



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Universidade de Brasília**

**Avaliação dos peptídeos Dermaseptina B2 e Dermatoxina
isolados da pele do anuro *Phyllomedusa bicolor* na
modulação da imunidade inata**

**Autora: Camila Cristina Dourado de Souza
Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro**

**BRASÍLIA
2021**



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Universidade de Brasília**

Avaliação dos peptídeos Dermaseptina B2 e Dermatoxina isolados da pele do anuro *Phyllomedusa bicolor* na modulação da imunidade inata

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestra em Biologia Animal.

**Autora: Camila Cristina Dourado de Souza
Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro**

**BRASÍLIA
2021**



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Universidade de Brasília**

Camila Cristina Dourado de Souza

**Avaliação dos peptídeos Dermaseptina B2 e Dermatoxina
isolados da pele do anuro *Phyllomedusa bicolor* na
modulação da imunidade inata**

Comissão Examinadora:

**Profa. Dra. Mariana S. Castro
Presidente**

**Departamento de Ciências Fisiológicas/IB
Universidade de Brasília**

**Profa. Dra. Simoni Campos Dias
Membro Titular**

Universidade Católica de Brasília

**Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Membro Titular**

**Departamento de Biologia Celular/IB
Universidade de Brasília**

Dedico esta dissertação aos meus pais, Karla e Marcus por todo o apoio, incentivo aos estudos e amor que sempre tive. Aos meus avôs maternos (*in memoriam*), estariam felizes e orgulhosos pela neta. Aos meus irmãos Cristiano e Catarina, os quais sempre busquei dar as melhores referências e me dão orgulho diariamente. A todos os meus amigos, foram os melhores incentivadores, a vida seria sem graça se não existissem eles.

Agradecimentos

A Deus, sem o amor dele por mim, eu nada seria.

À Profa. Dra. Mariana de Souza Castro, por toda a disponibilidade, atenção, acolhimento, orientação e amizade desde o primeiro contato por e-mail, me sinto honrada pela oportunidade, aqui em Brasília, obrigada!

À minha família, que incentivou e torceu diariamente para que eu realizasse meu sonho, o melhor grupo de Whatsapp, que saudade!

Aos melhores amigos que eu poderia ter em Brasília: Milton, Willian, Mauro e Indira nos agarramos devido à distância e a saudade que compartilhamos pela nossa terrinha (Manaus). Foram essenciais para suprir a falta de amigos que uma nova cidade te dá, obrigada por todo o acolhimento e amizade, foram superiores a tudo que eu esperava.

À República da Geologia na SQN 411, na qual eu morei durante o último ano do mestrado: André, Sebastian, Gabriel, Igor, Júlia e Angel, vocês foram a minha família e conviver com vocês foi uma honra! Gratidão pelo acolhimento, por tantas conversas científicas na cozinha, pelas vivências acadêmicas/bolsistas e pela esperança compartilhada de ter um mundo melhor. GRATIDÃO!

Ao meu namorado, Andersen, por todo amor, incentivo e paciência dedicados ao processo.

Aos colegas de laboratório: Carlos, Brunna, Joyce, Gabriela, Isabelle, Gabriel, Gislene, Mariana, Priscila, Hylanne e Nuno pela ajuda e disponibilidade nos experimentos, na hora de tirar dúvidas, na paciência para explicar as novas técnicas e, por último, não sendo menos importante, a ótima convivência que tivemos ao longo desse período, vocês são demais, obrigada, turma!

A todos os demais membros do Laboratório de Bioquímica e Proteômica – LBQP, pela ótima convivência ao longo do mestrado.

Aos amigos da UFAM: Edson (me orientou na graduação e foi o responsável pela inspiração de fazer pós fora de Manaus) Luciana (Além de amiga, me ajudou inúmeras

vezes com a coleta das amostras) Lucas (sempre um bom amigo, sonhamos muito juntos) grata!

Aos professores Marcelo Gordo, Marcelo Menin (in memorian) pelas coletas dos exemplares e ao professor Wagner Fontes, por toda a ajuda concedida nos gráficos de atividades imunomodulatórias.

À Universidade de Brasília – UnB pela disponibilidade da infraestrutura de seus laboratórios.

À Capes pelo apoio financeiro por meio da concessão da bolsa de estudos.

"Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto."

Carl Sagan

Apoio Financeiro

A dissertação de mestrado intitulada “Avaliação dos peptídeos Dermaseptina B2 e Dermatoxina isolados da pele do anuro *Phyllomedusa bicolor* na modulação da imunidade inata” desenvolvida por Camila Cristina de Souza Dourado de Souza sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq, da FAPDF, da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

Resumo

Peptídeos antimicrobianos são multifuncionais e exibem diversas propriedades biológicas, dentre elas destacam-se as atividades antimicrobianas e imunomodulatórias. A visão convencional de que proteínas e peptídeos possuem uma estrutura diretamente relacionada a uma única função conflita com sua capacidade de se adaptar e desenvolver novas funções. A secreção cutânea de anfíbios é uma fonte rica de peptídeos biologicamente ativos e anuros do gênero *Phyllomedusa* têm chamado atenção dos cientistas por conterem em suas secreções cutâneas um verdadeiro arsenal de moléculas com propriedades antimicrobianas, antiparasitárias, antitumorais e imunomodulatórias. O presente projeto teve como objetivo geral a purificação dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina presentes na secreção cutânea do anuro *Phyllomedusa bicolor* e a avaliação de seus efeitos na imunidade inata. O fracionamento da secreção bruta de *P. bicolor* em coluna de fase reversa C₁₈ resultou, em média, em 42 frações cromatográficas, sendo que 13 destas frações exibiram atividade antimicrobiana sobre as bactérias patogênicas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Análises por espectrometria de massas e sequenciamento químico por degradação de Edman permitiram identificar os peptídeos de interesse nesse estudo (dermaseptina B2 e dermatoxina) que foram purificados e acumulados em quantidades suficientes para a realização dos ensaios imunomodulatórios sobre neutrófilos. A dermaseptina B2 promoveu aumento na capacidade fagocítica de neutrófilos, na produção e liberação de NETs e exibiu propriedades quimioatraentes sobre os neutrófilos. Já a dermatoxina também se mostrou capaz de aumentar a atividade fagocítica de neutrófilos, assim como de agir como um quimioatraente, no entanto não foi capaz de promover a liberação de NETs pelos neutrófilos nas condições experimentais empregadas. Os efeitos imunomodulatórios sobre neutrófilos promovidos pela dermaseptina B2 e pela dermatoxina avaliados no presente estudo demonstram o potencial de peptídeos antimicrobianos de anuros como agentes imunomodulatórios, ampliando seu leque de atividades biológicas e, conseqüentemente, de possíveis aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: Anuros, *Phyllomedusa bicolor*, Dermaseptina B2, Dermatoxina, Imunidade Inata, Neutrófilos.

