KASS, George E. N.; KRAMER, Nynkel.; AVELLA, Ignazio; PAMPENA, Riccardo; MERCURI, Santo Raffaele; DORNE, Jean Lou C. M.; PAOLINO, Giovanni. Vipers of Major clinical relevance in Europe: Taxonomy,

- venom composition, toxicology and clinical management of human bites. **Toxicology**, [S. l.], v. 453, p. 152724, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152724>
- DOERFLINGER, Marcel *et al.* Circulating BiP/Grp78 is a novel prognostic marker for sepsis-mediated immune cell death. **The FEBS journal**, England, v. 288, n. 6, p. 1809–1821, 2021. DOI: 10.1111/febs.15552.
- DUTERTRE, Sébastien. Venomics in medicinal chemistry. **Future medicinal chemistry**, England, 2014. DOI: 10.4155/fmc.14.117.
- FAIVOVICH, Julián; HADDAD, Célio F. B.; GARCIA, Paulo C. A.; FROST, Darrel R.; FENG, Guizhu; WU, Jing; YANG, Hai-Long; MU, Lixian. Discovery of Antioxidant Peptides from Amphibians: A Review. **Protein and peptide letters**, Netherlands, v. 28, n. 11, p. 1220–1229, 2021. DOI: 10.2174/0929866528666210907145634.
- FISHER, Aron B.; DODIA, Chandra; SOROKINA, Elena M.; LI, Haitao; ZHOU, Suiping; RAABE, Tobias; FEINSTEIN, Sheldon I. A novel lysophosphatidylcholine acyl transferase activity is expressed by peroxiredoxin 6. **Journal of lipid research**, United States, v. 57, n. 4, p. 587–596, 2016. DOI: 10.1194/jlr.M064758.
- FRANCO, O. L.; DALY, N. L.; CRAIK, D. J. In vivo efficacy of anuran trypsin inhibitory peptides against staphylococcal skin infection and the impact of peptide cyclization. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, United States, v. 59, n. 4, p. 2113–2121, 2015. DOI: 10.1128/AAC.04324-14.
- FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1. **American Museum of Natural History**, New York, USA, [S. l.], 2021. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- FUJII, Takeo; KHAWAJA, Muhammad Rizwan; DINARDO, Courtney D.; ATKINS, Johnique T.; JANKU, Filip. Targeting isocitrate dehydrogenase (IDH) in cancer. **Discovery medicine**, United States, v. 21, n. 117, p. 373–380, 2016.
- FUSCO, Luciano S.; CAJADE, Rodrigo; PIÑEIRO, Jose M.; TORRES, Ana M.; DA SILVA, Igor R. F.; HYSLOP, Stephen; LEIVA, Laura C.; PIMENTA, Daniel C.; GAO, Lei *et al.* Integrative analysis the characterization of peroxiredoxins in pan- cancer. **Cancer Cell International**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 366, 2021. DOI: 10.1186/s12935-021-02064-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02064-x>.
- GARBINO, Guilherme S. T.; DA SILVA, Leonardo Henrique; AMARAL, Rodrigo Gonçalves; REZENDE, Gabriela Cabral; PEREIRA, Vinicius J. A.; CULOT, Laurence. Predation of treefrogs (Anura: Hylidae) with toxic skin secretions by the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*, Callitrichinae). **Primates**, [S. l.], v. 61, n. 4, p. 567–572, 2020. DOI: 10.1007/s10329-020-00818-1. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10329-020-00818-1>.
- GERICK, Alyssa A.; MUNSHAW, Robin G.; PALEN, Wendy J.; COMBES, Stacey A.; O'REGAN, Sacha M. Thermal physiology and species distribution models reveal climate vulnerability of temperate amphibians. **Journal of Biogeography**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 713–723, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/jbi.12261>.
- GOMEZ-MESTRE, Ivan; WIENS, John J.; WARKENTIN, Karen M. EVOLUTION OF ADAPTIVE PLASTICITY: RISK-SENSITIVE HATCHING IN NEOTROPICAL GONZALEZ-GRONOW, Mario; GOPAL, Udhayakumar; AUSTIN, Richard C.; PIZZO, Salvatore V. Glucose-regulated protein (GRP78) is an important cell surface receptor for viral invasion, cancers, and neurological disorders. **IUBMB life**, England, v. 73, n. 6, p. 843–854, 2021. DOI: 10.1002/iub.2502.
- GUO, Chao; HU, Yuhong; LI, Jing; LIU, Yuliang; LI, Sihan; YAN, Keqiang; WANG, Xiao; LIU, Jingze; WANG, Hui. Identification of multiple peptides with antioxidant and

antimicrobial activities from skin and its secretions of *Hylarana taipehensis*, *Amolops lifanensis*, and *Amolops granulosis*. **Biochimie**, [S. l.], v. 105, p. 192–201, 2014. DOI: 10.1016/j.biochi.2014.07.013.

