Ingrid Duarte Cavalcante

Análise Bioquímica e Biológica da Secreção Cutânea do Anuro *Dermatonotus muelleri*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências do Instituto Butantan, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

São Paulo
2015

Ingrid Duarte Cavalcante

Análise Bioquímica e Biológica da Secreção Cutânea do Anuro *Dermatonotus muelleri*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências do Instituto Butantan, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Orientador: Daniel Carvalho Pimenta

São Paulo
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Cavalcante, Ingrid Duarte

Análise Bioquímica e Biológica da Secreção Cutânea do Anuro *Dermatonotus muelleri* / Ingrid Duarte Cavalcante; orientador Daniel Carvalho Pimenta. -- São Paulo, 2015.

72 folhas: il. color; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências, Instituto Butantan, 2015.

1. Venenos. 2. Espectrometria de Massas. 3. *Anura*. 4. Glândulas cutâneas. 5. Proteômica. I. Orientador (Pimenta, Daniel Carvalho, orient.). II. Programa de Pós-Graduação em Toxinologia. Instituto Butantan. III.Título.

CDD 615.9

Elaborada com instruções fornecidas pela Biblioteca do Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

Eu, Ingrid Duarte Cavalcante, aluna regular do Programa de Pós-Graduação em Ciências, do Instituto Butantan, em nível de Mestrado, autorizo a reprodução deste trabalho no site da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

São Paulo, 20 de março de 2015.

_____

Ingrid Duarte Cavalcante (Aluna)

De acordo:

_____

Daniel Carvalho Pimenta (Orientador)

POS-GRADUAÇÃO EM CÊNCIAS
INSTITUTO BUTANTAN

RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DA ALUNA: Ingrid Duarte Cavalcante

DATA DO EXAME:...../..... /.....

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovada	Reprovada
Daniel Carvalho Pimenta (Presidente)	_____	( )	( )
Fernanda Calheta Viera Portaro	_____	( )	( )
Roxane Maria Fontes Piazza	_____	( )	( )

DECISÃO FINAL: APROVADA ( ) REPROVADA ( )

***Comentários da Banca (opcional)*:**

Aos meus pais, Marcos José Cardozo Cavalcante e Leonor Maria Duarte Cavalcante, pelo carinho, amor, pelo grande esforço e contribuição para minha formação acadêmica, além de tudo o que fazem por mim todos os dias.

À minha querida avó, Ieda Nascimento Duarte, pessoa fundamental para minha educação, exemplo de amor, força e sabedoria.

À minha irmã, Isis Duarte Cavalcante, por seu companheirismo, inúmeros momentos vividos juntos e por ser minha *personal trainner*.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares pelo amor, carinho, incentivo, apoio e compreensão ao longo do caminho até aqui percorrido.

Ao meu orientador, Daniel Carvalho Pimenta, exemplo pessoal e profissional. Obrigada pelos ensinamentos, orientação, pela oportunidade concedida, pela paciência de ensinar e responder às minhas diversas dúvidas, pelos ensinamentos e por acreditar em mim.

Aos meus amigos, Andrea Camarano, Bianca Duarte, Bianca Forbici, Brenda Nuñez, Caroline Bernardo, Cristiane Castilho, Daiana Figueredo, Daniela Fernandes, Diego Sammet, Edson Roberto, Felipe Brandão, Fernando Luquis, Hugo Vigerelli, Leandro Santana, Rafael Yukio, Renata Heying, Rene Cunha Neto, Sandy Lin, Suéli Bonafim, Tamara Camargo, Tatiana Aoki, estando próximos ou distantes, pela amizade, companheirismo, cumplicidade, conselhos, diversão e apoio em todos os momentos, bons ou ruins.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan que de alguma maneira contribuíram com a realização deste trabalho e com quem aprendi algo. Em especial Admilson Cunha, Adrian Hand, Aline Auada, Antônia (Totó), Douglas Mariano, Hugo Vigerelli, Juliana Sciani, Marcia Fugiwara, Patrícia (Pati), Rene Cunha Neto, Silvana. Agradeço a troca de ideias, ensinamentos, sugestões, além da amizade e momentos de descontração.

Aos colaboradores Dr. Carlos Jared e Dra. Marta Antoniazzi, do laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan e ao Dr. Osmindo Pires Jr. do laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília-UnB; e seus respectivos alunos pelo auxílio nas coletas de secreção dos utilizados neste trabalho.

À equipe do Dr. Massuo Jorge Kato, da Central Analítica do Instituto de Química da USP, em especial a Dra. Lyadia, pelas análises de NMR.

À Dra. Rita de Cássia Ruiz e a aluna Keyde Melo, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan pela ajuda no teste biológico.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, em especial, Bianca Távora, Lucas Freitas, Luciana Viana, Vanessa Mendes e Vânia Goulart, que dividiram o aprendizados nas disciplinas.

Às funcionárias da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Toxinologia Kimie Simokomaki e Rosana Coelho.

À Dra. Fernanda Calheta Viera Portaro, ao Dr. Ivo Lebrun e ao Dr. André Zaharenko pelas sugestões feitas no exame de qualificação.

Aos membros titulares da banca examinadora, Dra. Fernanda Calheta Viera Portaro e Dra. Roxane Maria Fontes Piazza e aos membros suplentes Dr. Ivo Lebrun e Dr. Patrick J. Spencer que, gentilmente, aceitaram o convite para compô-la.

Ao apoio financeiro da FAPESP (processo nº 2013/04250-1), CAPES e CNPp para a execução deste trabalho.

A todos que contribuíram, de maneira direta ou indireta, com a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

“Tudo aquilo que o homem ignora não existe para ele.
Por isso o universo de cada um se resume ao
tamanho do seu conhecimento.”
Albert Einstein.

RESUMO

Cavalcante, Ingrid Duarte. Análise Bioquímica e Biológica da Secreção Cutânea do Anuro *Dermatonotus muelleri*. 2015. 72 f. Dissertação (Ciências). Instituto Butantan, São Paulo, 2015.

Venenos e secreções animais estão entre as mais ricas e complexas fontes de materiais biológicos, ou seja, novas moléculas com potencial aplicação biotecnológica ou mesmo farmacêuticas. Nesse sentido, moléculas isoladas da secreção da pele de anfíbios podem ser utilizadas como alternativas biotecnológicas destinadas aos novos medicamentos, como por exemplo, o combate de patógenos resistentes ou no desenvolvimento de novos produtos de utilidade industrial. Assim, esse projeto teve como objetivo identificar e caracterizar moléculas presentes na secreção cutânea de *Dermatonotus muelleri* (única espécie no gênero da família Microhylidae), por meio do isolamento e caracterização bioquímica. As secreções foram filtradas em membranas de corte de 10 kDa e o material retido foi analisado por SDS-PAGE e em seguida por uma abordagem proteômica. Também foi realizado um ensaio de zimografia. O filtrado de baixa massa foi fracionado por HPLC e analisado por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear. A eletroforese em gel apresentou conteúdo proteico de diversas massas moleculares. A análise proteômica encontrou correspondências relevantes para as proteínas distribuídas no gel de eletroforese, inclusive enzimas proteolíticas. Já os compostos filtrados na membrana de corte de 10kDa, demonstraram conter açúcares de acordo com a interpretação dos dados de RMN. Na análise por ESI-IT-ToF verificou-se moléculas de baixa massa molecular (<800 Da) ao longo de toda a amostra, sendo identificado o aminoácido triptofano entre elas. As frações filtradas foram ensaiadas para a atividade de antibiótica mas não foi observada inibição do crescimento bacteriano para estas frações, entretanto uma fração apresentou um significativo aumento do crescimento para *Staphylococcus aureus*. A análise proteômica foi pertinente, tendo demonstrando a presença de diversas proteínas relacionadas a biologia do animal e seu mecanismo de defesas. Do ponto de vista químico detectou-se um aminoácido que apresentou atividade de indução ao

crescimento bacteriano, que pode estar relacionada a mecanismos alternativos à ausência atividade antimicrobiana nos compostos de baixa massa molecular.

Palavras-chave: Venenos, glândulas cutâneas, Anura, espectrometria de massas, *Dermatonotus muelleri*.

ABSTRACT

Cavalcante, Ingrid Duarte. Biochemistry and Biological Analysis of Skin Secretion of Anura *Dermatonotus muelleri*. 2015. 72 p. Master thesis (Science). Instituto Butantan, São Paulo, 2015.

Poisons and secretions animals are among the most complex and rich sources of biological materials, ie new molecules with potential biotechnological applications or pharmaceutical. Accordingly, molecules isolated from amphibian skin secretions may be used as alternatives for the development of new biotechnology tool, such as those target to combat resistant pathogens or develop new industrial products. This project aimed to identify and characterize molecules in the skin secretion of *Dermatonotus muelleri* (only specie in the genus of the family Microhylidae), through the isolation and biochemical characterization. The secretions were filtered through 10 kDa cut-off membranes and the retained fraction was analyzed by SDS-PAGE, followed by a proteomic approach. A zymographic assay was also performed. The low molecular mass filtrate was fractionated by HPLC and analyzed by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. Gel electrophoresis showed protein content of various molecular masses. Proteomics analysis found relevant matches for proteins distributed in the electrophoresis gel, including proteolytic enzymes. On the other hand, the < 10kDa fraction showed to contain sugars, according to the interpretation of the NMR data. The ESI-IT-TOF analyses revealed low molecular mass molecules (<800 Da) throughout the chromatographic separation, and tryptophan could be identified among the molecules. The filtered fractions were assayed for antibiotic activity but no inhibition of bacterial growth could be observed. Interestingly, one fraction exhibited a significant increase in the growth of *Staphylococcus aureus*. The proteomic analysis was pertinent, demonstrating the presence of several proteins related to the animal's biology and defense mechanism. From the chemical point of view, one amino acid was detected and induced bacterial growth, which could be related to alternative mechanisms to the absence of low molecular mass antibiotic compounds.

Keywords: Poisons, skin glands, Anura, mass spectrometry, *Dermatonotus muelleri*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Espécies de anfíbios. 21
Figura 2: Espécie *Dermatonotus muelleri.* 27
Figura 3: Esquema da metodologia adotada neste trabalho. 29
Figura 4: SDS-PAGE 12,5%, corado por nitrato de prata. 40
Figura 5: SDS-PAGE 12,5%, corado por coomassie blue. 41
Figura 6: Zimografia em gelatina. 43
Figura 7: Perfil da cromatografia de exclusão molecular. 44
Figura 8: Comparação dos extratos aquosos das secreções cutâneas de *D. muelleri* por RP-HPLC em coluna C_{18}, monitorado a 214 nm. 45
Figura 9: Perfil cromatográfico (ampliado) das secreções cutâneas filtradas de *D. muelleri.* 46
Figura 10: Espectro da fração GF4 analisada por MALDI-ToF na faixa de 5000 – 20000 Da. 47
Figura 11: Espectro da fração GF5 analisada por MALDI-ToF na faixa de 5000 – 20000 Da. 48
Figura 12: Espectro de massas por eletrospray das frações 2 (A e B) e 10 (C e D) obtida a partir do fracionamento de DmF-BSB. 49
Figura 13: Espectro da fragmentação do íon de m/z 205 da fração 9 e a representação estrutural da fragmentação do triptofano. 51
Figura 14: Comparação entre a fração 9 e o aminoácido triptofano. 51
Figura 15: Espectro de RMN 1H do extrato DmF-BSB. 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Correspondência entre as bandas recortadas e respectivas massas moleculares. 42
Tabela 2. Massas relativas (m/z) das frações de DmF-BSB. 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Aminoácido
ACN	Acetonitrila
BSA	*Bovine serum albumin*
Da	Dalton
DTT	*Ditiotreitol*
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI	*Electrospray ionization*
h	Hora
HPLC	*high-performance liquid chromatography*
IAA	Iodoacetoamida
IT	*Ion trap*
kDa	Quilodalton
kV	Kilovolts
m/z	Relação massa-carga
MALDI	*matrix assisted laser desorption ionization*
MeOD	Metanol Deuterado
MeOH	Metanol
MHz	Mega-hertz
min	Minutos
mL	Mililitros
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetro
ºC	Graus Celsius
PAGE	*Polyacrylamide gel electrophoresis*
PBS	*Phosphate buffered saline*
PDA/DAD	Detector de Arranjo de Diodos
PMM	Padrão de massa molecular
PSA	Persulfato de amônio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP-HPLC	*Reversed-phase high-performance liquid chromatography*

Rpm	Rotação por minuto
SDS	*Sodium dodecyl sulfate*
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TFA	*Trifluoroacetic acid*
ToF	*time of flight*
Tris-HCl	Cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

2 OBJETIVOS 28

2.1 Objetivo Geral 28

2.2 Objetivos Específicos 28

3 MATERIAL E MÉTODOS 29

3.1 Obtenção da Secreção Cutânea de *Dermatonotus muelleri* 29

3.1.1 Coleta dos animais em parceria com o grupo da UnB 30

3.1.2 Coleta dos animais em parceria com o grupo do IBu 30

3.2 Preparação das amostras 31

3.2.1 Filtração por Centrifugação 31

3.3 Processamento das Amostras 31

3.3.1 Estimativa da quantidade de proteínas 32

3.3.2 Eletroforese 32

3.3.3 Digestão de bandas do gel 33

3.3.4 Zimografia 34

3.3.5 Fracionamento do extrato >10 kDa 35

3.3.6 Fracionamento do extrato < 10 kDa 35

3.4 Análise Bioquímica 36

3.4.1 Espectrometria de Massas 36

3.5 Análise Biológica 38

3.5.1 Testes antimicrobianos 38

4 RESULTADOS 39

4.1 Estimativa da quantidade de proteínas presentes na secreção cutânea ... 39

4.2 Eletroforese 39

4.3 Digestão do Gel de Eletroforese 41

4.4 Zimografia 42

4.5 Fracionamento da Secreção Cutânea de Alta Massa por Gel Filtração 44

4.6 Fracionamento da Secreção Cutânea de Baixa Massa..... 45

4.7 Espectrometria de massas..... 46

3.4.1 Espectrometria por MALDI-ToF 46

3.4.2 Espectrometria por ESI-IT-ToF 48

4.8 Ressonância Magnética Nuclear 52

4.9 Atividade Biológica..... 53

5 DISCUSSÃO..... 54

6 CONCLUSÕES..... 62

Referências 63

1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios constituem uma classe de animais de capacidade limitada de defesa e se tornam vulneráveis ao meio ambiente e aos predadores. Com o propósito de se proteger, estes animais adquiriram recursos morfológicos, fisiológicos e comportamentais (GOMES et al., 2007). Esses animais, cuja temperatura do corpo é capaz de variar de acordo com a temperatura do ambiente em que se encontram, são conhecidos como animais ectotérmicos. A maioria das espécies de anfíbios dependem de um ambiente mais úmido, ao menos na fase de reprodução, ainda que algumas espécies vivam em ambientes terrestre na maior parte de sua vida. Os anfíbios transitam em duas fases no ciclo da vida, em geral, uma fase larval, onde são girinos com vida aquática, e a fase adulta em que ocupam os ambientes terrestres e/ou aquáticos (DUELLMAN e TRUEB, 1986). A pele destes animais é úmida e permeável, e são capazes de respirar por brânquias, pulmões, pele e mucosa da cavidade bucal, separadamente ou em combinação (STORER et al., 2003).

No mundo há 7.319 espécies de anfíbios (FROST, 2014). O Brasil é o país mais rico em diversidade de anfíbios no mundo, compreendendo 1.026 espécies. A classe anfíbia compreende três ordens: Gymnophiona (ou Apoda) é a ordem composta por cecílias ou cobras-cegas (Figura 1A), animais que não exibem membros, mas dotados de um corpo alongado e segmentado. No Brasil existem 33 espécies, distribuídas em 4 família e 12 gêneros. A ordem Urodela (ou Caudata), cujos representantes são conhecidos como tritões e salamandras (Figura 1B e 1C), são animais com cauda, corpo alongado e pernas curtas, sendo que em muitas espécies houve a perda dos membros anteriores e posteriores durante a evolução. Utilizam a ondulação lateral para andar em ambientes terrestres e, em ambientes aquáticos, dispõem da ondulação lateral do tronco e da cauda. No Brasil, existem 5 espécies, de uma família e gênero. E a ordem Anura (anuros) é representada pelos sapos, rãs e pererecas (Figura 1D, 1E e 1F). A morfologia consiste em especializações da cintura pélvica e membros anteriores e posteriores para natação e salto, ou mesmo para caminhar e escalar. Na fase adulta não mantem a cauda e o corpo é compacto. Correspondem a maior parte das espécies de anfíbios

encontradas no Brasil, sendo 988 espécies distribuídas em 19 famílias e 87 gêneros (Sociedade Brasileira de Herpetologia-SBH, 2014).