Abstract

Antimicrobial peptides are multifunctional and exhibit several biological properties, including antimicrobial and immunomodulatory activities. The conventional view that proteins and peptides have a structure directly related to a single function conflicts with their ability to adapt and develop new functions. The cutaneous secretion of amphibians is a rich source of biologically active peptides and anurans of the *Phyllomedusa* genus have drawn the attention of scientists because they contain in their cutaneous secretions a veritable arsenal of molecules with antimicrobial, antiparasitic, antitumor and immunomodulatory properties. The present project had as a general objective the purification of dermaseptin B2 and dermatoxin peptides present in the cutaneous secretion of the frog *Phyllomedusa bicolor* and the evaluation of their effects on innate immunity. Fractionation of the crude secretion of *P. bicolor* on a C₁₈ reverse phase column resulted in an average of 42 chromatographic fractions, and 13 of these fractions exhibited antimicrobial activity on the pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Analyzes by mass spectrometry and chemical sequencing by Edman degradation allowed the identification of the peptides of interest in this study (dermaseptin B2 and dermatoxin) that were purified and accumulated in sufficient quantities to carry out immunomodulatory assays on neutrophils. Dermaseptin B2 promoted an increase in the phagocytic capacity of neutrophils, in the production and release of NETs and exhibited chemoattractant properties on neutrophils. Dermatoxin was also shown to be able to increase the phagocytic activity of neutrophils, as well as to act as a chemoattractant, however it was not able to promote the release of NETs by neutrophils under the experimental conditions used. The immunomodulatory effects on neutrophils promoted by dermaseptin B2 and dermatoxin evaluated in the present study demonstrate the potential of anuran antimicrobial peptides as immunomodulatory agents, expanding their range of biological activities and, consequently, of possible therapeutic applications.

Keywords: Anurans, *Phyllomedusa bicolor*, Dermaseptin B2, Dermatoxin, Innate Immunity, Neutrophils.

Índice Geral

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 ANFÍBIOS	18
1.2 FAMÍLIA PHYLLOMEDUSIDAE	19
1.3 O GÊNERO <i>PHYLLOMEDUSA</i> E SEUS COMPOSTOS ATIVOS	20
1.4 <i>PHYLLOMEDUSA BICOLOR</i>	21
1.5 A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E A CRISE DOS ANTIBIÓTICOS	23
1.6 SELETIVIDADE E MECANISMOS DE AÇÃO DE PAMS	24
1.7 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE <i>PHYLLOMEDUSA BICOLOR</i>	27
1.8 IMUNIDADE E ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DE PAMS	28
1.9 IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA	31
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS E METAS	36
3.1 OBJETIVOS GERAIS	36
3.2 METAS ESTABELECIDAS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 COLETA E OBTENÇÃO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE <i>P. BICOLOR</i>	37
4.2 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA SECREÇÃO BRUTA DE <i>P. BICOLOR</i> E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DERMASEPTINA B2 E DERMATOXINA	37
4.3 ENSAIOS DE VARREDURA PARA IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	38
4.4 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	39
4.5 DETERMINAÇÃO DAS ESTRUTURAS PRIMÁRIAS DOS PEPTÍDEOS DERMASEPTINA B2 E DERMATOXINA	39
4.6 DOSAGEM DOS PEPTÍDEOS	39
4.7 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE IMUNOMODULÁTORIA DOS PEPTÍDEOS DERMASEPTINA B2 E DERMATOXINA SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS	40
4.7.1 Separação de neutrófilos	40
4.7.2 Ativação de neutrófilos	40

4.7.3. <i>Fagocitose de Saccharomyces cerevisiae</i>	40
4.7.4 <i>Avaliação da produção de NET-DNA</i>	41
4.7.5 <i>Avaliação da migração de neutrófilos em tempo real (RTCA)</i>	41
4.7.6 <i>Análise estatística</i>	41
5. RESULTADOS	42
5.1 COLETA E OBTENÇÃO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE <i>P. BICOLOR</i>	42
5.2 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA SECREÇÃO BRUTA DE <i>P. BICOLOR</i>	42
5.3 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS DE VARREDURA PARA IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES ATIVAS	43
5.4 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	43
5.5 DETERMINAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PARCIAIS DE AMINOÁCIDOS DOS PEPTÍDEOS DERMASEPTINA B2 E DERMATOXINA	47
5.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE IMUNOMODULÁTORIA DOS PEPTÍDEOS DERMASEPTINA B2 E DERMATOXINA SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS	48
5.6.1 <i>Separação de neutrófilos</i>	48
5.6.2 <i>Fagocitose de Saccharomyces cerevisiae</i>	48
5.6.3 <i>Avaliação da produção de NET-DNA</i>	50
5.6.4 <i>Avaliação da migração de neutrófilos em tempo real (RTCA)</i>	52
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

Lista de Figuras

Figura 1. (A) Espécime adulto de *Phyllomedusa bicolor*. Manaus, Brasil. Fonte: acervo pessoal. (B) Espécime adulto de *P. bicolor*. Letícia, Colômbia. Fonte: Duellman et al., 2016. 22

Figura 2. (A) Perereca Kambô (*Phyllomedusa bicolor*); (B) Modo de coleta da secreção da pele de *P. bicolor*; (C) Aplicação do Kambô; (D) Marcas na pele resultantes da aplicação do Kambô. Fonte: Silva et al., 2019. 23

Figura 3. Estrutura esquemática das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (A) As paredes celulares das bactérias Gram-positivas apresentam somente uma membrana plasmática e uma espessa camada de peptídeoglicano entremeada por ácidos teicoico e lipoteicoico. (B) Já as bactérias Gram-negativas possuem membranas plasmáticas interna e externa e uma camada fina de peptídeoglicano localizada no espaço periplasmático entre as membranas interna e externa. Também existe uma camada de lipopolissacarídeos forrando a membrana externa. Fonte: Atanasova, 2010. 24

Figura 4. Interação dos PAMs catiônicos com as membranas de animais multicelulares (A) e bactérias (B). RBC: células sanguíneas vermelhas. Fonte: Kumar et al., 2018. 25

Figura 5. Representação esquemática dos mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos. Fonte: Mwangi et al., 2019. 26

Figura 6. Efeitos terapêuticos dos PAMs que podem atuar promovendo a morte direta de microrganismos patogênicos e a ativação do sistema imunológico do hospedeiro. Fonte: Kumar et al., 2018. 32

Figura 7. Entrada da trilha que leva ao local de captura dos exemplares de *P. bicolor* no campus universitário da UFAM. Fonte: Google mapas. 37