GUO, Cheng; GAO, Shuai; KRZTON, Ali; ZHANG, Long. Geographic body size variation of a tropical anuran: effects of water deficit and precipitation seasonality on Asian common toad from southern Asia. **BMC Evolutionary Biology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 208, 2019. DOI: 10.1186/s12862-019-1531-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1531-z>.

HEBBAR, Nikhil *et al.* CAR T cells redirected to cell surface GRP78 display robust anti-acute myeloid leukemia activity and do not target hematopoietic progenitor cells. **Nature communications**, England, v. 13, n. 1, p. 587, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-28243-6.

HELLIWELL, John R. Triosephosphate isomerase: the perfect enzyme, but how does it work? **IUCrJ**, England, v. 8, n. Pt 4, p. 480–481, 2021. DOI: 10.1107/S205225252100573X.

HEYER, W. Ronald; RAND, A. Stanley; CRUZ, Carlos Alberto Gonçalves Da; PEIXOTO, Oswaldo L.; NELSON, Craig E. Frogs of Boracéia. **Arquivos de Zoologia**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 231–410, 1990. DOI: 10.11606/issn.2176-7793.v31i4p231-410.

HUAN, Yuchen; KONG, Qing; MOU, Haijin; YI, Huaxi. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Frontiers in microbiology**, Switzerland, v. 11, p. 582779, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.582779.

INFANTE, Carlos; ASENSIO, Esther; CAÑAVATE, José Pedro; MANCHADO, Manuel. Molecular characterization and expression analysis of five different elongation factor 1 alpha genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup): differential gene expression and thyroid hormones dependence during metamorphosis. **BMC molecular biology**, England, v. 9, p. 19, 2008. DOI: 10.1186/1471-2199-9-19.

INSTITUTO BUTANTAN. Venenos, Envenenamentos e Toxinas de Venenos. [s.d.]. Disponível em: <https://butantan.gov.br/pesquisa/ddc/venenos-envenenamentos-e-toxinas-de-venenos>. Acesso em: 10 mar. 2023.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. [S. l.], 2010. Disponível em: <https://www.iucn.org/resources/conservation-tool/iucn-red-list-threatened-species>

JARED, Carlos; MAILHO-FONTANA, Pedro Luiz; ANTONIAZZI, Marta Maria; MENDES, Vanessa Aparecida; BARBARO, Katia Cristina; RODRIGUES, Miguel Trefaut; BRODIE, Edmund D. Venomous Frogs Use Heads as Weapons. **Current Biology**, [S. l.], v. 25, n. 16, p. 2166–2170, 2015. a. DOI: 10.1016/j.cub.2015.06.061..

JARED, Carlos; MAILHO-FONTANA, Pedro Luiz; MARQUES-PORTO, Rafael; SCIANI, Juliana Mozer; PIMENTA, Daniel Carvalho; BRODIE, Edmund D.; ANTONIAZZI, Marta Maria. Skin gland concentrations adapted to different evolutionary pressures in the head and posterior regions of the caecilian *Siphonops annulatus*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 3576, 2018. DOI:10.1038/s41598-018-22005-5.

JETTEN, Mike S. M.; POL, Arjan; OP DEN CAMP, Huub J. M. Methanethiol Consumption and Hydrogen Sulfide Production by the Thermoacidophilic Methanotroph *Methylophilum furmarolicum* SolV. **Frontiers in microbiology**, Switzerland, v. 13, p. 857442, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.857442.

- KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical chemistry**, United States, v. 60, n. 20, p. 2299–2301, 1988. DOI: 10.1021/ac00171a028.
- KIM, S.J. *et al.* Melittin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through induction of apoptosis via suppression of nuclear factor-kappaB and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 106, n. 3, p. 444-451, 2008.
- KJELDSEN, Frank; HASELMANN, Kim F.; BUDNIK, Bogdan A.; SØRENSEN, Esben KOMANDER, David; RAPE, Michael. The ubiquitin code. **Annual review of biochemistry**, United States, v. 81, p. 203–229, 2012. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060310-170328.
- KOMAROVA, Elena Y. *et al.* Hsp70-containing extracellular vesicles are capable of activating of adaptive immunity in models of mouse melanoma and colon carcinoma. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 21314, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-00734-
- KÖNIG, Enrico; BININDA-EMONDS, Olaf R. P.; SHAW, Chris. The diversity and evolution of anuran skin peptides. **Peptides**, United States, v. 63, p. 96–117, 2015. DOI: 10.1016/j.peptides.2014.11.003.
- KRISHNAIAH, Saikumari Y.; DODIA, Chandra; SOROKINA, Elena M.; LI, Haitao; FEINSTEIN, Sheldon I.; FISHER, Aron B. Binding sites for interaction of peroxiredoxin 6 with surfactant protein A. **Biochimica et biophysica acta**, Netherlands, v. 1864, n. 4, p. 419–425, 2016. DOI: 10.1016/j.bbapap.2015.12.009.
- LAMIYAN, Ashish K.; DALAL, Ramkesh; KUMAR, Neelima R. Venom peptides in association with standard drugs: a novel strategy for combating antibiotic resistance - an overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 26, n. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis, 2020 26, p. e20200001, 2020. DOI: 10.1590/1678-9199-JVATITD- 2020-0001.
- LEAF-BREEDING TREEFROGS. **Ecological Monographs**, [S. l.], v. 78, n. 2, p. 205–224, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1890/07-0529.1>.
- LEE, Amy S. Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. **Nature reviews. Cancer**, England, v. 14, n. 4, p. 263– 276, 2014. DOI: 10.1038/nrc3701.
- LEE, W.R. *et al.* Melittin inhibits tumor angiogenesis modulated by endothelial progenitor cells associated with the suppression of ERK1/2 signaling pathway in the xenograft tumor model of human lung adenocarcinoma cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, n. 1-2, p. 171-178, 2011.
- LEE, W.R. *et al.* Melittin suppresses cathepsin S-induced invasion and angiogenesis via blocking of the VEGF-A/VEGFR-2/MEK1/ERK1/2 pathway in human glioblastoma cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 24, n. 6, p. 374-383, 2010.
- LEE, W.R. *et al.* Ranatuerin-2Pb from the frog *Rana catesbeiana* protects against endotoxin-induced endothelial dysfunction in rat aorta. **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1840-1846, 2009.
- LEY, K. *et al.* Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 454, n. 1, p. 1-18, 2007.
- LI *et al.* Bufalin inhibits airway inflammation and smooth muscle remodeling in a murine model of chronic asthma. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 10, p. 1560-1568, 2011.

LI, W.; YE, Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, Switzerland, v. 65, n. 15, p. 2397–2406, 2008. DOI: 10.1007/s00018-008-8090-6.

LI, Zhanghao *et al.* Methionine metabolism in chronic liver diseases: an update on molecular mechanism and therapeutic implication. **Signal transduction and targeted therapy**, England, v. 5, n. 1, p. 280, 2020. DOI: 10.1038/s41392-020-00349-7.

LIAO, Jiangfeng; ZHANG, Yusi; CHEN, Xiaochun; ZHANG, Jing. The Roles of Peroxiredoxin 6 in Brain Diseases. **Molecular neurobiology**, United States, v. 58, n. 9, p. 4348–4364, 2021. DOI: 10.1007/s12035-021-02427-5.

LIU *et al.* Bombesin promotes angiogenesis of ischemic skeletal muscle through activation of ERK1/2 and Akt signaling pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 483, n. 1, p. 1-6, 2017.

LIU, Daixi; WANG, Yuwei; WEI, Lin; YE, Huahu; LIU, Huan; WANG, Ling; LIU, Rui; LI, Dongsheng; LAI, Ren. Snake venom-like waprin from the frog of *Ceratophrys calcarata* contains antimicrobial function. **Gene**, Netherlands, v. 514, n. 2, p. 99–104, 2013. DOI: 10.1016/j.gene.2012.11.007.

LIU, Fei; LI, Shihao; LIU, Guangxing; LI, Fuhua. Triosephosphate isomerase (TPI) facilitates the replication of WSSV in *Exopalaemon carinicauda*. **Developmental and comparative immunology**, United States, v. 71, p. 28–36, 2017. DOI: 10.1016/j.dci.2017.01.018.

LIU, Naixin *et al.* The beneficial roles of poisonous skin secretions in survival strategies of the odorous frog *Odorana andersonii*. **Die Naturwissenschaften**, Germany, v. 109, n. 1, p. 4, 2021. DOI: 10.1007/s00114-021-01776-4.

LIU, Ning-Ai; ARAKI, Takako; CUEVAS-RAMOS, Daniel; HONG, Jiang; BEN-SHLOMO, Anat; TONE, Yukiko; TONE, Masahide; MELMED, Shlomo. CyclinE-Mediated Human Proopiomelanocortin Regulation as a Therapeutic Target for Cushing Disease. **Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 100, n. 7, p. 2557–2564, 2015. DOI: 10.1210/jc.2015-1606.

LIU, Y. *et al.* Bombesin promotes angiogenesis of ischemic skeletal muscle through activation of ERK1/2 and Akt signaling pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 483, n. 1, p. 1-6, 2017.