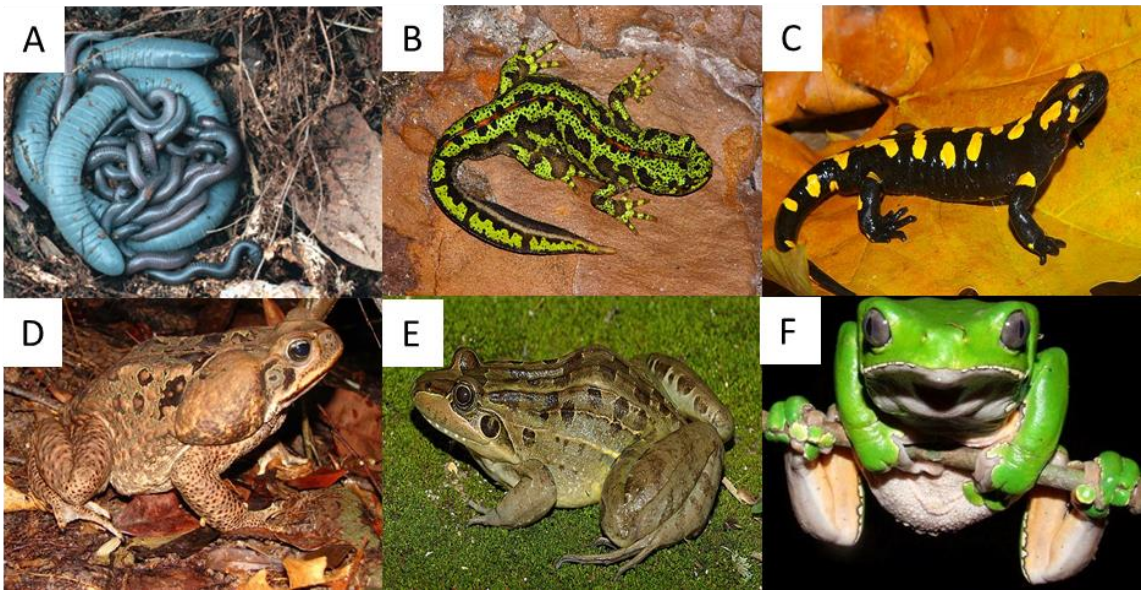

Figura 1: Espécies de anfíbios. Em (A), *Siphonops annulatus*, representante das cecílias ou cobra-cega (Foto: Carlos Jared). Em (B), *Tritutrus marmoratus,* conhecido como tritão-verde (Foto: Albano Soares). Em (C), *Salamandra salamandra terrestris***,** encontrada na Europa e norte da África (Foto: Matthijs Hollanders). Em (D), *Rhinella marina*, um sapo encontrado em nas Américas Central e do Sul (Foto: http://www.stewartmacdonald.com.au/blog/2012/05/orpheus-island/). Em (E), *Lepdactylus ocellatus*, representando anuro tipo rã. E em (F), *Phyllomedusa bicolor*, uma perereca conhecida popularmente como kambô (Foto: http://www.herpetofauna.com.br/Kambo.htm)**.**

Visto que os anuros são os representantes mais abundantes da classe de anfíbios, estes se tornam um pouco mais estudados pelos métodos bioquímicos. Os sapos são conhecidos por apresentarem uma pela rugosa, pela presença de glândulas ao longo de todo o corpo e geralmente são de grande porte. As rãs são distinguidas por dispor adaptação nas patas traseiras, membranas natatórias entre os dedos que permitem a natação durante a fase adulta. As pererecas têm um porte menor, em relação às rãs e sapos, e apresentam discos adesivos em todos os dedos que facilitam sua escalada em árvores e etc. Em geral, os anuros são animais de sangue frio proporcionando a eles uma adaptação a mudanças de temperatura do meio ambiente. Usualmente, são encontrados em habitat úmidos, porém há

espécies que se encontram em ambientes secos, como no cerrado e caatinga. Há ainda os anuros exclusivamente aquáticos como as espécies do gênero *Pipa* (POUGH et al., 1998). De maneira geral, os anuros alimentam-se de animais vivos que se movem como insetos, vermes e pequenos moluscos (STORER et al., 2003). São animais de defesa passiva que dispõem de secreções urticantes na pele produzidas por glândulas. Alguns revelam uma coloração de advertência (colorações fortes que avisam ao predador que são altamente venenosos) e glândulas parótidas de veneno que se localizam no dorso da cabeça dos sapos e nas dobras dorsolaterais de rãs (JARED et al., 2009).

A pele detém um aspecto notável para os anuros, pois, além da função de proteção física, está envolvida diretamente na respiração (cutânea), participa de trocas gasosas, no transporte de íons e água, no equilíbrio da manutenção térmica, na reprodução de algumas espécies. Nessa diretriz, a pele também é responsável pelas respostas sensoriais químicas e mecânicas e compõe o arsenal de defesa contra microorganismos e predadores (DUELLMAN e TRUEB, 1986; ZUG et al., 1993; STEBBINS e COHEN, 1995; TOLEDO e JARED, 1995). Os anuros dispõem de um verdadeiro reator bioquímico em sua pele, capazes de gerar moléculas por intermédio de secreções cutânea produzidas por glândulas. A presença de glândulas na pele é uma característica compartilhada por todos os anfíbios atuais (DUELLMAN e TRUEB, 1986; STEBBINS e COHEN, 1995). Os anuros apresentam dois tipos de glândulas: as glândulas mucosas e as glândulas granulares. As glândulas mucosas estão por toda a pele e a secreção por elas liberada, constituída por glicosaminoglicanas e proteoglicanas (DAPSON, 1970), mantém a pele úmida, o que auxilia na respiração cutânea (GOMES et al., 2007).

Já as glândulas granulares, conhecidas também como glândulas serosas ou de Já as glândulas granulares, conhecidas também como glândulas serosas ou de veneno, podem estar distribuídas ao longo do corpo do animal, no entanto, concentram-se perto da cabeça e pescoço. Essas glândulas são ativadas por meio do estresse animal ou algum dano acometido e a secreção por elas liberadas pode conter substâncias nocivas e tóxicas que mantêm predadores afastados (GOMES et al., 2007).

A diversidade das moléculas bioativas secretadas na pele dos anfíbios pode ser dividida em quatro categorias majoritárias (DALY et al., 1987): (a) peptídeos

(ERSPAMER, 1984), (b) aminas biogênicas/alcaloides (ERSPAMER, 1959; ROSEGHINI et al., 1976; ERSPAMER, 1981, 1984; ROSEGHINI et al., 1986), (c) esteroides (WIELAND et al., 1934) e (d) proteínas (NEUWIRTH et al., 1979; DALY et al., 1987; TOLEDO e JARED, 1995). Essas moléculas reproduzem um papel muito importante nas funções fisiológicas e na defesa contra predadores e microorganismos. Sabe-se que um grande número dessas moléculas já foi devidamente elucidado estrutural e funcionalmente (SEBBEN et al., 1993).

Contrariando a morfologia das glândulas de secreção de venenos dos animais, nos anuros, estas glândulas são formadas por uma massa citoplasmática multinucleada, o que caracteriza a sua natureza sincicial. Não apresentam lúmen e a secreção é acumulada em seu interior, sendo liberada por um ducto epidérmico (DELFINO, 1991; TERRENI et al., 2003).

Os peptídeos são biomoléculas que contêm de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si, por meio de ligações peptídicas, e são extremamente diversificados em termos funcionais. Muitos atuam como hormônios ou fatores liberadores destes, enquanto outros são neuropeptídeos, neurotransmissores, toxinas, antibióticos naturais, adoçantes ou substratos de proteases. Alguns peptídeos são comuns no cotidiano, é o caso do aspartame, da insulina, da ocitocina e de diversas drogas comerciais que consistem em antagonistas de peptídeos naturais ou em inibidores de enzimas envolvidas na sua produção e liberação no organismo (MACHADO et al., 2004).

Bombinin é relatado como o primeiro peptídeo antimicrobiano isolado da espécie *Bombina variegata* (CSORDÁS e MICHL, 1970). Mais tarde, novos peptídeos foram isolados, como as magainins de *Xenopus laevis*, por Zasloff (ZASLOFF, 1987) com uma ampla atividade contra fungos, bactérias e protozoários (BARRA e SIMMACO, 1995; RINALDI, 2002; NASCIMENTO et al., 2003). Estudos demonstraram atividade espermicida de magainin-A (REDDY et al., 1996) e de dermaseptin4 (ZAIRI et al., 2005).

Dermasepitinas, encontradas nas subfamílias de Phyllomedusinae, exercem uma ação lítica em bactérias, protozoários, leveduras e fungos filamentosos, em concentrações micromolares (MOR et al., 1994).

Além disso, algumas Phyllosepitinas, descritas por Leite e colaboradores (LEITE et al., 2005), exibem um grande espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e protozoários.

Em adicional às atividades dos peptídeos de anuros estudadas, em 2007 foi identificado um peptídeo potencializador de bradicinina (BPPs), comumente presente em venenos de *Bothrops jararaca.* Os BPPs são conhecidos por inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA). A partir da secreção cutânea de *Phyllomedusa hypochondrialis*, foi isolado o BPP nomeado de Phypo A, capaz de potenciar as atividades da bradicinina in vivo e in vitro, assim como capaz de inibir ECA (CONCEIÇÃO et al., 2007).

Um pouco menos estudadas, as enzimas proteolíticas, responsáveis pelas clivagens dos peptídeos, compõem a secreção cutânea de anfíbios (ALI et al., 2002; CHEN e SHAW, 2003; WANG et al., 2012). Recentemente, Libério e colaboradores (LIBÉRIO et al., 2014) sugeriram a existência de metalo proteases na secreção de *Leptodactylus labyrinticus*. Estas peptidases presentes em *L. labyrinticus* podem estar envolvidas na regulação da homeostase e/ou em processamentos de peptídeos, como por exemplo inativando peptídeos inofensivos para o animal ou gerando peptídeos com novas funções.

Um estudo recente mostrou o efeito sinérgico do peptídeo antimicrobiano falaxina, isolado a partir da secreção cutânea de *L. labyrinthicus*, e de um tetrapeptídeo, dele derivado, com o alcaloide bufotenina contra a cepa de vírus fixo PV (Pasteur Virus) do vírus da raiva. Foi a primeira descrição de um efeito antiviral sinérgico entre um peptídeo e um alcaloide (CUNHA NETO, 2014).

Outras classes de moléculas podem ser encontradas na secreção da pele de anuros, como os alcaloides. Estes são compostos nitrogenados que, em sua maioria, possuem caráter alcalino. Com atividade biólogica, pode-se citar: atropina, hiosciamina e escolamina (anticolinégicos), reserpina e protoveratrina A (anti-hipertensivo), quinina (antimalárico), cafeína (estimulante do SNC), entre outros (SIMÕES et al., 2010).

A variedade de alcaloides detectados na secreção da pele de anuros (DALY et al., 1993) pode ser originada a partir de fontes alimentares (DALY et al., 1992; DALY et al., 1994a; DALY et al., 1994b; DALY et al., 1997) que, para tais rãs / sapos consistem em pequenos artrópodes. Na secreção de alguns dendrobatídeos,

considerados “especialistas em formigas” (TOFT, 1980; DONNELLY, 1991; TOFT, 1995; CALDWELL, 1996), foram encontrados seis representantes das 20 principais classes estruturais de alcaloides identificadas em formigas, especialmente nas espécies *Solenopsis* (Diplorhoptrum) (JONES e BLUM, 1983; DALY, 1995; SPANDE et al., 1998).

Bufotenina é um alcaloide que foi isolado em 1920 e identificado pelo grupo de pesquisa Heinrich Otto Wieland, em 1937, como um neurotransmissor de serotonina (HANDOVSKY, 1920; BLOM, 2010). Recentemente, a bufotenina foi apontada como um inibidor de penetração do vírus da raiva, isolada da espécie *Rhinella jimi* (VIGERELLI et al., 2014). Esse mesmo alcaloide é também encontrado nas sementes de plantas do gênero *Anadenanthera* (STROMBERG, 1954).

Um derivado do aminoácido L-triptofano, conhecido como ácido quinurênico, foi isolado da secreção cutânea do anuro *Pipa carvalhoi* (MARIANO et al., 2015). Sabe-se que esse componente já foi identificado em tecido de cérebro humano (TURSKI et al., 1988) e em diversos metabólitos secundários de origem animal e vegetal (TURSKI et al., 2009). Não foram observados efeitos biológicos para o ácido quinurênico de *P. carvalhoi*, porém há a hipótese que esta molécula atue como um sinal químico, como um feromônio, nos animais desta espécie (MARIANO et al., 2015).

Algumas culturas ancestrais, como a medicina chinesa e indígena, utilizam a secreção de anfíbios com finalidade terapêutica. Essas poções de anuros são utilizadas de diversas maneiras com potencial afrodisíaco, contra impotência sexual, prevenção de infertilidade, contraceptivos e algumas doenças presentes na sociedade. Na medicina chinesa, é conhecido um medicamento Chan Su que é preparado com a secreção seca das glândulas da pele de sapos chineses, tradicionalmente usado para o tratamento de doenças do coração, dor de dente, sinusite, hemorragia nas gengivas, entre outros (GOMES et al., 2007).

A família Microhylidae é umas das 49 famílias descritas para anuros. Esta família compreende 68 gêneros, 563 espécies em 11 subfamílias (FROST, 2014). Os microhilídeos exibem o tamanho reduzido (9 a 100 mm) e são, na maioria, terrestres ou semi-fossoriais (FORLANI, 2010), caracterizados morfologicamente por cabeças pontudas, corpos redondos e bocas estreitas (HEYING, 2003). De acordo

com Duellman & Trueb (1986), os microhilídeos tem uma reprodução explosiva com curta temporada de reprodução.

Os microhilideos são animais que detêm ampla diversidade morfológica e comportamental de modo que atribuir características que definam o grupo não seja algo simples. Dentre outras, pode-se citar que os dedos em forma de discos (como nas pererecas) são encontrados em espécies arbóreas (ex. *Kaloula sp*.); focinhos pontiaguados são marcantes em espécies fossoriais auxiliando a sobrevivência nesses habitats (Ex. *Dermantonotus muelleri*); e algumas espécies ostentam o formato do corpo como "orbe-like". Esses animais são encontrados em desertos áridos, florestas tropicais e em quase todo resto do planeta, porém, a maioria das subfamílias encontra-se em áreas geográficas limitadas. Breviceps (microhilídeos africanos) exibem o corpo redondo e com patas curtas o que dificulta a formação do amplexo. Assim, neste e em alguns outros casos, os machos dispõem de glândulas secretoras no ventre que liberam uma secreção tipo cola, auxiliando sua aderência ao dorso da fêmea. Ambos Breviceps e Hoplophryne constroem ninhos de espuma onde os girinos podem se desenvolver. Algumas espécies de microhilideos do novo mundo formam associações comensais facultativas com grandes aranhas da família Theraphosidae, compartilhando tocas e áreas de alimentação; enquanto que alguns sapos podem ser facilmente considerados presas destas aranhas (PARKER, 1934; DUELLMAN e TRUEB, 1986; FORD e CANNATELLA, 1993; ZUG et al., 1993; CANNATELLA, 1995; STEBBINS e COHEN, 1995; POUGH et al., 1998).

Há poucos estudos sobre os microhilídeos, principalmente na vertente de secreção cutânea. Entre as espécies estudadas, pode-se citar a *Dyscophus guineti,* conhecida popularmente como "Sapo Tomate", cuja secreção apresentou uma protease (Kunitaz) que pode ser um componente de uma estratégia alternativa de defesa desse animal contra microorganismos (CONLON e KIM, 2000).

A espécie *Dermatonotus muelleri* (Boettger, 1885) é conhecida por ter um porte grande em comparação com outros microhilídeos (NOMURA, 2003; NOMURA e ROSSA-FERES, 2011). Esta espécie (Figura 2) é a única no gênero *Dermatonotus* e é encontrada na América do sul. *D. muelleri* é uma espécie endêmica que está exposta a um sistema de alta imprevisibilidade, apresentando adaptações específicas ao hábitat como conservar energia ao longo de um período para fornecê-la durante a reprodução explosiva e auxiliar na manutenção em épocas de

estivação. Em temporadas de seca e escassez de alimentos, *D. muelleri,* consegue sobreviver devido sua especialização alimentar e capacidade de cavar uma câmara subterrânea para proteção (NOMURA, 2003).

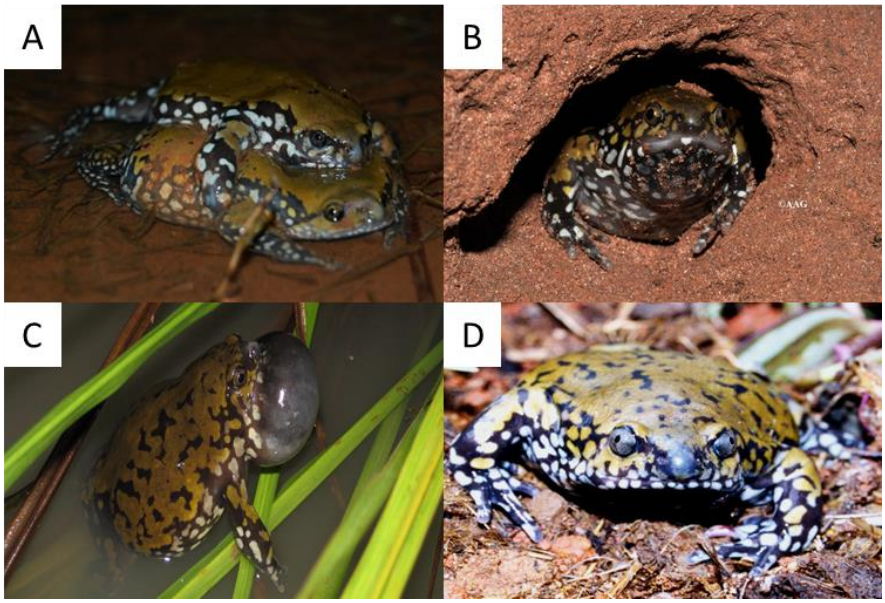

Figura 2: Espécie *Dermatonotus muelleri.* Em (A) indivíduos formando amplexo para reprodução, o macho por cima da fêmea (Foto: http://preservacaoselvagem.blogspot.com.br/2011/04/blog-post_5847.html). Em (B), indivíduo em toca – proteção contra seca e ambiente hostil (Foto: Felipe Silva de Andrade). Em (C), indivíduo vocalizando (Foto: Mauro Teixeira Jr). E em (D), *D. muelleri* em posição frontal (Foto: http://objetoseducacionais2.mec.gov.br/handle/mec/7675).