Figura 8. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea bruta de *P. bicolor* em uma coluna C₁₈ (Shimadzu VP-ODS, 150 x 4.6) em sistema HPLC com um fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 216 nm. 42

Figura 9. Espectro de massas (MALDI-TOF) da fração 34 após purificação por RP-HPLC em coluna analítica C₁₈. O componente de massa molecular protonada igual a 3180.549 Da corresponde ao peptídeo dermaseptina B2 presente na secreção de *P. bicolor*. 47

Figura 10. Espectro de massas (MALDI-TOF) da fração 42 após purificação por RP-HPLC em coluna analítica C₁₈. O componente de massa molecular protonada igual a 3191.517 Da corresponde ao peptídeo dermatoxina presente na secreção de *P. bicolor*. 47

Figura 11. Alinhamento das sequências completas dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina 48

Figura 12. Distribuição (%) de neutrófilos após o procedimento de separação celular. 48

Figura 13. Atividade fagocítica (%) dos neutrófilos. Os asteriscos indicam aumento estatisticamente significativo na atividade fagocítica em relação ao controle ($p < 0,005$). 49

Figura 14. Quantidade média de leveduras (*Sacharomyces cerevisiae*) fagocitadas por neutrófilo. Não houve diferença estatisticamente significativa no número de leveduras fagocitadas. 50

Figura 15. Evolução temporal (120 min) na liberação de NETs por neutrófilos com detecção baseada na fluorescência emitida por Sytox. Condições experimentais: células quiescentes - tampão (quiescent), células na presença de fMLP (fMLP), células na presença de dermaseptina B2 (P2), células na presença de dermatoxina

(P3), células na presença de dermaseptina B2 e fMLP (P2 + fMLP) e células na presença de dermatoxina e fMLP (P3 + fMLP). 51

Figura 16. Análise por ANOVA de 2-vias do efeito da incubação dos peptídeos dermaseptina B2 (p2) e dermatoxina (p3), bem como do fMLP sobre a produção de NETs por neutrófilos humanos. (A) Boxplot para visualização das distribuições em cada condição. (B) Gráfico de linhas representando a ausência de efeito interativo da incubação dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina sobre a produção de NETs por neutrófilos humanos. 52

Figura 17. Migração de neutrófilos em tempo real na presença de fMLP e de dermaseptina B2 (P12). Migração das células para o tampão (quiescent to buffer); migração das células para o fMLP (quiescent to fMLP); migração das células incubadas com a dermaseptina B2 para o fMLP (P12 to fMLP) e migração das células para a dermaseptina (quiescent to P12). 53

Figura 18. Migração de neutrófilos em tempo real na presença de fMLP e de dermatoxina (P13). Migração das células para o tampão (quiescent to buffer); migração das células para o fMLP (quiescent to fMLP); migração das células incubadas com a dermatoxina para o fMLP (P13 to fMLP) e migração das células para a dermatoxina (quiescent to P13). 53

Lista de Tabelas

Tabela 1. Relação dos componentes moleculares detectados nas frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da secreção cutânea de *P. bicolor*. 43

Tabela 2. Relação de peptídeos já descritos isolados da secreção cutânea de *P. bicolor*. 45

Tabela 3. Relação dos peptídeos identificados no presente trabalho com outros peptídeos já descritos para *P. bicolor*. 46

Tabela 4. Sequências parciais de aminoácidos da dermaseptina B2 e da dermatoxina obtidas por degradação de Edman. 48

Abreviações

ATCC – Coleção Americana de Culturas Típicas, do inglês *American Type Culture Collection*

Da – Dalton

HCCA – Ácido-alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, do inglês *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography-mass spectrometry*

MALDI-TOF – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – Tempo de voo, do inglês *matrix assisted laser desorption ionization – time of flight*.

nm – Nanômetro

PAM – Peptídeo antimicrobiano

p/v – Peso/volume

RPM – Rotações por minuto

RP-HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês *reversed-phase high-performance liquid chromatography*

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TFA – Ácido trifluoroacético

UFC – Unidade formadora de colônia

v/v – Volume/volume

μ g – Micrograma

μ L – Microlitro

μ m – Micrômetro

μ M – Micromolar

FMLP - N- Formylmethionine-leucyl-phenylalanine -

Percoll – Meio para separação de gradientes de baixa massa

HBSS – Tampão com Ca⁺ e Mg-

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anfíbios

Os Anuros (sapos), Caudata (salamandras) e os Gymnophiona (cecilídeos) são as únicas três ordens vivas remanescentes do grupo Amphibia (Darrel Frost, 2021). Os anfíbios são animais ectotérmicos, com pele lisa e úmida possuindo diversas glândulas (glândulas mucosas e granulosas). Possuem comportamento reprodutivo dióico, fecundação é interna (salamandras e cecílias) ou externa (sapos, rãs e pererecas) e são dependentes de água para reprodução (Dornelles et al., 2010; Jm & Exbrayat, 2018)

Atualmente mais de 8.300 espécies de anuros foram descritas em todo o mundo, distribuídas em uma ampla variedade de ambientes, exceto nos pólos. Comparado com outros continentes, a América do Sul apresenta a maior quantidade de espécies de anuros do mundo em seus biomas (Frost, 2021).

O tegumento dos anfíbios trouxe ganhos evolutivos e foi um fator importante na transição entre os ambientes aquático e terrestre. É interessante ressaltar que a pele de anfíbios funciona como uma barreira protetora para diversos agentes externos, choques mecânicos, e um importante regulador da temperatura. A pele dos anfíbios é particularmente caracterizada por seu aparato exócrino cutâneo notável, com numerosas glândulas granulosas (serosas) e mucosas (Duellman et al., 2016) As glândulas mucosas estão principalmente associadas à respiração e à proteção contra dessecação, enquanto as glândulas granulosas fornecem um arsenal de compostos químicos usados para defesa contra microrganismos oportunistas e predadores. Essas glândulas produzem secreções cuja composição de substâncias químicas pode variar de família para família ou de espécie para espécie (Clarke, 1997; Rollins-Smith et al., 2005; Toledo & Jared, 1995).

A ocorrência generalizada de glândulas granulosas nos anuros sugere uma característica primitiva. É provável que estas glândulas, antes de produzirem toxinas, estivessem envolvidas com o armazenamento e a condensação de substâncias (Lima et al., 2019). As glândulas granulosas secretam, por mecanismo holócrino, uma grande diversidade de peptídeos, aminas biogênicas, esteróides e alcalóides com um amplo espectro de atividades biológicas (Qi et al., 2018; Rollins-Smith et al., 2005; Toledo & Jared, 1995; Yacoub et al., 2020). A secreção das glândulas granulosas nos anfíbios geralmente exerce um efeito nocivo ou tóxico por meio do contato com a

mucosa da boca ou com o fluxo sanguíneo de uma grande variedade de vertebrados (Bókony et al., 2016; Santos et al., 2016; Toledo & Jared, 1995).