LIU, Y. *et al.* Inflammation and endothelial dysfunction in COVID-19: A systematic review and meta-analysis involving 10653 patients. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111340, 2021.

LOMANS, B. P.; VAN DER DRIFT, C.; POL, A.; OP DEN CAMP, H. J. M. Microbial cycling of volatile organic sulfur compounds. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, Switzerland, v. 59, n. 4, p. 575–588, 2002. DOI: 10.1007/s00018-002-8450-6.

LU, Bin; CHEN, Xiao-bing; HONG, Yu-cai; ZHU, Hong; HE, Qiao-jun; YANG, Bo; YING, Mei-dan; CAO, Ji. Identification of PRDX6 as a regulator of ferroptosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S. l.], v. 40, n. 10, p. 1334–1342, 2019. DOI: 10.1038/s41401-019-0233-9.

MA, Yufang; LIU, Cunbao; LIU, Xiuhong; WU, Jing; YANG, Hailong; WANG, Yipeng; LI, Jianxu; YU, Haining; LAI, Ren. Peptidomics and genomics analysis of novel antimicrobial peptides from the frog, *Rana nigrovittata*. **Genomics**, United States, v. 95, n. 1, p. 66–71, 2010. DOI: 10.1016/j.ygeno.2009.09.004.

MAGALHÃES, Felipe D. E. Medeiros; MARQUES, Ricardo; DOS SANTOS, Daniela Fonseca; DE MAGALHÃES, Rafael Félix; PEZZUTI, Tiago Leite. Tadpole of *Nyctimantis galeata* (Anura: Hylidae: Lophyohylini), a narrow endemic casque-headed

frog from Bahia, Brazil. **Zootaxa**, New Zealand, v. 4948, n. 2, p. zootaxa.4948.2.9, 2021. DOI: 10.11646/zootaxa.4948.2.9.

MALIK, U.; SILVA, O. N.; FENSTERSEIFER, I. C. M.; CHAN, L. Y.; CLARK, R. J.; MANEVICH, Yefim; FISHER, Aron B. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. **Free radical biology & medicine**, United States, v. 38, n. 11, p. 1422–1432, 2005. DOI: 0.1016/j.freeradbiomed.2005.02.011.

MARTELLI, Alberto M.; PAGANELLI, Francesca; CHIARINI, Francesca; EVANGELISTI, Camilla; MCCUBREY, James A. The Unfolded Protein Response: A Novel Therapeutic Target in Acute Leukemias. **Cancers**, Switzerland, v. 12, n. 2, 2020. DOI: 10.3390/cancers12020333.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cellular and molecular life sciences : **CMLS**, Switzerland, v. 62, n. 6, p. 670–684, 2005. DOI: 10.1007/s00018-004-4464-6.

Mebs, D. Toxicity in animals. Trends in evolution? **Toxicon**, v. 40, n. 1, p. 11-19, 2002.

MENDES, Vanessa A.; BARBARO, Katia C.; SCIANI, Juliana M.; VASSÃO, Ruth C.; PIMENTA, Daniel C.; JARED, Carlos; ANTONIAZZI, Marta M. The cutaneous secretion of the casque-headed tree frog *Corythomantis greeningi*: Biochemical characterization and some biological effects. **Toxicon**, [S. l.], v. 122, p. 133–141, 2016. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.10.004.

MIETHKE, Marcus *et al.* Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. Nature reviews. **Chemistry**, England, v. 5, n. 10, p. 726–749, 2021. DOI: 10.1038/s41570-021-00313-1.

MOHAMED ABD EL-AZIZ, Tarek; GARCIA SOARES, Antonio; STOCKAND, James D. Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. **Toxins**, Switzerland, v. 11, n. 10, 2019. DOI: 10.3390/toxins11100564.

MONTEIRO, Wuelton Marcelo *et al.* Bothrops atrox, the most important snake involved in human envenomings in the amazon: How venomomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxinology. **Toxicon: X**, England, v. 6, p. 100037, 2020. DOI: 10.1016/j.toxcx.2020.100037.

MULLER, W. A. *et al.* Intravital microscopy of leukocyte-endothelial and platelet-leukocyte interactions in mesenteric veins in mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 41, p. e1869, 2010.

MYERS, Tracey D.; PALLADINO, Michael J. Newly discovered roles of triosephosphate isomerase including functions within the nucleus. **Molecularmedicine** (Cambridge, Mass.), England, v. 29, n. 1, p. 18, 2023. DOI:10.1186/s10020-023-00612-x.

NEGRI, L. *et al.* The opioid peptide dermorphin [D-Arg2, Lys4] (1-4) amide induces anti-inflammatory effects in the mouse skin. **Peptides**, v. 38, n. 2, p. 301-308, 2012.