Até o presente momento, os relatos na literatura sobre a secreção presente na espécie *D. muelleri* e atividade biológica são limitados. Com este propósito, Tempone e colaboradores (2007) realizaram um estudo preliminar de atividade antifúngica, no qual foi constatado diminuta inibição. A escassez de estudos relacionados à espécie em questão ressalta a necessidade de novas pesquisas toxinológicas com *D. muelleri,* pautadas na busca de compostos com propriedades farmacoterapêuticas interessantes e de uso seguro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar e caracterizar, bioquimicamente, os componentes da secreção cutânea de *Dermatonotus muelleri*.

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar um método de obtenção e fracionamento da secreção cutânea de *D. muelleri*;
- Analisar a secreção encontrada dos anuros, isolando os seus constituintes;
- Caracterizar bioquimicamente as moléculas encontradas de acordo com estrutura química:
    - Espectrometria de massas (ESI-IT-TOF/MALDI-TOF);
    - Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
    - Eletroforese em gel;
    - Estimativa de proteínas;
- Caracterizar biologicamente as frações/moléculas encontradas conforme sua atividade e função, com base na literatura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As principais etapas metodológicas utilizadas neste trabalho estão apresentadas na figura 3.

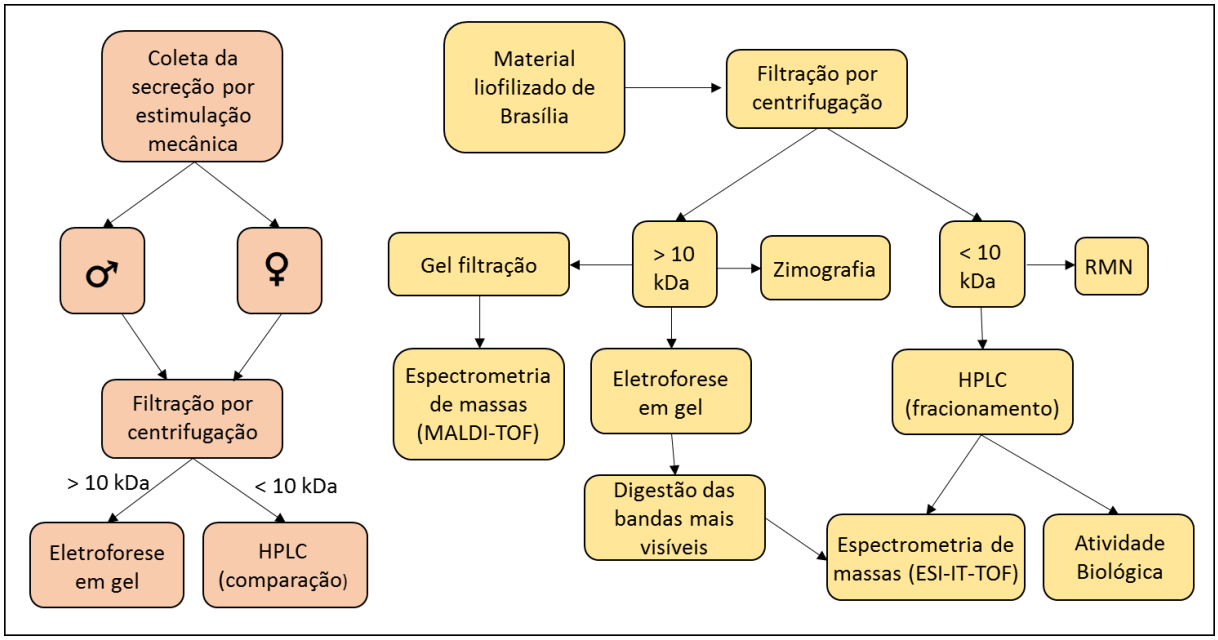

Figura 3 - Esquema da metodologia adotada neste trabalho. RP-HPLC: Cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa. > 10 kDa (quilodaltons): Material retido na membrana de corte molecular contendo moléculas de massa molecular acima de 10 kDa. < 10 kDa: Material filtrado em membrana de corte molecular contendo moléculas de massa molecular abaixo de 10 kDa. Maldi-TOF: Ionização e dessorção a laser assistida por matriz - Tempo de vôo. ESI-IT-TOF: Ionização por eletrospray – tempo de vôo – "ion trap". RMN – Ressonância magnética nuclear. No primeiro fluxograma (em rosa) é desenhada a metodologia utilizada para o material Dm-Fêmea e Dm-Macho. No segundo fluxograma (em amarelo) é descrita a metodologia adotada para a amostra Dm-BSB.

3.1 Obtenção da Secreção Cutânea de *Dermatonotus muelleri*

Neste trabalho foi utilizado a secreção de *D. muelleri* obtidas por intermédio de duas colaborações.

Durante o congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia (dez/13), foi estabelecido uma colaboração com o profº Dr. Osmindo R. Pires Jr do Lab. de Toxinologia, no Instituto de Biologia-IB, da Universidade de Brasília-UNB.

Outra colaboração ocorreu com o grupo do professor Dr. Carlos Jared responsável pelo Biotério do Lab. de Bióterio do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

3.1.1 Coleta dos animais em parceria com o grupo da UnB

Os animais foram coletados, durante a noite, na Fazendo Nossa Senhora Aparecida, Município de Monte Alegre-GO, no começo do mês de novembro, quando tem início a estação chuvosa. A secreção cutânea destes animais foi extraída pela manhã do dia seguinte, lavando-os com água MiliQ e, em seguida, aplicando-se estímulo elétrico. Após o estímulo, os animais foram novamente lavados com água MiliQ e os extratos aquosos obtidos foram guardados em tubos falcons de 50 mL, liofilizados e armazenados em freezer à – 20ºC.

Cerca de 100 mg de secreção cutânea liofilizada foram obtidos. A secreção utilizada neste trabalho representa um pool de indivíduos sem distinção de sexo ou idade. Desta secreção liofilizada, aproximadamente 10 mg foram diluídos em 10 mL de água MiliQ para cada extração. Tal extrato aquoso foi centrifugado e o sobrenadante reservado para processos posteriores. Essa amostra é denominada como Dm-BSB.

3.1.2 Coleta dos animais em parceria com o grupo do IBu

Em paralelo, o Biotério do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan disponibilizou 8 animais recém-chegados para a coleta da secreção cutânea (dezembro de 2013). Destes 8 animais, 6 eram machos e 2 fêmeas.

A secreção cutânea destes animais foi obtida de acordo com o gênero (macho e fêmea) submergido-os, separadamente, em um béquer contendo água deionizada, comprimindo-os gentil e manualmente.

As secreções obtidas das duas fêmeas foram reunidas e denominadas de Dm-fêmea; enquanto que as secreções dos seis machos reunidas foram chamadas de Dm-macho. Tais extratos aquosos foram congelados à – 20ºC.

3.2 Preparação das amostras

A secreção cutânea de *D. muelleri* é ligeiramente viscosa. Sendo assim, requer um tratamento prévio das amostras para que não cause danos aos equipamentos analíticos, como, por exemplo, à coluna utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3.2.1 Filtração por Centrifugação

Para avançar nas etapas de cromatografia líquida as amostras foram filtradas por centrifugação em membranas de corte molecular (10 KDa), a 7.500 x g, durante 10 minutos.

Este processo resultou em duas porções; o extrato de alta massa molecular retido no filtro e o extrato contendo moléculas de baixa massa molecular (filtrado). Ciente que os procedimentos de coleta da secreção cutânea foram diversos, para evitar confusão entre as nomenclaturas, foi estabelecido que:

- As amostras <u>filtradas</u> de Dm-BSB, Dm-fêmea e Dm-macho, foram identificadas como DmF-BSB, DmF-fêmea e DmF-macho;
- As amostras <u>retidas no filtro</u> (alta massa), foram identificadas como DmR-BSB, DmR-fêmea e DmR-macho.

O extrato de alta massa foi utilizado para analisar as proteínas presentes na secreção cutânea de *D. muelleri* utilizando a técnica de eletroforese em gel.

Já o filtrado foi utilizado para analisar os componentes de baixa massa por de cromatografia líquida de alta performance.

3.3 Processamento das Amostras

O processamento das amostras divide-se em duas vertentes. O estudo a partir do extrato de alta massa (> 10 kDa) e o do extrato de baixa massa (< 10 kDa). No estudo de alta massa foi feita uma abordagem proteômica que pode-se estimar a dosagem de proteínas pela metodologia de Bradford (1976). Verificar o perfil

eletroforético das amostras de secreção cutânea de *D. muelleri*. Realizar teste para identificação de proteases por zimografia. E fracionar os componentes de alta e baixa massa, seguindo metodologias adequadas para cada caso.

3.3.1 Estimativa da quantidade de proteínas

A concentração de proteínas presentes na secreção cutânea de *Dermatonotus muelleri* foi estimada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Esse ensaio serviu para atentar a grandeza da proporção de proteínas presentes na secreção cutânea. Para aferir a estimativa de proteínas, foi aliquotado 10 μL do pool de DmR-BSB utilizado nas conseguintes análises eletroforéticas. Esta solução foi centrifugada e o sobrenadante (triplicata) foram incubados com 200 µL do reagente de Bradford por 5 minutos a temperatura ambiente e a densidade óptica foi medida em um leitor de placas/espectrofotômetro (SpectraMax M2 – Molecular Device®) a 595 nm. A concentração de proteínas foi calculada a partir de uma curva padrão que foi obtida pela mesma metodologia utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão de referência. Tanto a curva padrão quanto os cálculos das concentrações de proteínas das amostras foram obtidos pelo programa SoftMax Pro 5.4.1.

3.3.2 Eletroforese

Os extratos retidos (DmR-BSB, DmR-fêmea e DmR-macho) no filtro de corte molecular (10 kDa) foram utilizados para avaliar a presença de proteínas na secreção cutânea recorrendo a eletroforese em gel de poliacrilamida seguindo a metodologia proposta por Laemmli (LAEMMLI, 1970).

Para isto, 10 mL de géis de resolução de 12% e 10% foram preparados, sendo compostos, respectivamente, por: 3,2 mL de água destilada, 4 mL de poliacrilamida 30%, 2,6 mL de Tris-HCl - Cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano - 1,5 M (pH 8,8), 100 µL de SDS 10%, 100 µL de persulfato de amônio (PSA) 10% e 10 µL de tetrametiletilenodiamina (TEMED); e 3,8 mL de água destilada, 3,4 mL de poliacrilamida 30%, 2,6 mL de Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 100 µL de SDS 10%, 100 µL de PSA 10% e 10 µL de TEMED. Estes géis foram polimerizados entre placas de

vidro, utilizando sistema vertical da BIO-RAD. Após a polimerização, foram preparados 5 mL do gel de empilhamento 4% composto por 2,975 mL de água destilada, 670 µL de poliacrilamida 30%, 1,25 mL de Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 50 µL de SDS 10%, 50 µL de PSA 10% e 5 µL de TEMED. Este foi polimerizado sobre os géis de resolução, entre placas de vidro, juntamente com um pente para formação de poços nos quais as amostras foram aplicadas.

A eletroforese foi realizada em solução tampão de corrida (Tris-base 100 mM, glicina 768 mM e SDS 0,1%), sob corrente constante de 100 V.

Após a eletroforese, os géis de poliacrilamida foram corados com Azul Brilhante de Coomassie e nitrato de prata, em alguns casos. A coloração por Coomassie Blue consiste em colocar as amostras em solução corante (45% de metanol, 10% de ácido acético, 0,1 % de *Coomassie-blue* R-250 e 45 % de água destilada), durante 20 minutos. Em seguida, estes foram lavados com água destilada e colocados em solução descorante (10% de metanol, 10% de ácido acético e 80% de água destilada), até o aparecimento nítido das bandas de proteínas. A coloração por nitrato de prata baseia da descrição sequente. Colocar o gel de poliacrilamida em solução fixadora por overnight (50 mL de metanol, 12 mL de ácido acético, 50 µL de formaldeído 37% e 100 mL de água destilada). Seguido de lavagem (50% de metanol) e colocados em tiossulfato por 1 minuto (20 mg de tiossulfato de sódio em 100 mL de água destilada). Novamente lavado em água destilada e colocados na solução de nitrato de prata (200 mg de nitrato de prata, 75 µL de formaldeído 37% e 100 mL de água destilada), por 20 minutos em mesa agitadora. Colocar em solução reveladora (6 g de carbonato de sódio, 50 µL de formaldeído 37%, 2 µL de tiossulfato de sódio 2% e 100 mL de água destilada) até as bandas aparecerem. Lavar com água destilada e colocar em solução stop (50 mL de metanol e 12 mL de ácido acético) até o gel começar a desidratar. Manter o gel em água para evitar a desidratação.

3.3.3 Digestão de bandas do gel

Para o estudo proteômico da secreção cutânea de *D. muelleri* as bandas visualizadas no gel corado por coomassie blue foram recortadas e digeridas de

acordo com o método utilizado em nosso laboratório para digestão de gel e análise no espetrômetro de massas.

Foram recortadas as bandas mais intensas do gel, descoradas com metanol (MeOH) e reduzidas com ditiotreitol (DTT) (10 mM) e alquilados com iodoacetamida (IAA) (50 mM). Após a remoção destes reagentes, adicionou-se 100 mM de bicarbonato de amônio e depois tripsina (20 ng/µL), deixando incubar a amostra por um período de 12 h. No término da incubação com a enzima, os peptídeos gerados foram extraídos com 50% ACN e 5% ácido fórmico (WESTERMEIER e NAVEN, 2002).

As amostras foram submetidas à espectrometria de massas em um espectrômetro ESI-IT-TOF do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. A lista de peptídeos gerados foi analisada, inicialmente com busca pelo Mascot contra o banco de dados UniProt, além disso, o sequenciamento maciço *de novo* automatizado foi realizado pelo PEAKS Studio, com posterior analise de homologia pelo BLAST.

3.3.4 Zimografia

Após a análise proteômica do conteúdo da secreção cutânea de *D. muelleri* foi feito um ensaio para avaliar a presença de proteínas com atividade gelatinolítica no material contendo moléculas acima de 10 KDa, realizando-se a zimografia em gel contendo 1% do substrato gelatina.

Foram preparados géis de resolução 10% e de empilhamento 4% conforme especificado na seção 3.3.1, sendo o gel de resolução co-polimerizado com gelatina 1% (DIFCO Laboratories Inc, USA). Após a polimerização dos géis, as amostras (Dm-BSB e DmR-BSB) foram aplicados no gel, em condições não-redutoras. A eletroforese foi feita como detalhado no item 3.3.1. Ao terminar a eletroforese, o gel foi lavado duas vezes em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. O gel foi, então, incubado no tampão do substrato (Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), $CaCl_2$ 0,5 mM), a 37º C, durante 18 horas. Passado este período, o gel foi colocado em solução corante (45% de metanol, 10% de ácido acético, 0,1 % de “Coomassie-blue” R-250 e 45 % de água destilada), durante 30 minutos. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada e colocado em solução descorante (10 % de metanol, 10% de

ácido acético e 80% de água destilada), para visualização das bandas com atividade. A atividade gelatinolítica é evidenciada como regiões claras, em que ocorre digestão do substrato, contra o fundo corado em azul (KUGLER, 1999).

3.3.4.1 Zimografia em gelatina com inibidores

Para confirmar a classe enzimática da(s) protease(s) presente(s) na mistura das secreções com moléculas acima de 10 KDa, realizou-se a zimografia em gelatina, conforme descrito na seção 3.3.3, na presença de dois inibidores - ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e benzoamidina. Para o ensaio com o inibidor EDTA foi adicionado 5 mM de EDTA ao tampão de incubação, ajustando-se o pH desta solução para 8,0, com hidróxido de sódio (NaOH). Para o ensaio com o inibidor benzoamidina, adicionou-se benzoamidina 5 mM ao tampão de incubação.

3.3.5 Fracionamento do extrato >10 kDa

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada com o objetivo de separar os componentes do extrato de alta massa molecular (> 10kDa) presentes na secreção cutânea de *D. muelleri*.

Nesta técnica foi utilizado um sistema de cromatografia líquida AKTApurifier (GE Healthcare, Sweden) com uma coluna TricornTM 10/300 (GE Healthcare 10 mm x 30,0 cm). Como solvente foi utilizado 100 mM de bicarbonato de amônio, em fluxo constante de 0.7 mL/min, utilizando um método isocrático em 60 min de corrida. As frações foram coletadas e liofilizadas para posterior identificação.

3.3.6 Fracionamento do extrato < 10 kDa

As amostras contendo o filtrado de baixa massa (DmF-BSB, DmF-fêmea e DmF-macho) provenientes do processo de filtração por centrifugação foram analisadas por este processo de fracionamento. Devido à concentração mais abundante da amostra DmF-BSB, esta foi selecionada para os fracionamentos e as purificações conseguintes.