1.2 Família Phyllomedusidae

Os membros da família Phyllomedusidae são popularmente conhecidos como filomedusas e essa denominação é derivada do grego *phyll*, que significa folha, e do grego *Medousa*, fazendo alusão às massas de ovos gelatinosos depositados nas folhas das árvores. Foi recentemente reconhecida como uma família e apresenta como características principais íris verticalmente elíptica, cintura peitoral arciferal, oito vértebras pré-sacrais procoelosas, calcâneo e astrágalo separados, cartilagens intercalares entre as falanges terminais e penúltimas e falanges terminais em forma de garra. São animais com SVL (comprimento rostro-cloacal) variando de 45 mm em *Callimedusa atelopoides* a 119 mm em *Phyllomedusa bicolor* e complemento cromossômico $2n = 26$ (Darrel Frost, 2021; Duellman et al., 2016).

A família Phyllomedusidae apresenta atualmente 67 espécies descritas distribuídas entre o México e a Argentina. Está dividida em oito gêneros, sendo *Phyllomedusa* o que possui o maior número de representantes com 16 espécies descritas até o momento (Frost, 2021):

Phyllomedusa bahiana (Lutz, 1925)

Phyllomedusa bicolor (Boddaert, 1772);

Phyllomedusa boliviana (Boulenger, 1902)

Phyllomedusa burmeisteri (Boulenger, 1882)

Phyllomedusa camba (De la Riva, 1999)

Phyllomedusa chaparroi (Castroviejo-Fisher, Köhler, De la Riva, and Padial, 2017)

Phyllomedusa coelestis (Cope, 1874)

Phyllomedusa distincta (Lutz, 1950)

Phyllomedusa iheringii (Boulenger, 1885)

Phyllomedusa neildi (Barrio-Amorós, 2006)

Phyllomedusa sauvagii (Boulenger, 1882)

Phyllomedusa tarsius (Cope, 1868)

Phyllomedusa tetraploidea (Pombal and Haddad, 1992)

Phyllomedusa trinitatis (Mertens, 1926)

Phyllomedusa vaillantii (Boulenger, 1882)

Phyllomedusa venusta (Duellman and Trueb, 1967)

1.3 O gênero *Phyllomedusa* e seus compostos ativos

As espécies do gênero *Phyllomedusa* apresentam caracteres únicos: são sapos grandes (SVL de 130 mm em *Phyllomedusa bicolor*), dentes vomerinos presentes, membrana palpebral não reticulada e girinos com discos orais moderadamente pequenos orientados ântero ventralmente. Estão distribuídas na Bacia Amazônica, região do Chacoan no Paraguai, do leste do Brasil ao sul do Uruguai e nordeste da Argentina, região das Guianas, Trinidad e norte da Venezuela, Cordilheira Ocidental e Vale do Magdalena na Colômbia, e extremo leste do Panamá (Duellman et al., 2016).

Dentre seus representantes estão espécies que despertam atenção pela presença de substâncias biologicamente ativas em suas secreções cutâneas, empregadas na proteção contra a invasão de microrganismos patogênicos oportunistas, na defesa passiva contra ataques de animais carnívoros e ainda como feromônios (Brunetti et al., 2016).

Os peptídeos encontrados na pele da *Phyllomedusa* estão distribuídos em três grupos principais de acordo com sua atividade "primária": peptídeos antimicrobianos (PAMs); peptídeos ativos em músculos lisos e peptídeos ativos do sistema nervoso (Erspamer et al., 1981). O primeiro grupo atua como uma barreira de defesa passiva anti-infecciosa da pele, o segundo e o terceiro grupos causam a ruptura do equilíbrio da homeostase do predador. O grupo dos peptídeos antimicrobianos são os mais diversificados dentre os três grupos, incluindo sete famílias distintas (ou subfamílias) de acordo com sua similaridade estrutural e atividade biológica, sendo elas: dermaseptinas (Mor et al., 1994), dermatoxinas (Mor & Nicolas, 1994) Distinctinas (Batista et al., 1999), filoseptinas (Leite et al., 2005), filoxinas (Chen et al., 2005), plasticinas (Vanhoye et al., 2003) e *Skin Polypeptide* YY (Mor & Nicolas, 1994).

A família das dermaseptinas compreendem um grande número de peptídeos policatiônicos (ricos em resíduos de lisina) com diferentes comprimentos (28-34 resíduos) e com uma elevada propensão a formação de estrutura em α -hélice em ambientes hidrofóbicos encontrados na pele de *Phyllomedusa azurea*, *P. bicolor*, *P. burmeisteri*, *P. distinta*, *P. hypochondrialis*, *P. oreades*, *P. rohdei*, *P. sauvagii*, *P. tarsius*, *P. tomopterna* e *P. trinitatis* (Nicolas et al., 2003). As dermaseptinas e seus análogos têm atividade lítica *in vitro* contra um amplo espectro de microrganismos de vida livre como a bactéria sem parede celular *S. melliferum* (Fleury et al., 1998),

bactérias Gram-negativas e Gram-positivas como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente (Batista et al., 1999; Fleury et al., 1998; Mor & Nicolas, 1994; Strahilevitz et al., 1994)); fungos como *Aspergillus fumigatus* (Mor & Nicolas, 1994); protozoários como *Trypanosoma cruzi* (Leite et al., 2005) e vírus como HSV-1 (Belaid et al., 2002) e HIV-1 (Lorin et al., 2005)

As dermatoxinas foram identificadas nas secreções da pele de *Phyllomedusa bicolor*, *P. sauvagii* e *P. tarsius*. Em termos estruturais são altamente conservadas exibindo poucas substituições de aminoácidos (Chen et al., 2005). Em contraste com as dermaseptinas, as dermatoxinas não possuem triptofano (W) em sua composição, tendo, em vez disso um resíduo de glicina (G) na posição 3, ou um resíduo de arginina (R) precedido por AL- ou SL- e seguido por uma sequência conservada de consenso KGVG. No meio da região C-terminal existe uma sequência altamente conservada AT[G/S] VGKV[M/I]VA[S]DQFG[D]KLLQ[E]. Outra característica é a presença do dipeptídeo C-terminal -GQ na dermatoxina-B1 de *P. bicolor* (DRT-B1). Apresenta uma conformação anfipática α -helicoidal de baixa polaridade, que imita a lipofilicidade da membrana plasmática de microrganismos, é membranotrópico e antimicrobiano com mecanismo de morte celular semelhante ao exibido por dermaseptinas e filoxinas (Amiche et al., 2000; Chen et al., 2005).