NI, Min; ZHANG, Yi; LEE, Amy S. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. **The Biochemical journal**, England, v. 434, n. 2, p. 181–188, 2011. DOI: 10.1042/BJ20101569.

PACIFICI, Francesca; DELLA MORTE, David; CAPUANI, Barbara; PASTORE, Donatella; BELLIA, Alfonso; SBRACCIA, Paolo; DI DANIELE, Nicola; LAURO, Renato; LAURO, Davide. Peroxiredoxin6, a Multitask Antioxidant Enzyme Involved in the Pathophysiology of Chronic Noncommunicable Diseases. **Antioxidants & redox signaling**, United States, v. 30, n. 3, p. 399–414, 2019. DOI: 10.1089/ars.2017.7427.

PANKIEWICZ, Joanna E.; DIAZ, Jenny R.; MARTÁ-ARIZA, Mitchell; LIZIŃCZYK,

- Anita M.; FRANCO, Leor A.; SADOWSKI, Martin J. Peroxiredoxin 6 mediates protective function of astrocytes in A β proteostasis. **Molecular neurodegeneration**, England, v. 15, n. 1, p. 50, 2020. DOI: 10.1186/s13024-020-00401-8.
- PATOCKA, Jiri; NEPOVIMOVA, Eugenie; KLIMOVA, Blanka; WU, Qinghua; KUCA, Kamil. Antimicrobial Peptides: Amphibian Host Defense Peptides. **Current medicinal chemistry**, United Arab Emirates, v. 26, n. 32, p. 5924–5946, 2019. DOI: 10.2174/0929867325666180713125314.
- PERUMAL SAMY, Ramar; STILES, Bradley G.; FRANCO, Octavio L.; SETHI, Gautam; LIM, Lina H. K. Animal venoms as antimicrobial agents. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 134, p. 127–138, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.005>.
- PRİYATHILAKA, Thanthrige Thiunuwan *et al.* Identification and molecular characterization of peroxiredoxin 6 from Japanese eel (*Anguilla japonica*) revealing its potent antioxidant properties and putative immune relevancy. **Fish & shellfish immunology**, England, v. 51, p. 291–302, 2016. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.12.012.
- PROTOPOPOVA, Marina V; PAVLICHENKO, Vasiliy V; LUCKENBACH, Till. RÁDIS-BAPTISTA, Gandhi. Cell-Penetrating Peptides Derived from Animal Venoms and Toxins. **Toxins**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 1–25, 2021. DOI: 10.3390/toxins13020147.
- RCO, ROCHA T, BUENO TC, PIMENTA DC. Bufotenine, a tryptophan- derived alkaloid, suppresses the symptoms and increases the survival rate of rabies-infected mice: the development of a pharmacological approach for rabies treatment. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. 2020 Feb 3;26:e20190050. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0050.
- RECHAVI, Marc. Convergent evolution of venom gland transcriptomes across Metazoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 119, n. 1, p. e2111392119, 2022. DOI: 10.1073/pnas.2111392119.
- RIVERA-CORREA, Mauricio *et al.* Amphibians in Zootaxa: 20 years documenting the global diversity of frogs, salamanders, and caecilians. **Zootaxa**, New Zealand, v. 4979, n. 1, p. 5769, 2021. DOI: 10.11646/zootaxa.4979.1.9.
- ROLLINS-SMITH, Louise A.; CONLON, J. Michael. Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. **Developmental and comparative immunology**, United States, v. 29, n. 7, p. 589–598, 2005. DOI: 10.1016/j.dci.2004.11.004.
- ROSENZWEIG, Rina; NILLEGODA, Nadinath B.; MAYER, Matthias P.; BUKAU, Bernd. The Hsp70 chaperone network. **Nature reviews. Molecular cellbiology**, England, v. 20, n. 11, p. 665–680, 2019. DOI: 10.1038/s41580-019-019-019-0.
- S.; ZUBAREV, Roman A. Complete characterization of posttranslational modification sites in the bovine milk protein PP3 by tandem mass spectrometry with electron capture dissociation as the last stage. **Analytical chemistry**, United States, v. 75, n. 10, p. 2355–2361, 2003. DOI: 10.1021/ac026295b.
- SANTOS *et al.* Bradykinin: inflammatory mediator and modulator of the immune response in the central nervous system. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 1, p. 26-37, 2015.
- SANTOS, L.D. *et al.* Crotoxin induces inflammatory and immunological changes in an experimental myotoxic model. **Toxicon**, v. 77, p. 1-11, 2014.
- SCHMITZ, Rob A.; MOHAMMADI, Sepehr S.; VAN ERVEN, Timo; BERBEN, Tom; SCHULZ, C.; MASSBERG, S.; LORENZ, M. Platelets and the injured vessel wall: from physiology to new therapeutic approaches. **F1000Research**, v. 4, p. F1000 Faculty Rev-

1463, 2015.