Os processos de fracionamento e purificação das moléculas presentes na secreção cutânea foram feitos por um sistema binário de HPLC de fase reversa (Proemenince 20A, Shimdzu, Kyoto, Japão) para separação da amostra. As amostras foram injetadas em coluna de fase reversa C_{18} (ACE® 100 x 4,6 mm) utilizando um sistema de dois solventes (A) *água MiliQ 100%* e (B) acetonitrila (ACN) 100%, em fluxo constante de 1 $mL.min^{-1}$, com um sistema de programação: 0 - 5 min, isocrático de 100% de solvente A; 5 - 25 min, gradiente linear de 0 a 100% de solvente B; 25 – 28 min, isocrático de 100% de B; 28 – 32 min, gradiente linear de 0 a 100% de A e 32 – 45 min, isocrático 100% A. O material eluido foi monitorado por comprimento de UV com detector PDA/DAD. Após o fracionamento, as frações coletadas foram concentradas em sistema de concentração a vácuo para posteriores análises.

3.4 Análise Bioquímica

Para a caracterização dos componentes da secreção cutânea de *D. muelleri* foram utilizadas algumas técnicas espectrométricas como a espectrometria de massas (Maldi-TOF e ESI-TOF-IT) e RMN.

3.4.1 Espectrometria de Massas

3.4.1.1 Espectrometria por Maldi-ToF

As frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular (gel filtração) foram analisadas, inicialmente, por MALDI-ToF. Para retirar o sal residual da corrida, foi feito um procedimento com ZIP-TIP C_4. O procedimento consistiu em lavar a ponteira por 2 vezes em MeOH, equilibrar a coluna em solução A (Água miliQ 100% e 0,1% de TFA) por 2 vezes, carregar a amostra (7 μL) entre 5 e 10 vezes, lavar a coluna com solução A e descarregar a amostra em um eppendorf com solução B (ACN 90%, 0,1% de TFA). A matriz utilizada na preparação da amostra foi o ácido sinapínico. Foi pipetado 1 μL da amostra e 1 μL da matriz, misturado e 1 μL da mistura (amostra/matriz) foi depositado na placa amostradora do MALDI-ToF.

A análise foi feita no equipamento Axima LNR system (Kratos Analytical, Shimadzu, UK) equipado com nitrogênio laser (337 nm). A faixa de massa detectada foi entre 500 a 200000 Da e foi utilizado em um modo linear com delay de 104 ns e voltagem de aceleração de + 20kV. O espectro final foi gerado com acumulação de 20 laser shots por fração e 50 perfis produzido por amostra o que resultou em 1000 laser shots por espectro.

3.4.1.2 Espectrometria por ESI-TOF-IT

A caracterização das moléculas presentes nas frações resultantes da separação por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada por espectrometria de massas.

As amostras de DmF-BSB foram diluídas em 50% MeOH em água e injetadas diretamente no espectrômetro por injeção manual, em um injetor Rheodyne, em modo positivo e negativo simultaneamente, com fluxo de 50 µL/min, na mesma solução usada na diluição das amostras. A voltagem da interface utilizada foi de 4,5 kV e a voltagem do detector, 1,76 kV, com temperatura de 200°C. A fragmentação foi feita por gás de colisão argônio, com 50% de energia e os espectros foram obtidos na faixa de 50 a 2000 m/z. Os dados obtidos foram analisados pelo software LCMSsolution (Shimadzu Co., Japão).

3.4.1.3 Ressonância Magnética Nuclear – RMN

Os experimentos por RMN foram feitos pela Central Analítica do Instituto de Química da USP, em colaboração da equipe do Dr. Massuo Jorge Kato, professor titular do Departamento de Química Fundamental da USP.

Foram utilizados os parâmetros de análise para RMN de ^{1}H, em espectrômetro Bruker DRX 500 (Bruker Co., Alemanha), frequência 500 MHz. As amostram foram diluídas em metanol deuterado (MeOD). Os resultados serão processados no software TopSpin 1.3 (Bruker Co., Alemanha).

3.5 Análise Biológica

Com intenção de avaliar atividade biológica das frações coletadas por cromatografia, foi feito um screening inicial para um ensaio de antimicrobicidade.

3.5.1 Testes antimicrobianos

As 12 frações de DmF-BSB, separadas cromatograficamente nas etapas anteriores, foram testadas com o propósito de verificar atividade antibiótica, em ensaios de inibição do crescimento de quatro espécies de bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Micrococcus luteus*) em colaboração com a Dra. Rita de Cássia Ruiz, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Resumidamente, uma colônia de cada cepa de bactérias cresceu durante 12 h em meio rico (TSB). Após este período, 40 µL desta colônia foram adicionados a 3 mL de meio pobre (PB) e mantidas por 2 horas, sob agitação a 250 rpm. Foi então medida a absorbância desta solução em 595 nm, sendo diluída em PB até a absorbância chegar a 0,001. Esta solução de bactérias foi incubada com a amostra, diluída em meio pobre, durante 18 horas, a 30°C e 150 rpm. Ao final, a absorbância foi medida a 595 nm, e comparada a um controle negativo, contendo apenas PB, e a um controle positivo, com uma solução de bactérias com absorbância de 0,001 onde não há incubação com a amostra. A opção pelo ensaio de inibição de crescimento bacteriano em solução e não pela metodologia proposta pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) que favorece moléculas hidrofílicas, ocorreu devido ao desconhecimento inicial das classes moleculares responsáveis pela atividade que podem ter seu comportamento alterado em função de eventuais problemas na difusão no meio sólido (Agar), conforme recentemente abordado por (NASCIMENTO et al., 2007).

4 RESULTADOS

4.1 Estimativa da quantidade de proteínas presentes na secreção cutânea

Por meio da execução metodologia de Bradford, foi obtida uma estimativa da quantidade do conteúdo protéico presente no pool de secreções retidas (DmR-BSB) na membrana de corte molecular de 10 KDa. Este ensaio teve como objetivo indicar a presença de proteínas na secreção cutânea, uma vez que, essas proteínas foram utilizadas para ensaios de eletroforese.

O teste estimou a presença de proteínas na concentração de 2,2 mg/mL.

4.2 Eletroforese

O método de eletroforese foi utilizado para avaliar o perfil da distribuição de massas e o conteúdo proteico das secreções. A análise das secreções foi feita de diversas maneiras a fim de produzir um resultado comparativo entre as amostras (Figura 4).

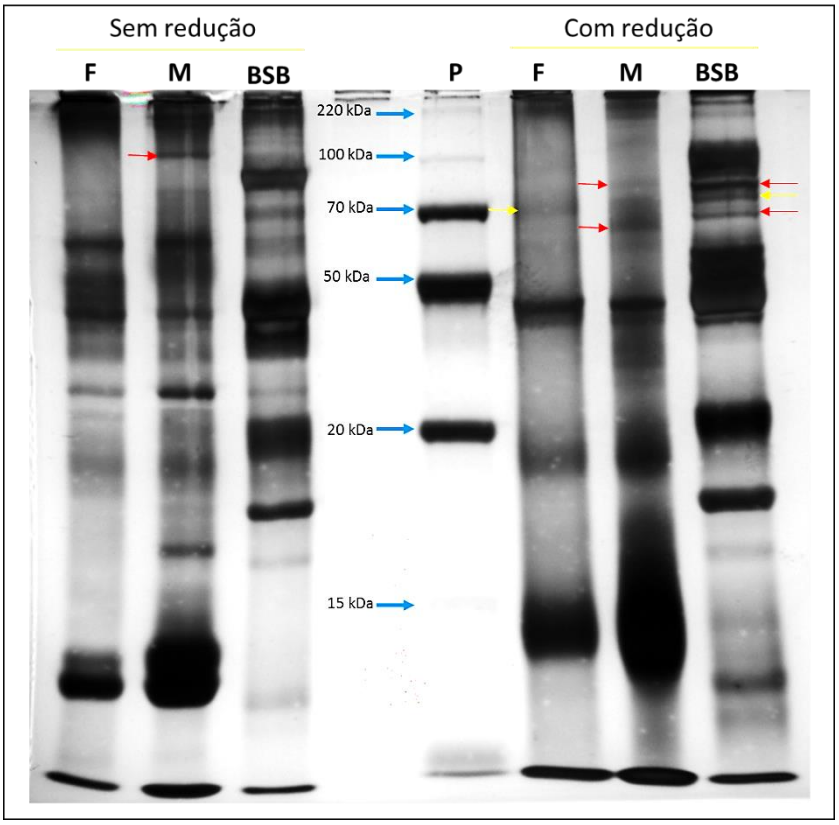

Figura 4: SDS-PAGE 12,5%, corado por nitrato de prata. A primeira metade do gel mostra as amostras F – DmR-fêmea; M – DmR-macho e BSB - DmR-BSB em condições não redutoras. A segunda metade do gel mostra o P – Padrão; F – DmR-fêmea; M – DmR-macho e BSB - DmR-BSB em condições redutoras. As setas indicam diferenças nas bandas entre fêmea (amarelo) e macho (vermelha).

Como ilustrado na Figura 2, há a comparação entre as secreções de fêmea (**F** - DmR-fêmea), macho (**M** - DmR-macho) e **BSB** - DmR-BSB, sem e com redução por beta-mercapto-etanol coradas com nitrato de prata. No conjunto geral das amostras, destacam-se as bandas com cerca de 100, 70, 50, 20, e 15 kDa.

As setas em amarelo representam as bandas que aparecem somente em indivíduos fêmeas. Já as setas em vermelho, exibem as bandas presentes em indivíduos machos. As faixas do conteúdo protéico referentes à amostra DmR-BSB apresentam as três bandas examinadas nos indivíduos fêmeas e machos. A amostra DmR-fêmea apresenta uma banda na faixa de 70 kDa que não é observada na secreção do macho. Em contrapartida, no material DmR-macho, são verificadas bandas com cerca de 65kDa e 85 kDa, aproximadamente, que não estão presentes na secreção das fêmeas. Por se tratar de uma mistura de secreções de machos e fêmeas, no material DmR-BSB, estas bandas podem ser visualizadas.

4.3 Digestão do Gel de Eletroforese

O material DmR-BSB é o mais concentrado e foi selecionado para realizar o procedimento de digestão de amostra e ser analisado por espectrometria de massas seguido da compilação dos dados pelo software PEAKS e comparado por bancos de dados disponíveis.

Para a análise proteômica da amostra DmR-BSB, foram recortadas 15 bandas (Figura 5) a fim de realizar um procedimento de digestão das bandas mais intensas no gel de eletroforese 12,5% corado por coomassie blue e posterior análise bioquímica em um espectrômetro de massas.

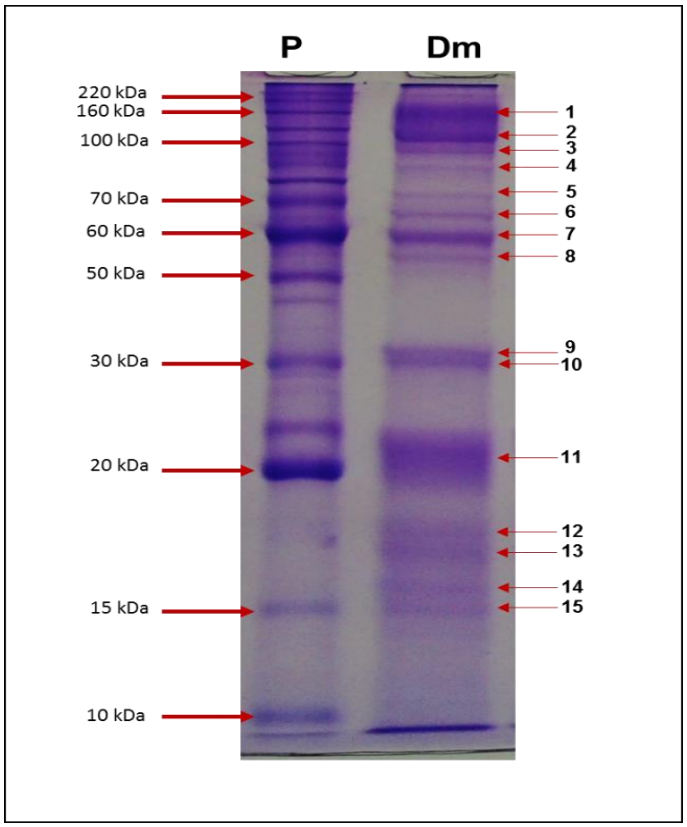

Figura 5: SDS-PAGE 12,5%, corado por coomassie blue. P- Padrão e Dm – DmR-BSB. As setas da direita indicam as 15 bandas recortadas para digestão e posterior análise proteômica por espectrometria de massas.

As bandas recortadas foram analisadas por uma abordagem proteômica, por espectrometria de massas com fonte eletrospray. Devido a ausência de bancos de dados para a espécie, a lista de peptídeos obtidos por sequenciamento de novo foi

analisada via BLAST, contra as proteínas de squamata. A tabela 1 apresenta a lista das proteínas do banco de dados identificadas por esta abordagem.

Tabela 1. Correspondência entre as bandas recortadas e respectivas massas moleculares.

Bandas	Massa Molecular (kDa)	Correspondência
1-2	110-160	• Octapeptide Repeat protein T2 – "*Ophiophagus hannah"* • *Fusaric acid – "Capsella rubella"* • RHO guanine nucleotide Exchange fator 7 – "*Harpegnathos saltador*"
3		• Nucleoporin 37kDa – "*Xenopus tropicalis*"
4		• DRE-Binding protein 2 – "*Sorghum bicolor*"
5	70	• Queratina de diferentes espécies
6	65	• Selenium-binding protein – "*Xenopus sp.*"
7	60	• Thrombin-like enzyme – "*Cerastes cerastes*" • Calmodulin-binding motif – "*Xenopus tropicalis*"
8	55	• -
9	31	• -
10	30	• Queratina tipo II citoesqueleto – "Gorila"
11	21	• -
12	18	• -
13	17	• Cyclophilin A (17kDa) – "*Ambystoma tigrinum*"
14	16	• Queratina tipo I citoesqueleto – "*Crotalus adamantus*" e "*Anolis carolinensis*"
15	15	• AP2M1 – "*Xenopus tropicalis*"

4.4 Zimografia

A banda 7 de massa molecular 60 kDa apresentou analogia mediante a análise por PEAKS à protease. Esta informação induziu o estudo de zimografia para revelar a presença destas enzimas na secreção cutânea de *D. muelleri*.

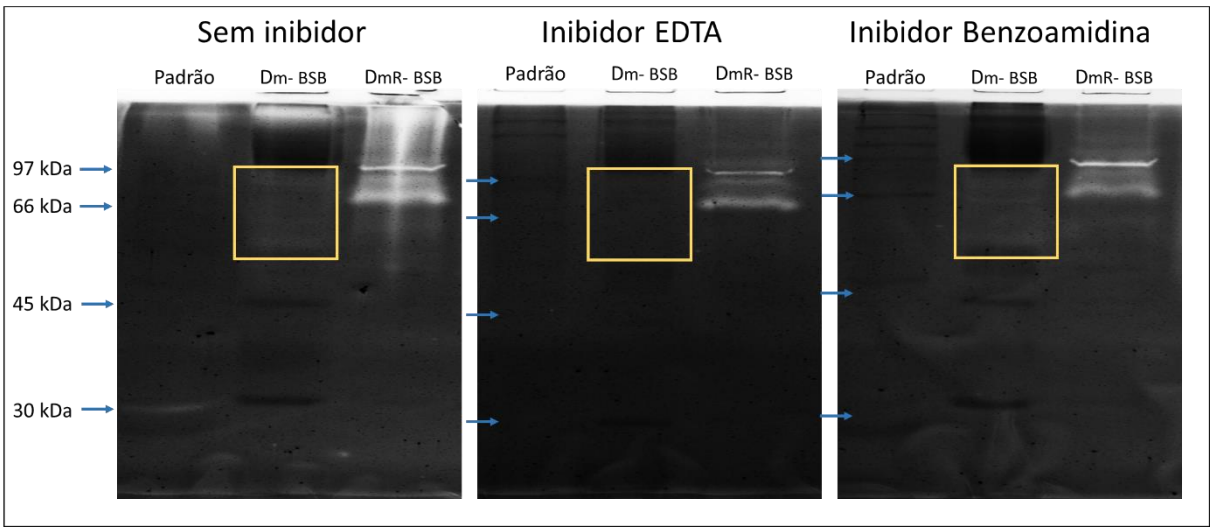

Figura 6: Zimografia em gelatina. O primeiro gel representa a zimografia incubada com tampão Tris sem inibidor. O Segundo gel mostra a zimografia incubada com o tampão Tris com inibidor EDTA. E o terceiro gel representa a zimografia incubada com o tampão Tris com inibidor benzoamidina. As legendas se referem ao padrão, Dm-BSB – extrato aquoso total da secreção cutânea de D. muelleri e DmR-BSB – extrato de alta massa retido em membrana de corte molecular 10 kDa. A região destacada pela caixa amarela representa a região do gel no qual houve supressão da atividade protelítica sobre gelatina quando este foi incubado com EDTA.