O espectro de atividade antimicrobiana da dermatoxina inclui: bactérias sem parede celular e bactérias Gram-positivas e também, embora em menor grau, bactérias Gram-negativas. As bactéria sem parede celular *Acholeplasma laylawii*, *Spiroplasma melliferum*, a bactéria Gram-negativa *Sinorhizobium melilotie* as bactérias Gram-positivas *Bacillus megaterium* e *Corynebacterium glutamicum* mostraram-se suscetíveis a DRT-B1, enquanto as bactérias Gram-negativas *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* e a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* são resistentes a DRT-B1 (Amiche et al., 2000). O autor ainda argumenta que a maior resistência apresentada por bactérias Gram-negativas contra a dermatoxina pode estar relacionada à presença de uma segunda membrana em seu envelope.

1.4 *Phyllomedusa bicolor*

A espécie *Phyllomedusa bicolor* (Figura 1) ocorre na América do Sul, com ampla distribuição na Bacia Amazônica no Brasil, Colômbia, Bolívia, Peru e Venezuela;

regiões guianas da Venezuela e das Guianas, possivelmente presente na região oriental do Equador (Frost, 2021).

É de hábito noturno, vive em florestas de mata primária e secundária, podendo ser encontrada próxima a poças isoladas em áreas planas e altas (“platôs”), em margens de riachos e igarapés. A espécie, por ser arborícola, geralmente caminha lentamente sobre os galhos de árvores os quais ficam acima de 4 metros do chão (de Lima & Labate, 2007). É popularmente conhecida por “Kambô” ou “Kampô” e empregada em rituais religiosos indígenas que supostamente melhoram o sistema imune, fortalecem as habilidades dos caçadores e até aumentam a qualidade da vida sexual (Pantoja & de Fraga, 2012).

Também é chamada de sapo arborícola ou sapo macaco gigante, podendo medir até 135 mm (Lescure e Marty *et al.*, 2000). O nome do gênero é derivado do Grego “phyllo”, significando folha ou folhagem, e “medousa” significando rainha ou protetora (Caramaschi & Cruz, 2002).

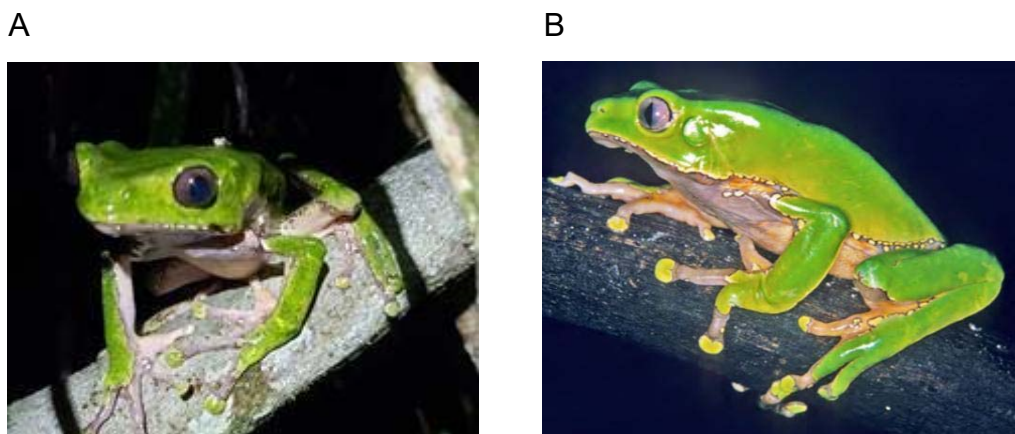


Figura 1. (A) Espécime adulto de *Phyllomedusa bicolor*. Manaus, Brasil. Fonte: acervo pessoal. (B) Espécime adulto de *P. bicolor*. Letícia, Colômbia. Fonte: Duellman et al., 2016.

Os índios da tribo Matses, que vivem no Peru, capturam indivíduos dessa espécie para serem utilizados em um ritual no qual são amarrados pelas pernas e colocados estirados sobre fogo brando. Também cospem de duas a três vezes no animal para que este se irrite e elimine a secreção (Daly et al., 1992; Gordo, M, G., 2005). Essa secreção é mantida em palitos ou pedaços de madeira nos quais ressecam e, posteriormente, são reidratados para a aplicação da “vacina do sapo” (Figura 2), como também é conhecida no Acre e em outros centros urbanos (Silva et al., 2019). Os indígenas acreditam que a secreção do Kambô pode livrá-los de

situações desagradáveis, como o azar na caça, indisposições como, por exemplo, a "preguiça" (de Lima e Labate, 2007).

Mesmo tendo sido relatados alguns casos de toxicidade devido a esses rituais, o Kambô é cada vez mais usado no Ocidente como ritual xamânico de "cura" e muitos praticantes alegam redução de dor e melhora dos sintomas derivados de muitos distúrbios. A administração do Kambô resulta em um complexo de sintomas semelhante a um choque anafilático transitório. No entanto, parece que esse complexo de sintomas não é causado por uma reação exagerada do sistema imunológico a um alérgeno, mas trata-se do efeito farmacológico de neuro peptídeos bioativos, que provavelmente atuam sinergicamente (Hesselink & Sacerdote, 2019).



Figura 2. (A) Perereca Kambô (*Phyllomedusa bicolor*); (B) Modo de coleta da secreção da pele de *P. bicolor*; (C) Aplicação do Kambô; (D) Marcas na pele resultantes da aplicação do Kambô. Fonte: Silva et al., 2019.

1.5 A resistência antimicrobiana e a crise dos antibióticos

Os antibióticos, representam uma classe de medicamentos sintetizados tanto naturalmente como quimicamente e são utilizados como uma ferramenta poderosa no combate a doenças infecciosas, desde a descoberta da penicilina de *Penicillium notatum* por Alexander Fleming em 1928. O uso generalizado e sem precedentes médicos de antibióticos impõe uma forte pressão de seleção para o surgimento de resistência (capacidade de resistir aos efeitos de antibióticos) assumindo um forte controle sobre o sistema de saúde global no que diz respeito à resistência ao regime

de medicamentos disponíveis restringindo as opções terapêuticas disponíveis para tratar doenças infecciosas (Sultan et al., 2018). Estima-se que a resistência antimicrobiana poderá causar 10 milhões de mortes por ano até 2050 (de Kraker et al., 2016).