SEERY, L. T.; MCCABE, B. D.; SCHOENBERG, D. R.; WHITEHEAD, A. S. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Xenopus laevis*--identification, developmental expression and evolution. **Biochemical and biophysical research communications**, United States, v. 205, n. 3, p. 1539–1546, 1994. DOI: 10.1006/bbrc.1994.2842.

SHAFER, Maxwell E. R.; WILLSON, Jessica A.; DAMJANOVSKI, Sashko. Expression analysis of the peroxiredoxin gene family during early development in *Xenopus laevis*. **Gene Expression Patterns**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 511–516, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gep.2011.08.007>.

SHARAPOV, Mars G.; NOVOSELOV, Vladimir I.; GUDKOV, Sergey V. Radioprotective Role of Peroxiredoxin 6. **Antioxidants** (Basel, Switzerland), Switzerland, v. 8, n. 1, 2019. DOI: 10.3390/antiox8010015.

SILVA, Rafael Almeida Da; OLIVEIRA, Beatriz Nascimento Lins De; SILVA, Luiza Pinheiro Alves Da; OLIVEIRA, Maria Auxiliadora; CHAVES, Gabriela Costa. Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em Debate**, [S. l.], v. 44, n. Saúde debate, 2020 44(126), p. 607–623, 2020. DOI: 10.1590/0103-1104202012602.

SMALLWOOD, Taylor B.; CLARK, Richard J. Advances in venom peptide drug discovery: where are we at and where are we heading? **Expert opinion on Drug discovery**, England, v. 16, n. 10, p. 1163–1173, 2021. DOI: 10.1080/17460441.2021.1922386.

TACCONELLI, Evelina *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet. Infectious diseases**, United States, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.

TALAPATRA, S.; WAGNER, J. D. O.; THOMPSON, C. B. Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis. **Cell death and differentiation**, England, v. 9, n. 8, p. 856–861, 2002. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401078.

TEIXEIRA, R. L.; SCHNEIDER, J. A. P.; ALMEIDA, G. I. The occurrence of amphibians in bromeliads from a Southeastern Brazilian restinga habitat, with special reference to *Aparasphenodon brunoi* (Anura, Hylidae). **Brazilian Journal of Biology**, [S. l.], v. 62, n. 2, p. 263–268, 2002. DOI: 10.1590/S1519-69842002000200010.

TOLEDO, L. F.; SAZIMA, I.; HADDAD, C. F. B. Behavioural defences of anurans: an overview. **Ethology Ecology & Evolution**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 1–25, 2011. DOI: 10.1080/03949370.2010.534321.

TREMBATH, D. G. Chapter 26 - Molecular Testing for Glioblastoma. *In*: COLEMAN, William B.; TSONGALIS, Gregory J. (org.). *Diagnostic Molecular Pathology*. [s.l.] : **Academic Press**, 2017. p. 339–347. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800886-7.00026-1>.

VÁZQUEZ-MEDINA, José Pablo; DODIA, Chandra; WENG, Liwei; MESAROS, Clementina; BLAIR, Ian A.; FEINSTEIN, Sheldon I.; CHATTERJEE, Shampa; FISHER, Aron B. The phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6 modulates NADPH oxidase 2 activation via lysophosphatidic acid receptor signaling in the pulmonary endothelium and alveolar macrophages. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, United States, v. 30, n. 8, p. 2885–2898, 2016. DOI: 10.1096/fj.201500146R.

VIG, Saurabh *et al.* Cytokine-induced translocation of GRP78 to the plasma membrane

triggers a pro-apoptotic feedback loop in pancreatic beta cells. **Cell Death & Disease**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 309, 2019. DOI: 10.1038/s41419-019-1518-0.

VIGERELLI H, SCIANI JM, PEREIRA PMC, LAVEZO AA, SILVA ACR, COLLAÇO VIZÁN, Pedro; DI CROCE, Luciano; ARANDA, Sergi. Functional and Pathological Roles of AHCY. **Frontiers in cell and developmental biology**, Switzerland, v. 9, p. 654344, 2021. DOI: 10.3389/fcell.2021.654344.

VON REUMONT, Bjoern M. *et al.* Modern venomomics-Current insights, novel methods, and future perspectives in biological and applied animal venom research. **GigaScience**, United States, v. 11, 2022. DOI: 10.1093/gigascience/giac048.