Um ensaio de zimografia com gel de gelatina (Figura 6) foi realizado no qual investigou-se a presença de algumas bandas com atividade proteolítica. Para constatar a propriedade destas proteases, foram realizados mais dois ensaios com dois inibidores (EDTA e Benzoamidina). Primeiro, para verificar a presença de metalopeptidases, foi utilizado o inibidor EDTA. Na faixa de 66 kDa do material Dm-BSB, observa-se que o EDTA inibiu atividade proteolítica o que instigou a hipótese de que as bandas dessa faixa fossem representantes da classe de metalo peptidases. Conduziu-se também, um ensaio com o inibidor Benzamidina a fim de checar atividade de serino peptidases na secreção cutânea de *D. muelleri*. Neste ensaio considerou-se que a benzoamidina não foi capaz de inibir a atividade peptidásica no gel, o que sugere a ausência da classe de serino peptidases.

4.5 Fracionamento da Secreção Cutânea de Alta Massa por Gel Filtração

A cromatografia de exclusão molecular (gel filtração) consolidou uma separação do pool dos extratos de alta massa molecular obtido da secreção cutânea de *D. muelleri* proveniente de Brasília (DmR-BSB). O perfil do fracionamento está exibido abaixo (Figura 7).

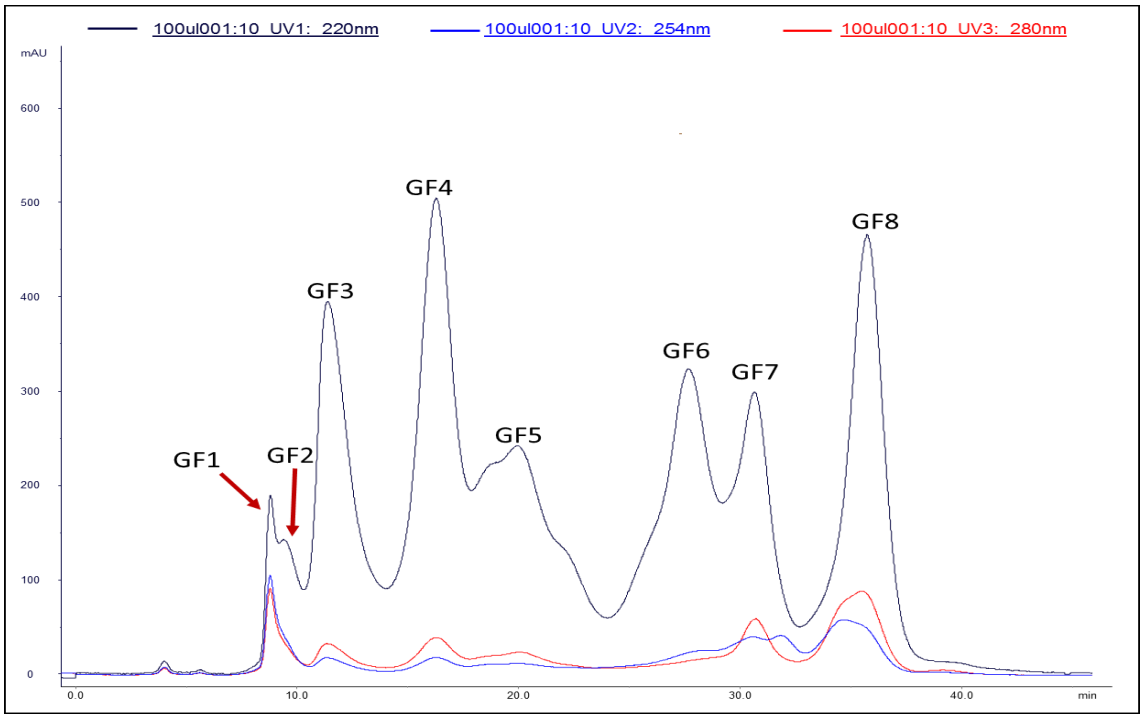

Figura 7: Perfil da cromatografia de exclusão molecular para a amostra DmR-BSB. Em preto, está representada a amostra DmR-BSB no comprimento de onda UV 220 nm; em vermelho, está representada a amostra DmR-BSB no comprimento de onda UV 254 nm e, em azul, está representada a amostra DmR-BSB no comprimento de onda UV 280 nm. Os picos estão marcados com as legendas GF1, GF2, GF3, GF4, GF5, GF6, GF7 e GF8, que representam os picos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente, coletados.

O perfil cromatográfico mostra 8 picos que correspondem a 8 frações coletadas. Tais frações foram liofilizadas, seguida de análise por Maldi-ToF com o propósito de identificar massas de proteínas ou peptídeos presentes.

4.6 Fracionamento da Secreção Cutânea de Baixa Massa

Os extratos aquosos das secreções cutâneas das três amostras (DmF-BSB, DmF-macho e DmF-fêmea) foram analisados separadamente. De acordo com os perfis obtidos das análises por cromatografia líquida de alta eficiência constatou semelhanças entre a composição das amostras investigadas, diferenciando-se apenas nas intensidades dos picos (Figura 8).

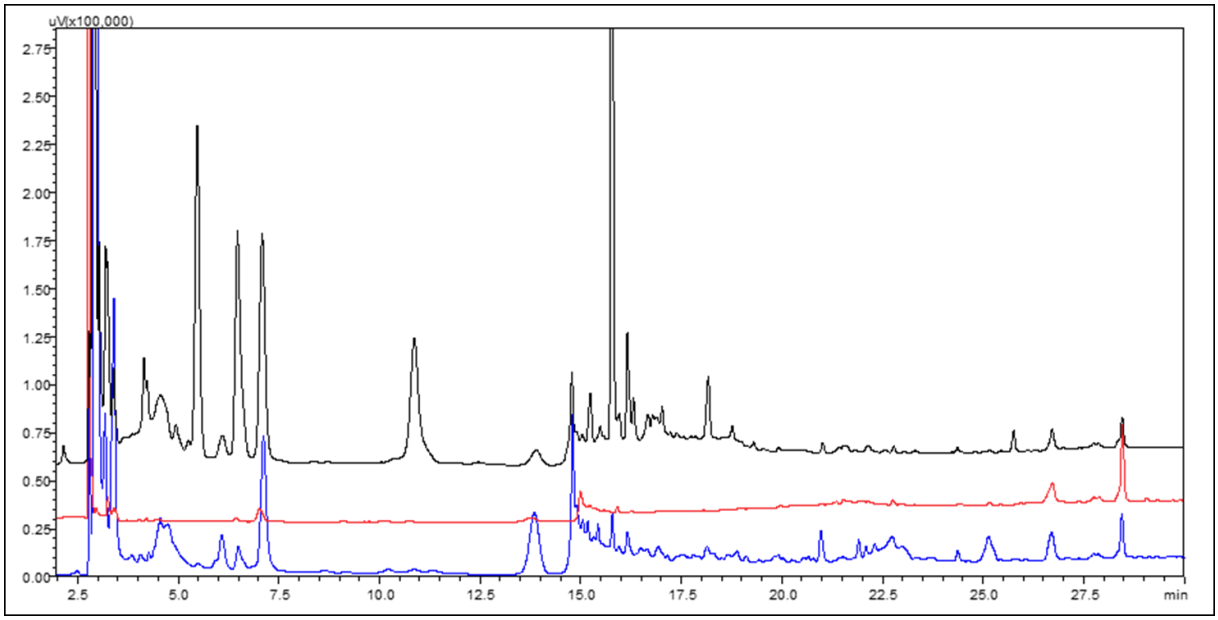

Figura 8: Comparação dos extratos aquosos das secreções cutâneas de *D. muelleri* por RP-HPLC em coluna C_{18}, monitorado a 214 nm. Em preto, está representada a amostra DmF-BSB; em vermelho, a secreção do material DmF-fêmea e, em azul, a secreção do material DmF-macho.

O material de DmF-BSB é o mais concentrado e o que contém mais material a ser trabalhado, portanto, este foi escolhido para purificação dos componentes. As amostras de fêmea (DmF-fêmea) e de macho (DmF-macho) estão pouco concentradas devido à falta de animais para a coleta da secreção.

Na figura 9, é representado o perfil de DmF-BSB dividido em doze frações que foram coletadas manualmente.

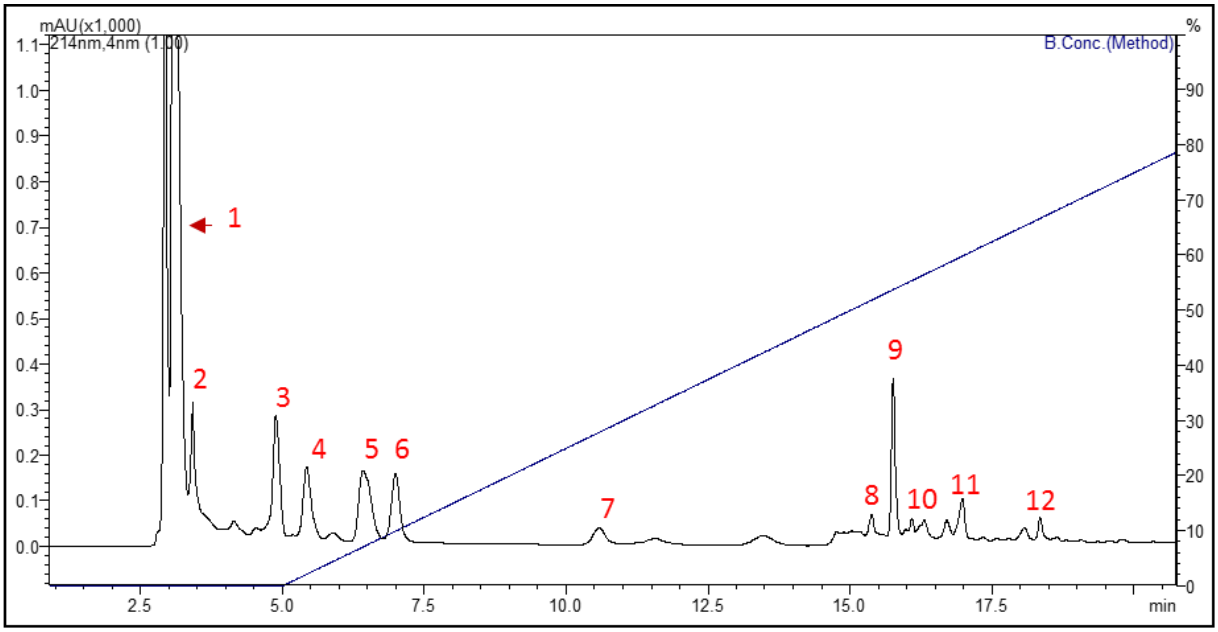

Figura 9: Perfil cromatográfico (ampliado) das secreções cutâneas filtradas de *D. muelleri.* O cromatograma foi obtido por RP-HPLC em coluna C_{18}, monitorado a 214 nm. Os números 1 a 12 indicam as frações coletadas.

4.7 Espectrometria de massas

3.4.1 *Espectrometria por MALDI-ToF*

A análise por MALDI-tof foi realizada a fim de expor massas das proteínas e peptídeos presentes no extrato de alta massa (>10kDa) de DmR-BSB. Duas frações apresentaram perfis no qual foram relevantes no quesito exposição dos valores de massas. Estas frações GF4 e GF5, apresentaram massas na faixa de 5000 a 20000 Da.

A análise da fração GF4 detectou um pico de m/z 14 kDa e um de 7 kDa com potencial de auferir duas cargas (Figura 10).

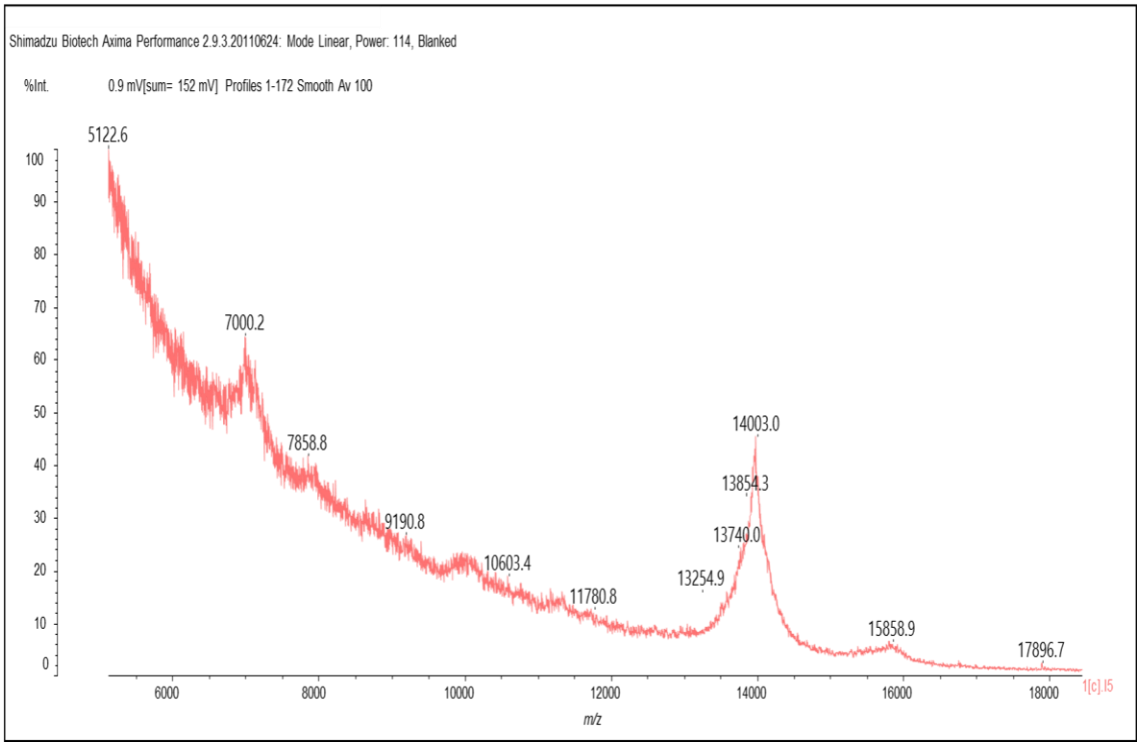

Figura 10: Espectro da fração GF4 analisada por MALDI-ToF na faixa de 5000 – 20000 Da. O espectro de MALDI-ToF da fração GF4 obtida da gel filtração do extrato DmR-BSB.

A fração GF5 detectou vários picos representantes de proteínas e/ou peptídeos: com m/z de 5772 Da, 6932 Da, 8424 Da, 100031 Da, 11235 Da, 11723 Da, 13041 Da, 13896 Da e 15309 Da (Figura 11).

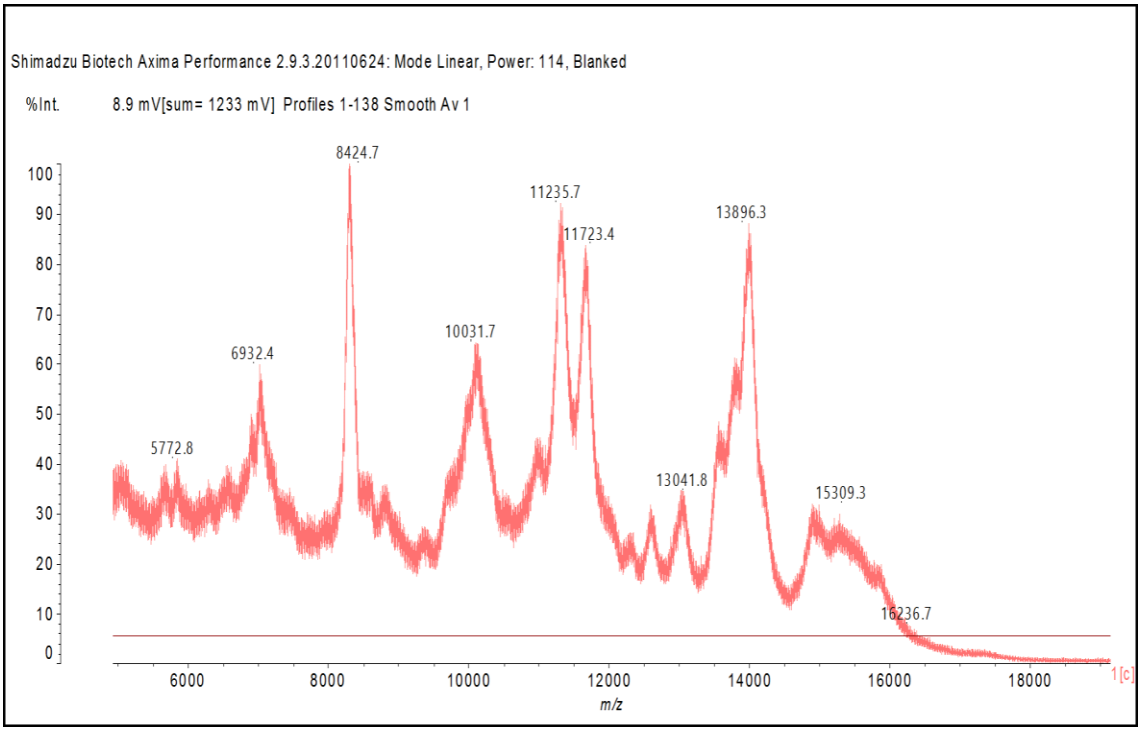

Figura 11: Espectro da fração GF5 analisada por MALDI-ToF na faixa de 5000 – 20000 Da. Espectro de MALDI-ToF da fração GF5 obtida da gel filtração do extrato DmR-BSB.