Observa-se uma expansão, nos últimos anos, do mercado farmacêutico mundial voltado ao emprego em diagnóstico e na terapêutica de peptídeos e proteínas em formulações medicamentosas (Uhlir et al., 2014) assim, os PAMs têm sido considerados opções aos antibióticos convencionais para uso contra diversos microorganismos resistentes (Bartels et al., 2019; Giuliani et al., 2007; Moridi et al., 2020). Estima-se que mais de 2000 peptídeos antimicrobianos já foram descobertos e caracterizados e a maioria deles demonstrou exercer efeitos bactericidas proeminentes (Wang et al., 2015).

1.6 Seletividade e mecanismos de ação de PAMs

Os anfíbios desenvolveram uma estratégia próspera para ambientes poluídos e degradados pela ação do homem. A secreção oriunda da pele desses animais, além de produzir grandes quantidades de peptídeos biologicamente ativos muito semelhantes aos neuropeptídeos e hormônios de mamíferos, contém também um rico arsenal de peptídeos antimicrobianos (ou PAMs) citolíticos de amplo espectro (Hesselink & Sacerdote, 2019; Lazarus et al., 1999; Severini et al., 2002; Vanhoye et al., 2003).

Os PAMs exibem fortes interações com as membranas bacterianas devido à alta densidade de cargas eletronegativas nas superfícies das bactérias, resultantes da presença de lipopolissacarídeos na parte externa da membrana plasmática de bactérias Gram-negativas ou ácidos teicóico e lipoteicóico nas membranas bacterianas Gram-positivas (Figura 3) (Giuliani et al., 2007; Gustafsson et al., 2010).

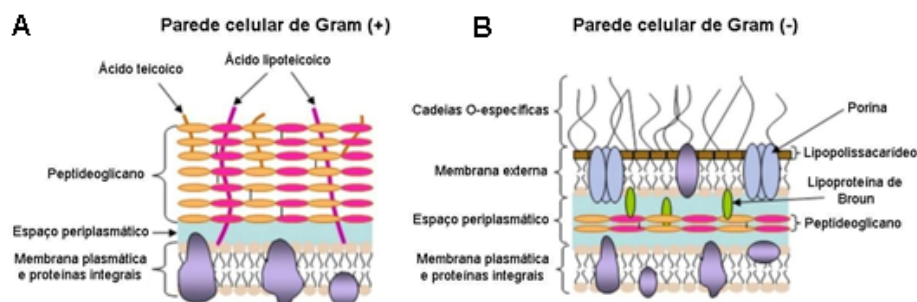


Figura 3. Estrutura esquemática das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (A) As paredes celulares das bactérias Gram-positivas apresentam somente uma membrana plasmática e uma espessa camada de peptídeoglicano entremeadada por ácidos teicóico e lipoteicóico.

(B) Já as bactérias Gram-negativas possuem membranas plasmáticas interna e externa e uma camada fina de peptidoglicano localizada no espaço periplasmático entre as membranas interna e externa. Também existe uma camada de lipopolissacarídeos forrando a membrana externa. Fonte: Atanasova, 2010.

As membranas bacterianas são organizadas de forma que as folhas mais externas da bicamada são fortemente povoadas por fosfolipídios carregados negativamente, como fosfatidilglicerol e cardiolipina (Matsuzaki, 2009). Um exemplo extremo é a membrana interna de *Staphylococcus epidermidis* que apresenta ~90% de fosfatidilglicerol em sua composição (Matsuzaki et al., 1996). Em contraste, o revestimento externo das membranas de plantas e animais é composto principalmente por fosfolipídios zwitteriônicos, como fosfatidilcolina e esfingomiélnina e outros componentes neutros como colesterol, sendo que a maioria dos lipídios com cabeças carregadas negativamente se localizam no folheto interno, voltados para o citoplasma (Zasloff, 2019).

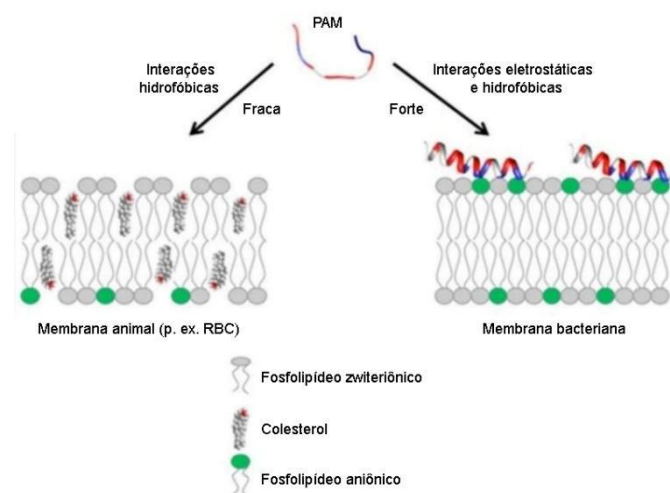


Figura 4. Interação dos PAMs catiônicos com as membranas de animais multicelulares (A) e bactérias (B). RBC: células sanguíneas vermelhas. Fonte: Kumar et al., 2018.

Baseado em dados experimentais, alguns modelos de interações entre os PAMs e as membranas de bactérias foram propostos, como o modelo denominado "carpet" (carpete) (Figura 5), segundo o qual os peptídeos são atraídos eletrostaticamente pelas cabeças aniônicas dos fosfolipídios e se orientam em paralelo ("no plano") à superfície da membrana como um carpete e, ao atingirem uma concentração crítica, inserem-se na bicamada lipídica, desestabilizando a membrana (Bechinger, 1999; Kumar & Tolia, 2019; Pouny et al., 1992).

Outro modelo proposto é o modelo "barrel-stave" (modelo barril) (Figura 5), segundo o qual os PAMs se orientam paralelamente à membrana e se inserem perpendicularmente à bicamada lipídica com um lúmen central semelhante a um

barril, resultando em poros transmembrana de formações transitórias (Brogden, 2005; Kumar & Tolia, 2019; Leite et al., 2005).

No modelo “*toroidal-pore*” (poro toroidal) (Figura 5), os peptídeos antimicrobianos se inserem na bicamada lipídica induzindo-a a se dobrar continuamente através dos poros para que o núcleo hidrofílico seja revestido por ambos os peptídeos e os grupos da cabeça lipídica (Matsuzaki *et al.*, 1996). Ao formar um poro toroidal, as faces polares dos peptídeos se associam às cabeças polares dos lipídios (Yamaguchi et al., 2002). Os lipídios envolvidos nessas interações conectam os dois folhetos da membrana, formando uma curva contínua de cima para baixo na forma de um orifício toroidal. O modelo do poro toroidal difere do modelo barril, pois os peptídeos estão sempre associados aos grupos lipídicos, mesmo quando inseridos perpendicularmente na bicamada lipídica. Os poros são parcialmente formados por peptídeos e pelas cabeças polares dos fosfolipídios (Kumar & Tolia, 2019; Lei et al., 2019)

Durante a formação dos poros transmembrana, alguns peptídeos são translocados para o interior das células e atingem alvos intracelulares, levando à morte celular como resultado da inibição dos processos de transcrição, tradução e síntese proteica. Esse modelo é conhecido como modelo de Shai-Matzuzaki-Huang (Kumar & Tolia, 2019; Zasloff, 2019).