WANG, Hui *et al.* Functional peptidomics of amphibian skin secretion: A novel Kunitz-type chymotrypsin inhibitor from the African hyperoliid frog, *Kassina senegalensis*. **Biochimie**, France, v. 94, n. 3, p. 891–899, 2012. DOI: 10.1016/j.biochi.2011.12.008.

WANG, J. *et al.* Batrachotoxin protects against ischemia-reperfusion injury by preserving endothelial function in rat mesenteric artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 1-8, 2014.

WANG, Jingjing; ORLOV, Yuriy L.; LI, Xue; ZHOU, Yincong; LIU, Yongjing; YUAN, Chunhui; CHEN, Ming. In situ dissecting the evolution of gene duplication with different histone modification patterns based on high-throughput data analysis in *Arabidopsis thaliana*. **PeerJ**, United States, v. 9, p. e10426, 2021. DOI: 10.7717/peerj.10426.

WEI, Lin; DONG, Li; ZHAO, Tongyan; YOU, Dewen; LIU, Rui; LIU, Huan; YANG, Hailong; LAI, Ren. Analgesic and anti-inflammatory effects of the amphibian neurotoxin, anntoxin. **Biochimie**, France, v. 93, n. 6, p. 995–1000, 2011. DOI: 10.1016/j.biochi.2011.02.010.

WELLS, Kentwood. The Ecology & Behavior of Amphibians. **Bibliovault OAI Repository, the University of Chicago Press**, [S. l.], 2007. DOI: 10.7208/chicago/9780226893334.001.0001.

WINNING, R. S.; BOLS, N. C.; WOODEN, S. K.; LEE, A. S.; HEIKKILA, J. J. Analysis of the expression of a glucose-regulated protein (GRP78) promoter/CAT fusion gene during early *Xenopus laevis* development. **Differentiation; research in biological diversity**, England, v. 49, n. 1, p. 1–6, 1992. DOI: 10.1111/j.1432-0436.1992.tb00763.x.

WOMACK, Molly C.; BELL, Rayna C. Two-hundred million years of anuran body-size evolution in relation to geography, ecology and life history. **Journal of evolutionary biology**, Switzerland, v. 33, n. 10, p. 1417–1432, 2020. DOI: 10.1111/jeb.13679.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2020 antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. Geneva: **World Health Organization**, [S. l.], 2021. a. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021303>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global shortage of innovative antibiotics fuels emergence and spread of drug-resistance. **WHO**, [S. l.], 2021. b. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/15-04-2021-global-shortage-of-innovative-antibiotics-fuels-emergence-and-spread-of-drug-resistance>

WU, Jing; LIU, Han; YANG, Hailong; YU, Haining; YOU, Dewen; MA, Yufang; YE, Huahu; LAI, Ren. Proteomic analysis of skin defensive factors of tree frog *Hyla simplex*. **Journal of proteome research**, United States, v. 10, n. 9, p. 4230–4240, 2011. DOI: 10.1021/pr200393t.

XI, Xinping; LI, Bin; CHEN, Tianbao; KWOK, Hang Fai. A review on bradykinin-related peptides isolated from amphibian skin secretion. **Toxins**, Switzerland, v. 7, n. 3, p. 951–970, 2015. DOI: 10.3390/toxins7030951.

XU, Xueqing; LAI, Ren. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. **Chemical reviews**, United States, v. 115, n. 4, p.1760–1846, 2015. DOI: 10.1021/cr4006704.

YACOUB, Tania; RIMA, Mohamad; KARAM, Marc; FAJLOUN, Jean-Marc Sabatier And Ziad. Antimicrobials from Venomous Animals: An Overview. **Molecules** (Basel, Switzerland), Switzerland, v. 25, n. 10, 2020. DOI: 10.3390/molecules25102402.

YANG *et al.* Esculetin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury via activating Nrf2 signal pathway **Inflammation Research**, v. 63, n. 12, p. 993-1003, 2014.

YOU, Dewen *et al.* The first gene-encoded amphibian neurotoxin. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 284, n. 33, p. 22079–22086, 2009. DOI: 10.1074/jbc.M109.013276.

YOUNG, Jason C. Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. **Biochemistry and cell biology**, Canada, v. 88, n. 2, p. 291– 300, 2010. DOI: 10.1139/o09-175.

ZANCOLLI, Giulia; REIJNDERS, Maarten; WATERHOUSE, Robert M.; ROBINSON-ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 84, n. 15, p. 5449–53, 1987. DOI: 10.1073/pnas.84.15.5449.

ZASLOFF, Michael. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, England, v. 415, n. 6870, p. 389–395, 2002. DOI: 10.1038/415389a.

ZHANG, Yi; LIU, Ren; NI, Min; GILL, Parkash; LEE, Amy S. Cell surface relocation of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 285, n. 20, p. 15065–15075, 2010. DOI: 10.1074/jbc.M109.087445.