3.4.2 *Espectrometria por ESI-IT-ToF*

Os extratos filtrados das secreções cutâneas utilizadas anteriormente foram analisados por espectrometria de massas em modo positivo e negativo, simultaneamente. Os perfis de DmF-BSB, DmF-fêmea e DmF-macho obtiveram um perfil semelhante. Porém o perfil DmF-BSB apresentou maior concentração das amostras e foi selecionado para as análises de espectrometria de massas e RMN. As massas encontradas são referentes a moléculas de baixa massa molecular, em sua maioria (no limiar de 200-500 m/z).

A análise por espectrometria de massas foi realizada para todas as frações coletadas de acordo com o cromatograma da Figura 4. Essa análise foi feita com infusão direta no espectrômetro, no modo positivo e negativo, simultaneamente. Duas das 12 frações foram selecionadas para demonstrar o conteúdo de suas amostras. Estas frações (2 e 10) foram escolhidas e suas massas correspondentes estão representadas no espectro de massas (Figura 12). Para a escolha dessas frações, foram consideradas moléculas que ionizaram tanto em modo positivo

quanto negativo, complementando um modo de ionização ao outro e a clareza do espectro.

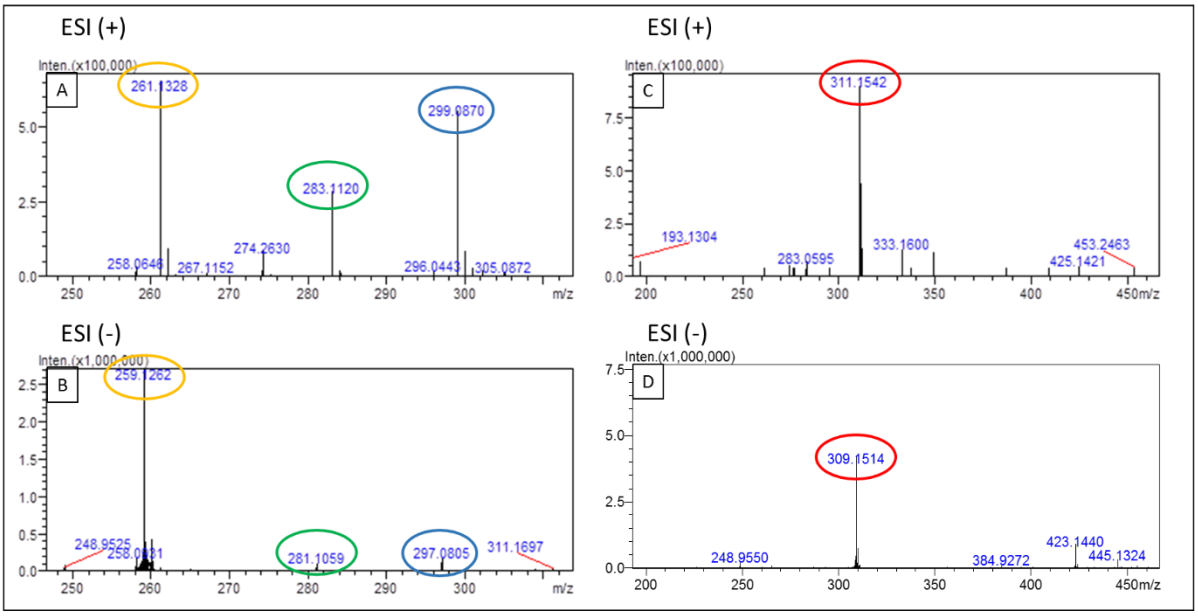

Figura 12: Espectro de massas por eletrospray das frações 2 (A e B) e 10 (C e D) obtida a partir do fracionamento de DmF-BSB. Em (A) o espectro da fração 2 em modo positivo e em (B) o espectro da fração 2 em modo negativo. Em (C) o espectro de massas da fração 10 em modo positivo e em (D) o espectro de massas da fração 10 em modo negativo.

Para as demais frações os dados relativos das massas (m/z) estão representados na tabela abaixo (Tabela 2). Em algumas frações a ionização por ESI-TOF-IT foi insuficiente, inabilitando a averiguação das massas relativas.

Tabela 2. Massas relativas (m/z) das frações de DmF-BSB.

Fração	Tempo de retenção (RT) (min)	Modo Positivo	Modo Negativo
1	3,0	261,1321 296,0532	259,1268
2	3,5	261,1321 283,1121 299,0869	259,1263 281,1062 297,0805
3	5,0	-	-
4	5,5	-	-
5	6,5	-	-
6	7,0	-	-
7	10,5	-	-
8	15,5	-	-
9	15,75	205,11 – 188,0634	
10	16,0 - 16,5	311,15	309,15
11	16,5 – 17,5	-	-
12	18,0 – 18,5	-	-

Dentre estas frações, detectou-se o aminoácido triptofano (fração 9), por intermédio da comparação de fragmentação do íon de m/z 205.08 em m/z 188.06 e 146.06 (Figura 13). Para confirmar a presença do triptofano foi realizada uma comparação entre os tempos de retenção por RP-HPLC do aminoácido purificado e do aminoácido obtido comercialmente, Figura 14.

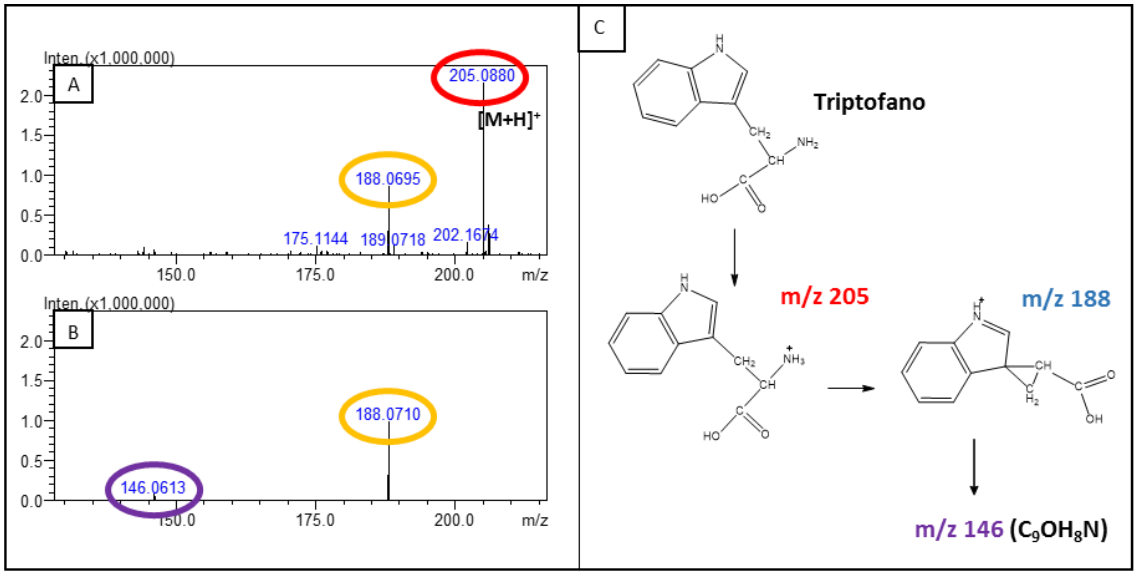

Figura 13: Espectro da fragmentação do íon de m/z 205 da fração 9 e a representação estrutural da fragmentação do triptofano. Em (A) o espectro de MS^1 da fração 9 em modo positivo mostrando o íon m/z 205, em vermelho e a fragmentação espontânea de m/z 205 em amarelo (m/z 188). Em (B) o espectro de MS^2 da fração 9 em modo positivo mostrando a fragmentação do íon precursor 205, gerando os íons 188 e 146, em amarelo e roxo, respectivamente. Em (C) a representação do mecanismo de fragmentação do aminoácido triptofano pelo orbital σ* NH_3, segundo Grègoire et al. 2008.

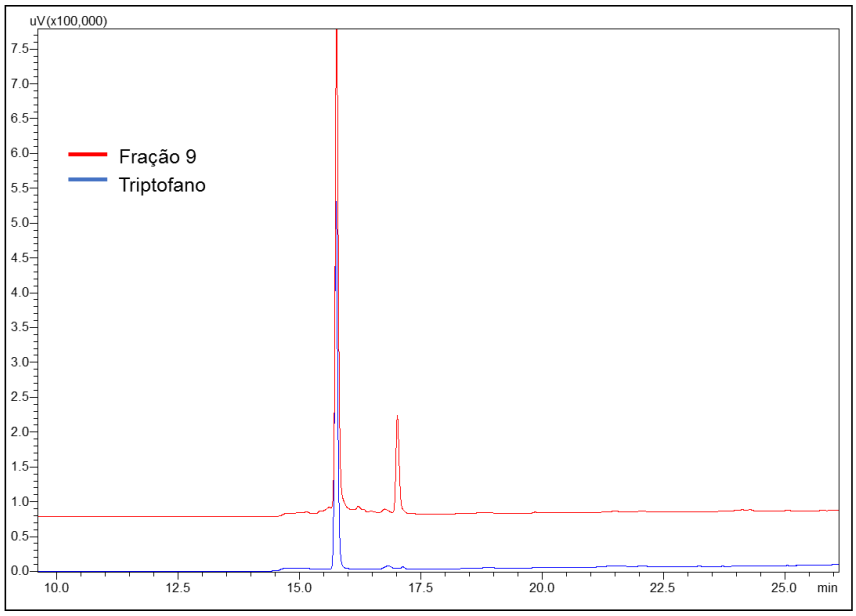

Figura 14: Comparação entre a fração 9 e o aminoácido triptofano. Cromatograma que representa a comparação dos tempos de retenção (15.75 min) entre a fração 9, em vermelho, da secreção de *Dermatonotus muelleri* e o aminoácido triptofano, em azul.

4.8 Ressonância Magnética Nuclear

O extrato de baixa massa de DmF-BSB foi analisado por ressonância magnética nuclear para revelar um panorama geral dos componentes contidos nas frações. Algumas frações também foram analisadas por RMN, porem devido à baixa quantidade de amostra, a análise não foi suficientemente satisfatória. Serão necessárias novas purificações para aumentar a quantidade de massas por fração a fim de ser melhor analisadas.

Entretanto a análise por RMN do extrato DmF-BSB apresentou um perfil majoritário de açúcares (Figura 15). O espectro de RMN do extrato DmF-BSB de *D. muelleri* apresentou picos com baixa intensidade na região de ~ 3,5 ppm.

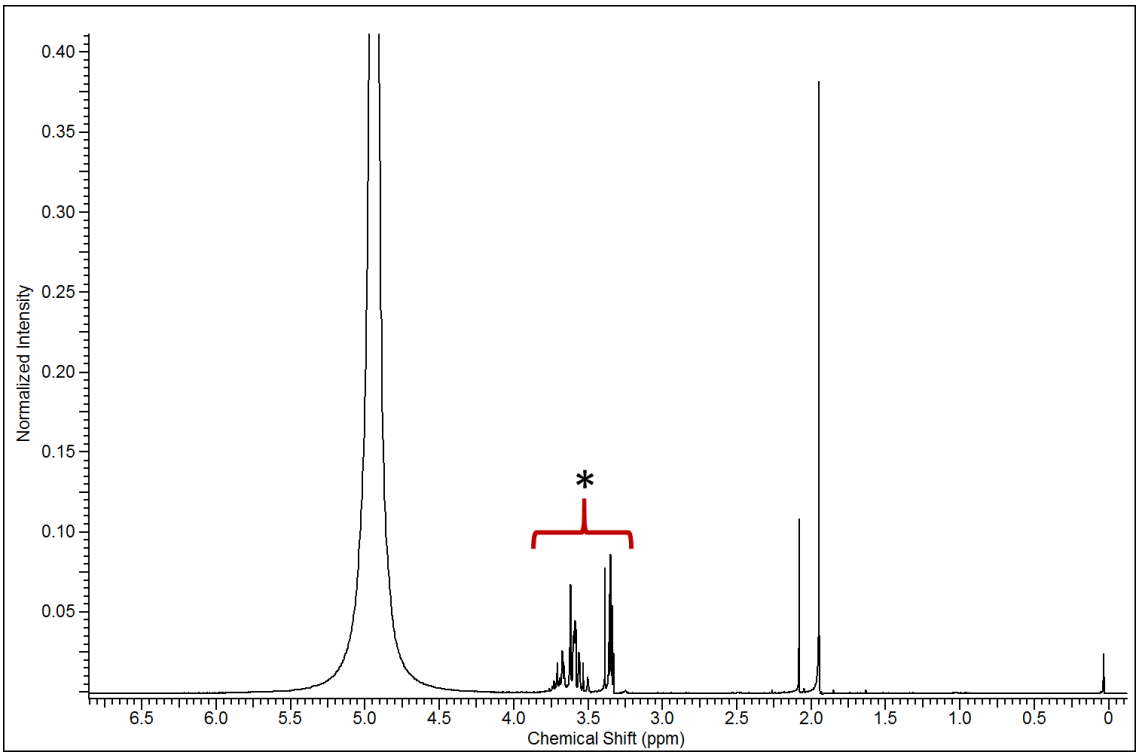

Figura 15: Espectro de RMN 1H do extrato DmF-BSB. O espectro representa os deslocamentos de hidrogênio para o extrato de baixa massa DmF-BSB. A chave vermelha com asterisco representa um agrupamento de deslocamento de hidrogênio.

4.9 Atividade Biológica

As 12 frações separadas por cromatografia líquida foram testadas a fim de verificar atividade antibacteriana, uma abordagem tradicional para secreções de anfíbios. Os ensaios de inibição de crescimento foram feitos contra quatro espécies de bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Micrococcus luteus*). As frações foram testadas em duas concentrações diferentes. Na concentração mais diluída não foi apurado nenhuma inibição de crescimento para nenhuma fração em nenhuma cepa testada. Já as frações mais concentradas, foi revelado um aumento do crescimento para a espécie *Staphylococcus aureus*. A fração 9, que contem como principal componente o triptofano, foi detectado o maior crescimento para *S. aureus*, com aumento de 79%.

5 DISCUSSÃO

A coleta da secreção cutânea de *D. muelleri* mostrou-se eficaz nas duas abordagens, tanto para os animais coletados pelo grupo de Brasília, quanto para o grupo do Biotério do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, uma vez que os perfis de eletroforese e cromatográficos Dm-BSB, Dm-fêmea e Dm-macho demandam boa similaridade no conteúdo examinado. O método de coleta de secreção utilizado para os animais de Brasília foi por estimulo elétrico e um dia após a coleta dos animais. Apesar do número de animais não indicado nesta coleta, constatou-se, pelas análises cromatográficas que este método rendeu melhores resultados na intensidade e concentração dos picos. Os animais que foram coletados e mantidos no biotério, receberam um tratamento diferente. A metodologia de coleta foi por meio de estimulação mecânica e os animais estavam fora do seu habitat natural. O que pode ter contribuído para uma menor quantidade de secreção, indicada pelos métodos de cromatografia no qual pode ser observado menor intensidade dos picos.

A filtração por membrana de corte molecular por centrifugação otimizou a análise por RP-HPLC, permitindo que moléculas de baixa massa molecular fossem evidenciadas. A separação do material permitiu que a análise de baixa massa molecular fosse evidenciada em melhores condições pela técnica de cromatografia líquida de alta performance em fase reversa, já que o extrato bruto interrompia a esta análise, em decorrência da presença de substâncias viscosa, como a cola expelida na secreção de machos. Corroborando a esta evidencia, revelou-se, pela técnica de eletroforese, a distribuição de componentes de alta massa molecular (no limiar de 160 – 15 kDa).

Como esperado, o material retido no filtro de corte molecular produziu diversas moléculas de alto massa molecular, proteínas, conforme relevado pelo gel de eletroforese SDS-PAGE. De acordo com a relevância deste procedimento e o ineditismo deste estudo, as bandas do gel de eletroforese foram recortadas a fim de serem analisadas por uma abordagem proteômica, por espectrometria de massas, focando principalmente nos peptídeos sequenciados de novo, dada a ausência de bancos de dados da espécie (e mesmo do gênero).

De acordo com a análise proteômica por ESI-TOF-IT e busca em bancos de dados com os programas Mascot e Peaks studio, foi viável analisar as bandas recortadas e digeridas da eletroforese em gel. O resultado desta análise está mostrado na tabela 1 e as de proteínas identificadas via BLAST com os peptídeos sequenciados. Este procedimento permitiu a comparação das sequências das proteínas encontradas na secreção, com sequencias já estudadas disponibilizadas em diferentes bancos de dados.

As bandas 1 e 2, por estarem próximas, resultaram em dados semelhantes. Foi apontado o Octapeptide repeat protein T2 de *Ophiophagus hannah,* a maior serpente peçonhenta do mundo, podendo alcançar 6 metros de comprimento, e encontrada no sul e sudeste da Ásia (STUART et al., 2012) Esta proteína é um polipeptídeo com alto grau de repetição semelhante a mutações de genes que causam demência progressiva (GOLDMAN e SCHAFER, 2014) . Nestas bandas também foi identificado um peptídeo relacionado a proteína que codifica a produção do ácido fusárico, encontrado em fungos do gênero *Fusarium*. O ácido fusárico é uma micotoxina geralmente tóxica para plantas, animais incluindo seres humanos (BACON et al., 1996). Este ácido é um alcaloide com núcleo piridínico, com o ácido carboxílico localizado na posição 2. Este mesmo núcleo piridínico é encontrado no ácido nicotínico, conhecido com vitamina B3, porem a posição do ácido carboxílico está no carbono 3. Outra provável enzima identificada, é responsável pela codificação do nucleotídeo RHO guanine (Exchange fator 7) de *Harpegnathos saltador*, uma espécie de formiga. Sabe-se que a alimentação da maioria dos anuros é composta por pequenos insetos, tais como formigas, destes animais também é retirado alguns componentes utilizados pelos anuros para produção de veneno. O nucleotídeo RHO guanine desempenha um papel fundamental em processos celulares, funcionando com receptores acoplados a proteína G. (BONASIO et al., 2010).