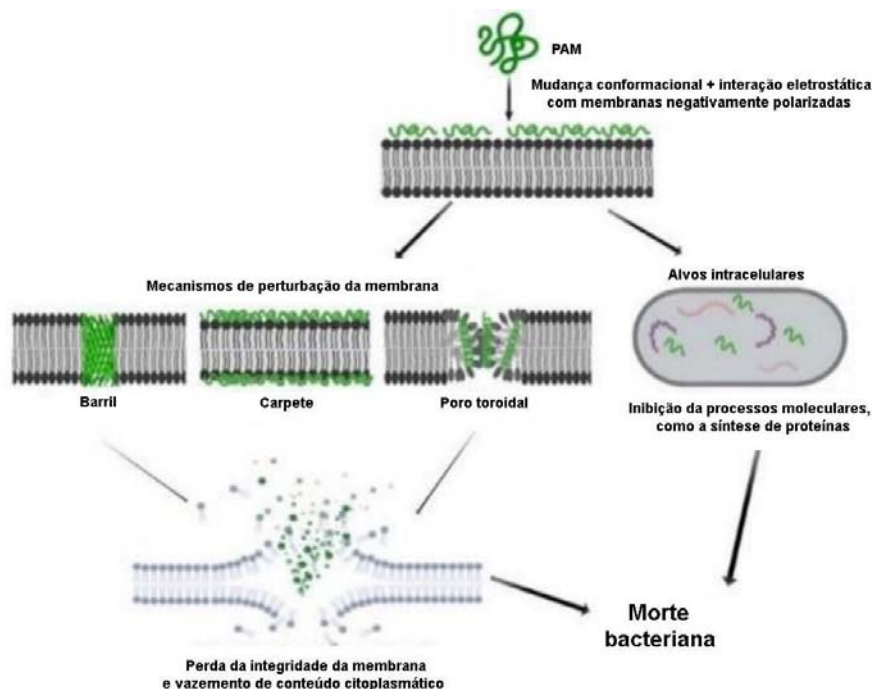


Figura 5. Representação esquemática dos mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos. Fonte: Mwangi et al., 2019.

1.7 Peptídeos antimicrobianos de *Phyllomedusa bicolor*

Em revisão publicada por Azevedo Calderon et al.(2011), diversos peptídeos antimicrobianos oriundos de anuros do gênero *Phyllomedusa* foram discutidos e a espécie *Phyllomedusa bicolor* foi bem citada quanto ao seu arsenal de peptídeos com variadas funções biológicas.

No trabalho realizado por Charpetier (1998) foi isolado, da secreção de *P. bicolor*, seis peptídeos com 24 a 33 resíduos de aminoácidos, tendo sido denominados dermaseptinas B1 a B6. Embora esses peptídeos exibem certo grau de diversidade estrutural, todos são membros da família das dermaseptinas. As dermaseptinas B3 e B4 mostraram-se efetivas inibindo o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, confirmando sua atividade antimicrobiana.

No estudo desenvolvido por Fleury et al. (1998) foi demonstrada atividade antimicrobiana para a dermaseptina B3 sintética contra várias espécies de mollicutes (classe de bactérias que se distingue pela ausência de parede celular) e contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com valores de concentração inibitória mínima variando de 6,25 a 100 µM.

Amiche et al. (2000) isolaram um outro peptídeo com 32 resíduos de aminoácidos da secreção de *P. bicolor*, denominando-o dermatoxina. Este peptídeo é bactericida. Experimentos realizados com o *S. melliferum* sugerem que a membrana plasmática é o principal alvo de ação da dermatoxina porque o peptídeo promoveu despolarização do potencial de membrana. Além disso, a ausência de alterações visíveis na morfologia de *B. megaterium* que, por ser uma bactéria Gram-positiva, é cercada por uma parede celular espessa, também é consistente com um mecanismo de morte celular baseado em alteração da permeabilidade da membrana, em vez da solubilização da membrana promovida pelas dermaseptinas B.

Um outro PAM encontrado na secreção de *P. bicolor* é a filoxina, que não é estruturalmente homóloga às dermaseptinas nem às dermorfinas/deltorfinas. Esse peptídeo exhibe similaridade com peptídeos antimicrobianos da pele da rã *Xenopus laevis*, uma espécie de anuro distante evolutivamente de *P. bicolor* e também demonstrou atividade antibacteriana (Pierre et al., 2000)

Além de PAMs, existem outros tipos de peptídeos com funções distintas como descrito, por exemplo, no trabalho desenvolvido por Richter et al. (1990), onde foram identificados, a partir de uma biblioteca de cDNAs, quatro precursores das deltorfinas

[D-Ala²] I e II e, a partir desses cDNAs, as sequências de três peptídeos opióides relacionados à dermorfina foram preditos, sendo eles, Lys⁷-dermorfina-OH; Trp⁴, Asn⁷-dermorfina-OH e um pentapeptídeo sem os resíduos 5 e 6 da Trp⁴, Asn⁷ dermorfina-OH.

As deltorfinas e a dermorfina são D-aminoácido-heptapeptídeos e são potentes agonistas de receptores para opiáceos δ e μ , respectivamente (Pierre et al., 2000). Os dois heptapeptídeos apresentaram capacidade de inibir a contração induzida por estimulação elétrica de íleo de cobraia, de maneira semelhante à observada para a dermorfina. No caso do pentapeptídeo, ele apresentou 1/10 do efeito promovido pela dermorfina (Richter et al., 1990).

Peptídeos que aumentam ou inibem a ligação de análogos da adenosina a receptores cerebrais de adenosina A1 também são encontrados na secreção cutânea de *P. bicolor*. (Daly et al., 1992) demonstraram a presença de adenoregulina, um peptídeo natural que pode conter um ou mais resíduos de D-aminoácidos (uma ocorrência que tem precedente em outros peptídeos de anfíbios), que age estimulando a ligação de agonistas a receptores de adenosina A1.

1.8 Imunidade e atividade Imunomodulatória de PAMs

A imunidade inata (também denominada imunidade natural ou nativa) fornece a primeira linha de defesa contra microrganismos. Ela consiste em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que estão em vigor mesmo antes da infecção e são preparados para responder rapidamente a infecções. Complementares à imunidade inata, existem outras respostas imunes que são estimuladas pela exposição a agentes infecciosos e aumentam em magnitude e capacidade defensiva em cada exposição subsequente a um microrganismo particular. Pelo fato de esta forma de imunidade se desenvolver como uma resposta à infecção e se adaptar à infecção, ela é chamada de imunidade adaptativa (também denominada imunidade adquirida ou específica). As características que definem a imunidade adaptativa são a habilidade de distinguir entre diferentes substâncias, chamada especificidade, e a habilidade de responder mais vigorosamente a exposições repetidas ao mesmo microrganismo, conhecida como memória (Abbas, 2012).