ZOCCAL, K.F. *et al.* Crotoxin induces the expression of adhesion molecules on endothelial cells by activating ERK1/2 and NF- κ B p65: functional role of α 5 β 1 integrin in leukocyte adhesion. **Toxicon**, v. 119, p. 253-263, 2016.

ANEXO(S)

Artigos publicados durante o período do Doutorado:

MALESKI, ADOLFO LUIS ALMEIDA; ROSA, JOAO GABRIEL SANTOS ; BERNARDO, JEFFERSON THIAGO GONÇALVES ; ASTRAY, RENATO MANCINI ; WALKER, CRISTIANI ISABEL BANDERÓ ; LOPES-FERREIRA, MONICA ; LIMA, CARLA . Recapitulation of Retinal Damage in Zebrafish Larvae Infected with Zika Virus. *Cells*, v. 11, p. 1457, 2022.

LOPES-FERREIRA, MONICA ; SOSA-ROSALES, INES ; SILVA JUNIOR, PEDRO ISMAEL ; CONCEICAO, KATIA ; **MALESKI, ADOLFO LUIS ALMEIDA** ; BALAN-LIMA, LETICIA ; DISNER, GEONILDO RODRIGO ; LIMA, CARLA . Molecular Characterization and Functional Analysis of the Nattectin- like Toxin from the Venomous Fish *Thalassophryne maculosa*. *Toxins*, v. 14, p. 2, 2022..

LOPES-FERREIRA, MONICA ; **MALESKI, ADOLFO LUIS ALMEIDA** ; BALAN-LIMA, LETICIA ; BERNARDO, JEFFERSON THIAGO GONÇALVES ; HIPOLITO, LUCAS MARQUES ; SENI-SILVA, ANA CAROLINA ; BATISTA- FILHO, JOAO ; FALCAO, MARIA ALICE PIMENTEL ; LIMA, CARLA . Impact of Pesticides on Human Health in the Last Six Years in Brazil. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 19, p. 3198, 2022.

LIMA, CARLA ; **MALESKI, ADOLFO LUIS ALMEIDA** ; BERNARDO, JEFFERSON THIAGO GONÇALVES ; ZELLI, VITOR CATALDI ; KOMEGAE, EVILIN NANAME ; LOPES-FERREIRA, MONICA . TnP Peptide Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in a Preclinical Mouse Model. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 857692, 2022.

SENI-SILVA, ANA CAROLINA & **MALESKI, ADOLFO LUIS ALMEIDA** ; SOUZA, MILENA MARCOLINO ; FALCAO, MARIA ALICE PIMENTEL ; DISNER, GEONILDO RODRIGO ; LOPES-FERREIRA, MONICA ; LIMA, CARLA . Natterin-like depletion by CRISPR/Cas9 impairs zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development. *BMC GENOMICS*, v. 23, p. 123, 2022.

BATISTA-FILHO, JOÃO ; FALCÃO, MARIA ALICE PIMENTEL ; **MALESKI, ADOLFO LUIS ALMEIDA** ; SOARES, AMANDA BEATRIZ SILVA ; BALAN- LIMA, LETICIA ; DISNER, GEONILDO RODRIGO ; LIMA, CARLA ; LOPES- FERREIRA, MONICA . Early preclinical screening using zebrafish (*Danio rerio*) reveals the safety of the candidate anti-inflammatory therapeutic agent TnP. *TOXICOLOGY REPORTS*, v. 8,

HENRIQUE, CAMILA ; FALCÃO, MARIA ALICE PIMENTEL ; DE ARAÚJO PIMENTA, LUCIANA ; **MALESKI, ADOLFO LUÍS ALMEIDA** ; LIMA, CARLA ; MITSUNARI, THAIS ; SAMPAIO, SANDRA COCCUZZO ; LOPES- FERREIRA, MÔNICA ; PIAZZA, ROXANE MARIA FONTES . Heat-Labile Toxin from Enterotoxigenic *Escherichia coli* Causes Systemic Impairment in Zebrafish Model. *Toxins*, v. 13, p. 419, 2021.

LIMA, CARLA ; DISNER, GEONILDO RODRIGO ; FALCÃO, MARIA ALICE PIMENTEL ; SENI-SILVA, ANA CAROLINA ; **MALESKI, ADOLFO LUIS ALMEIDA** ; SOUZA, MILENA MARCOLINO ; REIS TONELLO, MAYARA CRISTINA ; LOPES-FERREIRA, MONICA . The Natterin Proteins Diversity: A Review on Phylogeny, Structure, and Immune Function. *Toxins*, v. 13, p. 538, o.