Já a banda 3 apresentou similaridade ao peptídeo nucleoporin 37 kDa encontrado no anuro *Xenopus tropicalis*. Esta proteína, em *Xenopus*, tem função predita por similaridade de atuar em processos nucleares, ligados a organização de cromátides. Sua presença na secreção poderia ser fruto da natureza sincicial das glândulas cutâneas de anfíbios.

Algumas das proteínas analisadas mostraram funções correlatas a *D. muelleri*, como as bandas 4, 6, 7. A banda 4 apresentou uma analogia a "*DRE-binding protein 2*", está proteína está ligada ao aumento da tolerância a temperatura ambiental para o organismo. (SHEN et al., 2003). De acordo com o banco de dados, é encontrada em plantas (genômica), como *Sorghum bicolor*, é uma espécie de gramínea, de clima de temperado e tropical, resistente à seca (VILELA, 2009) . Apesar de ser encontrado em plantas, uma proteína desta natureza ou com estas propriedades confeririam vantagens evolutivas bastante interessantes para a sobrevivência de *D. muelleri* que habita locais secos e com altas temperaturas. Encontrada na banda 6, a analogia selenium-binding protein, identificada no projeto genômico de *Xenopus* sp., reforça a presença desta proteína pela semelhança da massa molecular (57 kDa). Selenium-Binding é uma proteína citosólica parcialmente caracterizada em 1989. Em alguns estudos é sugerido a expressão de um papel supressor de tumores, isto baseado que a expressão dessa proteína é reduzida em tecidos tumorais no pulmão, cólon e esôfago, do ovário e no fígado. Em contrapartida, foi constatado que no cérebro de alguns pacientes com esquizofrenia há elevadas taxa de expressão desta proteína. Também pode ser encontrada com um papel relevante na prevenção do envelhecimento, modificação do estado oxidativo e no transporte de proteína ou degradação em células. Apesar dos estudos citados, as funções fisiológicas da Selenium-binding ainda são desconhecidas. (TSUJIMOTO et al., 2013). A presença desta proteína na secreção cutânea de *D. mullerei* poderia estar ligada a processos de controle de radicais livres e agentes oxidantes que poderiam ser antibióticos neste animal, uma vez que nenhuma fração de baixa massa molecular analisada aqui foi capaz de promover sequer redução do crescimento bacteriano. No entanto, esta hipótese precisa ser testada ainda.

Outras analogias interessantes foram encontradas na banda 7, como a presença de uma enzima conhecida com Thrombin-like, uma serinoproteinase de 60 kDa, encontrada nas serpentes *Cerastes cerates*. Essa enzima é conhecida por pertencer a uma classe de serino proteases que são responsáveis pela coagulação do sangue in vitro e como um anticoagulante in vivo (BELL JR., 1988; MAGALHÃES et al., 2007). No entanto, nossos ensaios em gel não foram capazes de revelar esta atividade de seriniopeptidase e nem inibi-la via bezamidina. Por outro lado, as

condições da zimografia podem estar longe das ideais para o correto funcionamento catalítico desta enzima. Ensaios complementares ainda se fazem necessários.

Outra importante proteína encontrada no banco de dados foi a Calmodulin-binding motif de *Xenopus tropicalis*. Trata-se de uma proteína dependente de Ca2+ que atua como intermediaria em inúmeros processos celulares que vão desde a inflamação, apoptose, até a contração da musculatura lisa e migração celular, sendo estes dois últimos processos condizentes com o que se espera de um tecido secretor como a pele de anfíbios.

As bandas 5, 10 e 14, apresentaram analogia a proteína de queratina de diferentes espécies de animais. O termo queratina foi muito utilizado para classificar proteínas estruturais de chifres, garras e cascos. Atualmente, o termo "queratina" abrange todas as proteínas intermediárias de formação de filamentos produzidas em qualquer epitélio de vertebrados. Podem ser classificadas em queratina do tipo II (básica), conservam uma faixa de massa molecular de 52-70 kDa (FUCHS et al., 1981; MOLL et al., 1982). São queratinas específicas no processo de queratinização suave, porém há algumas que participam da queratinização mais pesada. E as queratinas do tipo I (ácidas) com uma faixa de peso molecular entre 40 – 56,5 kDa. São queratinas pequenas e são específicas para cabelos em humanos (COULOMBE e OMARY, 2002).

A banda 13 apresentou uma similaridade à proteína Clyclophilin A de 17 kDa. A ciclofilina A foi inicialmente caracterizada pela sua capacidade de catalisar a transição entre resíduos de prolina cis e trans críticas para a dobragem correta de proteínas. É uma citocina pró-inflamatória que é liberada em resposta a estímulos inflamatórios. Além disso, a ciclofilina A tem se mostrado competente para promover a aterosclerose por meio da ligação a metaloproteinases de matriz (MMP) (SYSTEMS, 2015). E a banda 15 apresentou uma analogia a uma proteína não caracterizada de *Xenopus tropicalis*, nomeada de AP2M1, responsável pela acidificação de endossomos e lisossomas. Neste caso, um pequeno peptídeo “LDLK” foi identificado por *De novo*.

O ensaio zimográfico foi originado com base nas análises por Peaks studio, no qual proteínas análogas a enzimas com atividade proteolítica foram identificadas. A partir disto buscou-se algum ensaio que pudesse evidenciar tais atividades. A zimografia com gelatina revelou a presença de enzimas protelíticas conforme

averiguada na faixa de 66 – 97 kDa do gel incubado sem inibidor, apenas com o tampão. Para confirmar as classes enzimáticas propostas na identificação proteômica os zimogramas foram realizados na presença de tampões e inibidores específicos que pudessem discriminar as atividades metalo e serinopeptidásica. Neste ensaio indagou-se que o EDTA foi capaz de inibir a atividade na região de 66 kDa, sugerindo atividade de metalo proteinases. De acordo com um estudo de 2014, identificou-se a presença de atividade proteolítica para proteína com dependência de cálcio para um anuro *L. labirinticus*. Neste estudo eles sugerem a presença dessa metalo proteinase na faixa de 60 kDa (LIBÉRIO et al., 2014).

Conjuntamente, a zimografia foi ensaiada para atividade de serino proteinases. Do mesmo modo, o gel de zimografia foi incubado com tampão Tris e inibidor benzamidina, o que revelaria a presença de serino proteinases. Neste ensaio foi evidenciado uma sutil inibição para as bandas presentes no gel.

Com o objetivo de melhor caracterizar as proteínas presentes na secreção cutânea de *D. muelleri*, gel filtração foi realizada e as frações resultantes deste processo foram analisadas por espectrometria de massas Maldi-tof, que demonstrou, apesar da pouca quantidade de amostra, vários valores de m/z condizentes como a separação cromatográfica e com as bandas de eletroforese, reforçando a identificação das proteínas. As frações GF4 e GF5, foram a que produziram melhores espectro de massas por esta técnica.

A fração GF4, exibiu um m/z de próximo 14 kDa. Cabe lembrar que estas análises de proteínas por MALDI-TOF são realizadas no modo linear, no qual a resolução é baixa (com valores nominais de cerca de 10 a 30, enquanto no ESI, a resolução gira em torno de 10000), portanto não há sentido em se utilizar todos os algarismos por espectro processado. Esta massa, 14 kDa, é uma massa típica de fosfolipases, podendo ser este ou outro candidato a agente antimicrobiano em função da ausência de pequenas moléculas com esta atividade em nossos ensaios.

Os três perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC das secreções cutâneas filtradas (DmF-BSB, DmF-fêmea e DmF-macho) evidenciaram similaridade, destacando diferenças apenas em relação à intensidade entre as amostras e a presença de alguns picos que não são revelados em todos perfis. Estas sutis alterações podem estar relacionadas à concentração dos materiais ou à presença de fatores como: dieta, habitat, idade, sexo, entre outros, como têm sido observados no

decorrer dos trabalhos do nosso grupo de pesquisas com anuros e também em outras espécies como de serpentes já referenciado à literatura (CHIPPAUX et al., 1991). Além destes fatores podemos incluir que a abordagem de coleta entre os dois materiais foi diferente, sendo um por estimulo elétrico e o outro por estimulo mecânico (compressão das glândulas na pele do animal). Considerando que o estimulo elétrico causa um maior estresse no animal, este tem por razão liberar mais secreção quando acionado.

A coleta das frações obtidas a partir do extrato aquoso Dm-BSB foi monitorada pelo comprimento de onda de 214 nm. Os picos obtidos do espectro de massas dos extratos brutos equivalem a valores baixos de m/z. Por outro lado e diferentemente da maioria dos anfíbios estudados na literatura, a ionização das moléculas foi evidenciada de maneira mais clara e intensa em modo negativo, o que pode estar relacionado à acidez das moléculas presentes, visto que a ionização em modo negativo ocorre na ausência de protonação, pois os solventes utilizados não contêm adição de ácidos. (VESTAL, 2001). Esta informação corrobora a análise por RMN do extrato de baixa massa que, segundo nossos colaboradores, é rica em açucares. Açúcares não são passíveis de serem separados por fase reversa e nem são detectados por UV ou por, tradicionalmente, por ESI.

Mesmo assim, um número razoável de sinais pode ser obtido por ESI+/-, como apresentado na Figura 5, na qual pode-se observar que as ionizações nos modos positivo e negativo se complementam exibindo uma integridade nas análises. Na fração 2, observa-se três ionizações, podendo ser referente a uma mistura de componentes na fração ou até mesmo uma fragmentação espontânea da amostra. Já na fração 10, observa-se apenas um pico intenso, porém não significa que a amostra está pura. O que pode ocorrer é que a molécula, representada pela massa de 310,153 m/z, pode ter se destacado em vantagem a outras, ou outras eventuais moléculas não atingiram o grau de ionização, situações comuns em espectrometria de massa de misturas complexas e desconhecidas.

Um dos componentes da fração 9 foi identificado como o aminoácido triptofano pela fragmentação do íon m/z 205,06 em m/z 188,08 e m/z 146,06, característica fragmentação do triptofano aquoso, já que este apresenta como íon molecular protonado $[M+H^+]$ m/z 205 ($C_{11}O_2H_{13}N$), e quando fragmenta por MS^2 gera os íons m/z 188, devido à perda de NH_3 (fragmento $C_{11}O_2H_{10}N$) e m/z 146, referente

ao fragmento C_9OH_8N (MOURA et al., 2011). A confirmação da presença de triptofano pode ser observada quando se comparou os tempos de retenção (15.75 min) entre a fração 9 e o triptofano obtido comercialmente.

O triptofano é ponto de partida para síntese de muitos alcaloides indólicos que compreendem atividade biológica (CORDELL et al., 2001). Os alcaloides indólicos são sintetizados mediante da descarboxilização do triptofano conseguintes modificações de cadeias laterais (CAPASSO, 1998) Dentre os alcaloides descritos com atividade biológica, pode-se citar a bufotenina, frequentemente encontrada em anuros da família dos bufonídeos e já descrita pelo nosso grupo em ensaios de atividade biológica (VIGERELLI et al., 2014). Por outro lado, alcaloides indólicos como a bufotenina são capazes de serem analisados por RP-HPLC-ESI-$MS^{+,}$ gerando espectros claros e inequívocos, o que não ocorreu em nossas análises.

Portanto, de uma maneira imediata, o triptofano aqui identificado não necessariamente seria o precursor de alcaloides com atividade biológica, pelo menos do ponto de vista da composição de um estoque constitutivo de alcaloides bioativos presentes na secreção, como nas Rhinellas brasileiras (SCIANI et al., 2013). No entanto, não se pode descartar que a pele de *D. muelleri* responda de maneira regulada a estímulos agressivos e esta relativa abundância de triptofano seja o substrato para síntese local de moléculas bioativas. Novamente, testes complementares, tipicamente do tipo desafio, no qual se inocula um agente agressor (bactéria) na pele terão que ser realizados e o perfil das secreções cutâneas monitorado a fim de se verificar se há alteração nos componentes secretados.

Apesar do pouco material analisado por RMN, é plausível observar que no espectro de RMN ^1H o extrato filtrado de *D. muelleri* (DmF-BSB) expôs um panorama geral da amostra. Esse espectro apresenta picos na região de ~3,5 ppm, o que sugere a composição de açúcar em sua maioria, conforme comentado anteriormente, já que essa é uma região que absorve hidrogênios ligados a carbonos de anel glicosídico. Os açúcares apresentam em sua estrutura um anel de 5 ou 6 carbonos. A presença de açúcares na secreção cutânea *D. muelleri* pode estar relacionada à alguma justificável função biológica: i) formação de uma camada protetora capaz de manter a hidratação e lubrificação de pele, ou ii) aumento da pressão osmótica, criando um ambiente desfavorável a proliferação de microorganismos. Esta segunda hipótese carece de testes complementares, mas

poderia ser um outro mecanismo ligado a manutenção da rigidez do tecido sem a necessidade de peptídeos ou outras moléculas antibióticas que não foram encontradas em nosso estudo.

Nas análises pertinentes a atividade biológica realizada, constatou que para ensaios antibacterianos, as frações de baixa massa obtidas de *D. muelleri* não foram capazes de inibir o crescimento das espécies de bactérias testadas. De acordo com a literatura, os componentes da secreção de anfíbios que, geralmente, detêm atividades antimicrobianas são as frações que em sua composição conservam peptídeos, conhecidos como peptídeos antimicrobianos (PAM) (PARK et al., 1996). Neste caso, em nenhuma fração testada foi identificada a presença de peptídeos, de acordo com as análises feitas por espectrometria de massas. Por outro lado, iminentes mecanismos antibióticos alternativos foram discutidos.

Já a fração 9 apresentou um resultado oposto a inibição. Houve indução de crescimento bacteriano de 79%. Nesta fração foi identificado o aminoácido triptofano, que já foi descrito como sendo um suplemento que reativa a forma latente de Chlamydia. Chlamydia é uma bactéria transmitida sexualmente e que se mantem no organismo humano de forma inativa e assintomática. Desta maneira, os antibióticos são incapazes de combater a infeção crônica causada por esta bactéria. Estudos apostam que a suplementação por triptofano é capaz de ativar metabolicamente o estado inativo para o ativo da bactéria. Desta forma os antibióticos serão capazes de combater a infecção em menor dose. Apesar de bastante elaborada, este poderia ser mais um mecanismo de controle de infecção bacteriana na pele de *D. muelleri*: o impedimento de bactérias entrarem em estado latente e se tornarem menos susceptíveis a antibióticos. Testes complementares mais elaborados terão que ser feitos para se avaliar esse cenário.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho apresentamos a caracterização bioquímica de alguns dos componentes da secreção cutânea de *D. muelleri*, para isto as seguintes etapas foram cumpridas:

- Métodos de obtenção e fracionamento da secreção foram desenvolvidos para as diferentes classes moleculares aqui apresentadas;
- O fracionamento cromatográfico garantiu o isolamento um componente de baixa massa (por RP-HPLC) e uma fração de alta massa (por GF);
- A molécula de baixa massa isolada foi identificada como sendo o triptofano. A proteína de 14000 Da isolada por GF não foi identificada, porém análises proteômicas foram capazes de propor a presença de diferentes proteínas nesta secreção cutânea;
- As metalopeptidases, cuja presença foi indicada pela proteômica, foram identificadas pelo zimograma;
- A ausência de moléculas com atividade antibióticas no fracionamento do filtrado de baixa massa molecular, pode ser compensada por uma série de mecanismos aqui propostos:
    - Pressão osmótica decorrente da presença de açúcares;
    - Presença de uma possível fosfolipase;
    - Presença de proteases;
    - Presença do triptofano agindo como:
        - Precursor de alcaloides antibióticos;
        - Ativador de bactérias latentes.

Referências

ALI, M. F.; LIPS, K. R.; KNOOP, F. C.; FRITZSCH, B.; MILLER, C.; CONLON, J. M. Antimicrobial peptides and protease inhibitors in the skin secretions of the crawfish frog, *Rana areolata*. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1601, n. 1, p. 55-63, 2002.

BACON, C. W.; PORTER, J. K.; NORRED, W. P.; LESLIE, J. F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Appl. Environ. Microb.**, v. 62, n. 11, p. 4039-43, 1996.

BARRA, D.; SIMMACO, M. Amphibian skin: A promising resource for antimicrobial peptides. **Trends Biotechnol.**, v. 13, n. 6, p. 205-209, 1995.

BELL JR., W. R. Clinical Trials with Ancrod. In: PIRKLE, H. e MARKLAND JR., F. S. (Ed.). **Hemostasis and Animal Venoms**. New York: Marcel Dekker, 1988. p.541-552.

BLOM, J. D. **A dictionary of hallucinations**. New York: Springer-Verlag, 2010.

BONASIO, R.; ZHANG, G.; YE, C.; MUTTI, N. S.; FANG, X.; QIN, N.; DONAHUE, G.; YANG, P.; LI, Q.; LI, C.; ZHANG, P.; HUANG, Z.; BERGER, S. L.; REINBERG, D.; WANG, J.; LIEBIG, J. Genomic Comparison of the Ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. **Science**, v. 329, n. 5995, p. 1068-1071, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-54, 1976.

CALDWELL, J. P. The evolution of myrmecophagy and its correlates in poison frogs (Family Dendrobatidae). **J. Zool.**, v. 240, n. 1, p. 75-101, 1996.

CANNATELLA, D. **Microhylidae. Narrow-Mouthed Frogs**. 1995. Disponível em: < http://tolweb.org/tree?group=Microhylidae&contgroup=Neobatrachia >. Acesso em: 10 jan 2015.

CAPASSO, L. 5300 years ago, the Ice Man used natural laxatives and antibiotics. **The Lancet**, v. 352, n. 9143, p. 1864, 1998.

CHEN, T.; SHAW, C. Identification and molecular cloning of novel trypsin inhibitor analogs from the dermal venom of the Oriental fire-bellied toad (*Bombina orientalis*) and the European yellow-bellied toad (*Bombina variegata*). **Peptides**, v. 24, n. 6, p. 873-880, 2003.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.

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

CONLON, J. M.; KIM, J. B. A Protease Inhibitor of the Kunitz Family from Skin Secretions of the Tomato Frog, *Dyscophus guineti* (Microhylidae). **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 279, n. 3, p. 961-964, 2000.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytother. Res.**, v. 15, n. 3, p. 183-205, 2001.

COULOMBE, P. A.; OMARY, M. B. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 14, n. 1, p. 110-122, 2002.

CSORDÁS, A.; MICHL, H. Isolation and structure of an hemolytic polypeptide from the defensive secretion of European *Bombina* species. **Monatsh. Chem.**, v. 101, n. 1, p. 182-189, 1970.

CUNHA NETO, R. S. **Análise do possível efeito de componentes da secreção cutânea de *Leptodactylus labyrinthicus* como interferentes na penetração do vírus da raiva em células de mamíferos**. 2014. 79 p. Dissertação de Mestrado. Instituto Butantan, São Paulo, 2014.

DALY, J. W. Alkaloids from frog skins: selective probes for ion channels and nicotinic receptors. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, n. 10, p. 1033-1042, 1995.

DALY, J. W.; GARRAFFO, H. M.; MYERS, C. W. The origin of frog skin alkaloids: An enigma. **Pharm. News**, v. 4, p. 9-14, 1997.

DALY, J. W.; GARRAFFO, H. M.; SPANDE, T. F. Amphibian Alkaloids. In: GEOFFREY, A. C. (Ed.). **The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology**: Academic Press, v. 43, 1993. p.185-288. ISBN 0099-9598.

DALY, J. W.; GARRAFFO, H. M.; SPANDE, T. F.; JARAMILLO, C.; STANLEY RAND, A. Dietary source for skin alkaloids of poison frogs (Dendrobatidae)? **J. Chem. Ecol.**, v. 20, n. 4, p. 943-955, 1994a.

DALY, J. W.; MYERS, C. W.; WHITTAKER, N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. **Toxicon**, v. 25, n. 10, p. 1023-1095, 1987.

DALY, J. W.; SECUNDA, S. I.; GARRAFFO, H. M.; SPANDE, T. F.; WISNIESKI, A.; COVER JR, J. F. An uptake system for dietary alkaloids in poison frogs (Dendrobatidae). **Toxicon**, v. 32, n. 6, p. 657-663, 1994b.

DALY, J. W.; SECUNDA, S. I.; GARRAFFO, H. M.; SPANDE, T. F.; WISNIESKI, A.; NISHIHIRA, C.; COVER JR, J. F. Variability in alkaloid profiles in neotropical poison frogs (Dendrobatidae): Genetic versus environmental determinants. **Toxicon**, v. 30, n. 8, p. 887-898, 1992.

DAPSON, R. W. Histochemistry of mucus in the skin of the frog, *Rana pipiens*. **Anat. Rec.**, v. 166, n. 4, p. 615-625, 1970.

DELFINO, G. Ultrastructural aspects of venom secretion in anuran cutaneous glands. In: TU, A. T. e DEKKER, M. (Ed.). **Reptile venoms and toxins. Handbook of natural toxins**. New York: Marcel Dekker Inc., 1991. p.777-802.

DONNELLY, M. A. Feeding patterns of the strawberry poison frog, *Dendrobates pumilio* (Anura: Dendrobatidae). . **Copeia**, v. 1991, n. 3, p. 723-730, 1991.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. New York: McGraw-Hill, 1986. 677p.

ERSPAMER, V. Isolation of leptodactyline (m-hydroxyphenylethyltrimethy-lammonium) from extracts of *Leptodactylus* skin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 82, n. 2, p. 431-8, 1959.

ERSPAMER, V. Comparative histochemistry as a springboard for the discovery of biogenic amines and active peptides in molluscan tissues and amphibian skin. **Basic Appl. Histochem.**, v. 25, n. 1, p. 3-14, 1981.

ERSPAMER, V. Half a century of comparative research on biogenic amines and active peptides in amphibian skin and molluscan tissues. **Comp. Biochem. Phys. C** v. 79, n. 1, p. 1-7, 1984.

FORD, L. S.; CANNATELLA, D. C. The major clades of frogs. **Herpetol. Monogr.**, v. 7, p. 94-117, 1993.

FORLANI, M. C. **Morfologia do gênero *Chiasmocleis* Méhely, 1904 (Anura, Microhylidae, Gastrophryninae) e suas implicações filogenéticas**. 2010. 138 p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 6.0 . New York: American Museum of Natural History, 2014. Disponível em: < http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html >. Acesso em: 06 nov 2014.

FUCHS, E. V.; COPPOCK, S. M.; GREEN, H.; CLEVELAND, D. W. Two distinct classes of keratin genes and their evolutionary significance. **Cell**, v. 27, n. 1, p. 75-84, 1981.

GOLDMAN, L.; SCHAFER, A. I. **Cecil Medicina**. 24 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

GOMES, A.; GIRI, B.; SAHA, A.; MISHRA, R.; DASGUPTA, S. C.; DEBNATH, A.; GOMES, A. Bioactive molecules from amphibian skin: Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. **Indian J Exp Biol**, v. 45, n. 7, p. 579-593, 2007.

GRÉGOIRE, G.; LUCAS, B.; BARAT, M.; FAYETON, J. A.; DEDONDER-LARDEUX, C.; JOUVET, C. UV photoinduced dynamics in protonated aromatic amino acid. **Eur. Phys. J. D**, v. 51, n. 1, p. 109-116, 2009.

HANDOVSKY, H. Ein Alkaloid im Gifte von *Bufo vulgaris*. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.**, v. 86, n. 1-2, p. 138-158, 1920.

HEYING, H. **"Microhylidae" (On-line), Animal Diversity Web.**, 2003. Disponível em: < http://animaldiversity.org/accounts/Microhylidae/ >. Acesso em: 09 jan 2015.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; JORDAO, A. E.; SILVA, J. R.; GREVEN, H.; RODRIGUES, M. T. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): their structure and functioning in passive defence. **Toxicon**, v. 54, n. 3, p. 197-207, 2009.

JONES, T. H.; BLUM, M. S. Arthropod alkaloids: distribution, functions, and chemistry. **Alkaloids: chemical and biological perspectives**, v. 1, p. 33-84, 1983.

KUGLER, A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Anticancer Res.**, v. 19, n. 2C, p. 1589-92, 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; RODRIGUES, M. I. S.; PRATES, M. V.; BRAND, G. D.; LACAVA, B. M.; AZEVEDO, R. B.; BOCCA, A. L.; ALBUQUERQUE, S.; BLOCH JR., C. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides**, v. 26, n. 4, p. 565-573, 2005.

LIBÉRIO, M. S.; BASTOS, I. M. D.; PIRES JÚNIOR, O. R.; FONTES, W.; SANTANA, J. M.; CASTRO, M. S. The Crude Skin Secretion of the Pepper Frog *Leptodactylus labyrinthicus* Is Rich in Metallo and Serine Peptidases. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e96893, 2014.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H. P. B.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; FERREIRA, R. N.; ALMEIDA, A. P.; SANCHEZ, E. F. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comp. Biochem. Phys. A**, v. 146, n. 4, p. 565-575, 2007.

MARIANO, D. O. C.; YAMAGUCHI, L. F.; JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; SCIANI, J. M.; KATO, M. J.; PIMENTA, D. C. *Pipa carvalhoi* skin secretion profiling: Absence of peptides and identification of kynurenic acid as the major constitutive component. **Comp. Biochem. Phys. C**, v. 167, n. 0, p. 1-6, 2015.

MOLL, R.; FRANKE, W. W.; SCHILLER, D. L.; GEIGER, B.; KREPLER, R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. **Cell**, v. 31, n. 1, p. 11-24, 1982.

MOR, A.; HANI, K.; NICOLAS, P. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 50, p. 31635-31641, 1994.

MOURA, A. C. S.; VILEGA, W.; SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de Indigofera hirsuta Linn.(Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1136-1140, 2011.

NASCIMENTO, A. C. C.; FONTES, W.; SEBBEN, A.; CASTRO, M. S. Antimicrobial Peptides from Anurans Skin Secretions. **Protein Peptide Lett.**, v. 10, n. 3, p. 227-238, 2003.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NEUWIRTH, M.; DALY, J. W.; MYERS, C. W.; TICE, L. W. Morphology of the granular secretory glands in skin of poison-dart frogs (Dendrobatidae). **Tissue Cell**, v. 11, n. 4, p. 755-771, 1979.

NOMURA, F. **Ecologia reprodutiva e comportamento de forrageio e escavação de *Dermatonotus muelleri* (Boettger, 1885) (Anura, Microhylidae)**. 2003. 95 p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

NOMURA, F.; ROSSA-FERES, D. C. The frog *Dermatonotus muelleri* (Boettger 1885) (Anura Microhylidae) shifts its search tactics in response to two different prey distributions. **Ethol. Ecol. Evol.**, v. 23, n. 4, p. 318-328, 2011.

PARK, C. B.; KIM, M. S.; KIM, S. C. A Novel Antimicrobial Peptide from *Bufo bufo gargarizans*. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 218, n. 1, p. 408-413, 1996.

PARKER, H. W. **A monograph of the frogs of the family Microhylidae**. London: British Museum, 1934.

POUGH, F. H.; ANDREWS, R. M.; CADLE, J. E.; CRUMP, M. L.; SAVITZKY, A. H.; WELLS, K. D. **Herpetology**. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 1998. 544p.

REDDY, K. V. R.; SHAHANI, S. K.; MEHERJI, P. K. Spermicidal activity of Magainins: in vitro and in vivo studies. **Contraception**, v. 53, n. 4, p. 205-210, 1996.

RINALDI, A. C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario: Commentary. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 6, n. 6, p. 799-804, 2002.

ROSEGHINI, M.; ERSPAMER, V.; ENDEAN, R. Indole-, imidazole- and phenyl-alkylamines in the skin of one hundred amphibian species from Australia and Papua New Guinea. **Comp. Biochem. Phy. C**, v. 54, n. 1, p. 31-43, 1976.

ROSEGHINI, M.; ERSPAMER, V.; ERSPAMER, G. F.; CEI, J. M. Indole-, imidazole- and phenyl-alkylamines in the skin of one hundred and forty american amphibian species other than bufonids. **Comp. Biochem. Phys. C**, v. 85, n. 1, p. 139-147, 1986.

SBH, SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA -. **Brazilian Amphibians: List of Species**. 2014. Disponível em: < http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/2014.02-07-MudancasTaxonomicas.pdf >. Acesso em: 06 nov 2014.

SCIANI, J. M.; ANGELI, C. B.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; PIMENTA, D. C. Differences and similarities among parotoid macrogland secretions in South American toads: a preliminary biochemical delineation. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 9 pages, 2013.

SEBBEN, A.; SCHWARTZ, C. A.; CRUZ, J. DOS S. A defesa química dos anfíbios. **Ciência Hoje**, v. 15, n. 87, p. 25-33, 1993.

SHEN, Y. G.; ZHANG, W. K.; HE, S. J.; ZHANG, J. S.; LIU, Q.; CHEN, S. Y. An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. **Theor. Appl. Genet.**, v. 106, n. 5, p. 923-930, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, 2010.

SPANDE, T. F.; JAIN, P.; GARRAFFO, H. M.; PANNELL, L. K.; YEH, H. J. C.; DALY, J. W.; FUKUMOTO, S.; IMAMURA, K.; TOKUYAMA, T.; TORRES, J. A.; SNELLING, R. R.; JONES, T. H. Occurrence and Significance of Decahydroquinolines from Dendrobatid Poison Frogs and a Myrmicine Ant: Use of 1H and 13C NMR in Their Conformational Analysis. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 1, p. 5-21, 1998.

STEBBINS, R. C.; COHEN, N. W. **A natural history of amphibians**. Princeton: Princeton University Press, 1995. ISBN 0691102511.

STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C. ; NYBAKKEN, J. W. **Zoologia Geral**. 6 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2003. 816p.

STROMBERG, V. L. The Isolation of Bufotenine from *Piptadenia peregrina*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 76, n. 6, p. 1707-1707, 1954.

STUART, B.; WOGAN, G.; GRISMER, L.; AULIYA, M.; INGER, R. F.; LILLEY, R. ; CHAN-ARD, T.; THY, N.; NGUYEN, T. Q.; SRINIVASULU, C.; JELIĆ, D. ***Ophiophagus hannah*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3**. 2012. Disponível em: < http://www.iucnredlist.org/details/177540/0 >. Acesso em: 15 jan 2015.

SYSTEMS, R&D. **Cyclophilin A: Products**. 2015. Disponível em: < http://www.rndsystems.com/product_results.aspx?m=3208 >. Acesso em: 15 jan 2015.

TEMPONE, A. G.; MELHEM, M. S. C.; PRADO, F. O.; MOTOIE, G.; HIRAMOTO, R. M.; ANTONIAZZI, M. M.; HADDAD, C. F. B.; JARED, C. Amphibian Secretions for Drug Discovery Studies: A Search for New Antiparasitic and Antifungal Compounds. **Lett. Drug Des. Discov.**, v. 4, n. 1, p. 67-73, 2007.

TERRENI, A.; NOSI, D.; GREVEN, H.; DELFINO, G. Development of serous cutaneous glands in *Scinax nasica* (Anura, Hylidae): patterns of poison biosynthesis and maturation in comparison with larval glands in specimens of other families. **Tissue Cell**, v. 35, n. 4, p. 274-287, 2003.

TOFT, C. A. Feeding ecology of thirteen syntopic species of anurans in a seasonal tropical environment. **Oecologia**, v. 45, n. 1, p. 131-141, 1980.

TOFT, C. A. Evolution of diet specialization in poison-dart frogs (Dendrobatidae). **Herpetologica**, v. 51, n. 2, p. 202-216, 1995.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comp. Biochem. Phys. A**, v. 111, n. 1, p. 1-29, 1995.

TSUJIMOTO, S.; ISHIDA, T.; TAKEDA, T.; ISHII, Y.; ONOMURA, Y.; TSUKIMORI, K.; TAKECHI, S.; YAMAGUCHI, T.; UCHI, H.; SUZUKI, S. O.; YAMAMOTO, M.; HIMENO, M.; FURUE, M.; YAMADA, H. Selenium-binding protein 1: Its physiological function, dependence on aryl hydrocarbon receptors, and role in wasting syndrome by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **BBA-Gen. Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3616-3624, 2013.

TURSKI, M. P.; TURSKA, M.; ZGRAJKA, W.; KUC, D.; TURSKI, W. A. Presence of kynurenic acid in food and honeybee products. **Amino Acids**, v. 36, n. 1, p. 75-80, 2009.

TURSKI, W. A.; NAKAMURA, M.; TODD, W. P.; CARPENTER, B. K.; WHETSELL JR, W. O.; SCHWARCZ, R. Identification and quantification of kynurenic acid in human brain tissue. **Brain Res.**, v. 454, n. 1–2, p. 164-169, 1988.

VESTAL, M. L. Methods of Ion Generation. **Chem. Rev.**, v. 101, n. 2, p. 361-376, 2001.

VIGERELLI, H.; SCIANI, J. M.; JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; CAPORALE, G. M. M.; SILVA, A. C. R.; PIMENTA, D. C. Bufotenine is able to block rabies virus infection in BHK-21 cells. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 20, n. 1, p. 8 pages, 2014.

VILELA, H. . **Portal Agronomia**. 2009. Disponível em: < http://www.agronomia.com.br/conteudo/artigos/artigos_gramineas_tropicais_sorghum.htm >. Acesso em: 15 jan 2015.

WANG, M.; WANG, L.; CHEN, T.; WALKER, B.; ZHOU, M.; SUI, D.; CONLON, J. M.; SHAW, C. Identification and molecular cloning of a novel amphibian Bowman Birk-type trypsin inhibitor from the skin of the Hejiang Odorous Frog; *Odorrana hejiangensis*. **Peptides**, v. 33, n. 2, p. 245-250, 2012.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.

WIELAND, H.; KONZ, W.; MITTASCH, H. Die Konstitution von Bufotenin und Bufotenidin. Über Kröten-Giftstoffe. VII. **Justus Liebigs Ann. Chem.**, v. 513, n. 1, p. 1-25, 1934.

ZAIRI, A.; BELAÏD, A.; GAHBICHE, A.; HANI, K. Spermicidal activity of dermaseptins. **Contraception**, v. 72, n. 6, p. 447-453, 2005.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, n. 15, p. 5449-5453, 1987.

ZUG, G. R.; VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. San Diego: Academic Press, 1993. ISBN 012782622X.