Os PAMs também estão envolvidos em atividades de imunomodulação, estimulação da resposta imunoprotetora, onde desempenham papel importante suprimindo a resposta inflamatória (Mansour et al., 2014). Existem semelhanças nas

organizações dos sistemas imunológicos de anfíbios e mamíferos em termos das funções da imunidade inata e adaptativa, genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ) estão presentes em ambos os genomas de anfíbios e mamíferos (Colombo et al., 2015).

Nos últimos anos, uma série de peptídeos antimicrobianos de mamíferos provaram ter, além de atividades antimicrobianas, efeitos nas células hospedeiras, como promoção de quimiotaxia e ativação de leucócitos, aumentando a angiogênese, acelerando a cicatrização de feridas e neutralizando produtos microbianos tóxicos (Zasloff, 2019). Esses efeitos de peptídeos de defesa contra células hospedeiras em mamíferos são mediados por receptores. Os receptores que medeiam os efeitos quimiotáticos de certas defensinas e da catelicidina humana LL-37 foram identificados como sendo os receptores de quimiocina CCR6 e de formil peptídeo semelhante (FPRL) 1, respectivamente. Uma indicação de que os peptídeos de defesa do hospedeiro da pele de anfíbios podem estar envolvidos no controle da resposta imune é relacionada às suas propriedades quimioatraentes (Chen et al., 2004).

Aprendemos ao longo dos anos que os anfíbios compartilham com os mamíferos o mesmo tipo de mecanismo imunológico molecular e celular, incluindo componentes dos ramos inatos e adaptativos das respostas imunológicas (O'Rourke, 2007).

Como os PAMs são produzidos por diversas células do sistema imunológico, como neutrófilos e macrófagos, eles são uma das primeiras moléculas que encontram micróbios invasores (Calis et al., 2020). Em uma infecção, é importante produzir uma resposta imune para atrair outras células imunes e também controlar a inflamação. Interessantemente, alguns PAMs podem produzir uma variedade de respostas imunes: ativação, atração e diferenciação de glóbulos brancos; estimulação da angiogênese; redução da inflamação diminuindo a expressão de quimiocinas pró-inflamatórias; e controlar a expressão de quimiocinas e de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (Haney & Hancock, 2013). A migração de leucócitos e outras células para tecidos infectados ou lesados são vitais para a defesa do hospedeiro e a resposta da cicatrização de feridas. Como primeiros respondentes em situações agudas fases de inflamação, neutrófilos rapidamente migram da corrente sanguínea para os locais de injúria. Descobertas recentes revelaram a capacidade dessas

células de moldar a resposta do sistema imunológico, desempenhando um papel importante na interface entre as imunidades inata e adaptativa (Mócsai, 2013).

Diferentes tipos de migração foram definidos de acordo com a migração ocorrendo direcionalmente ou aleatoriamente (Petrie et al., 2009). A migração direcionada ocorre em direção às concentrações crescentes de um atrator solúvel. Esta forma de movimento é conhecida como quimiotaxia, e é essencial para o tráfico de leucócitos, bem como a iniciação e a persistência da resposta imune. A migração de leucócitos também pode ser ativamente dirigida contra a fonte do gradiente, que é conhecido como fugetaxis. Esse tipo de movimento foi sugerido como um mecanismo de regulação negativa da inflamação. Migração aleatória, conhecida como quimiocinese, ocorre quando o atrator é apresentado uniformemente, e provavelmente está envolvido em vigilância imunológica (Vianello et al., 2005).

Os principais mecanismos usados pelos neutrófilos para eliminar patógenos incluem a) fagocitose, b) liberação de peptídeos antimicrobianos, c) produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio antimicrobianos, e d) produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Nothan, 2006). NETs são estruturas frágeis compostas por uma rede ramificada de filamentos de DNA decorados com proteínas do citoesqueleto e estão principalmente envolvidos na defesa do hospedeiro durante infecções bacterianas, fúngicas e infecções virais (Papayannopoulos, 2018). NETs não só contribuem para a eliminação de patógenos, mas em paralelo podem causar danos às células do espectador. Na sepse, uma doença infecciosa aguda sistêmica com alta morbidade e mortalidade, as NETs podem promover a sobrevida do paciente (Park et al., 2017).

O mecanismo clássico de eliminação de microrganismos pelos neutrófilos é a fagocitose. Após o reconhecimento por receptores de superfície dos neutrófilos, os patógenos são engolfados em fagossomos e expostos a peptídeos antimicrobianos, enzimas e espécies reativas do oxigênio (EROS), que causam a morte do microrganismo invasor. Após a fagocitose, muitos neutrófilos sofrem apoptose (Park, 2003) e são eficientemente removidos por macrófagos, assim prevenindo a liberação de proteínas neutrofílicas que podem causar danos graves no tecido (Serhan & Savill, 2005)

Alguns exemplos de peptídeos de anuros com propriedades imunomodulatórias foram descritos, como, por exemplo a frenatina 2D, isolada de secreção cutânea da espécie *Discoglossus sardus* (Alytidae), que não exibiu qualquer

atividade microbicida ou hemolítica em concentrações de até 300 μM , entretanto a uma concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, esse peptídeo aumentou a liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , mas não IL-6, por macrófagos peritoneais de camundongo do tipo BALB/c (Conlon *et al.*, 2013). Outro exemplo é a plasticina-L1, um peptídeo rico em glicina/leucina originado de pele da rã sul-americana *Leptodactylus laticeps* (Leptodactylidae) similar à frenatina 2D. Ela também não apresentou atividade antimicrobiana consistente, no entanto, a uma concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, foi capaz de promover a produção de agentes pró-inflamatórios IL-1 β , IL-12, IL-23 e TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c (Scorciapino *et al.*, 2013)

Um derivado da himenocirina-1B (previamente isolada da secreção da pele da rã *Hymenochirus boettgeri*) foi produzido por substituição de vários aminoácidos por L- ou D-lisina para aumentar a cationicidade, sem afetar a anfipaticidade, com vistas à obtenção de aumento da atividade microbicida, mas com menor atividade hemolítica. O análogo [E6k, D9k] himenocirina-1B exibiu potente atividade microbicida contra uma ampla gama de bactérias multirresistentes e mostrou-se capaz de induzir a produção de citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10, enquanto os efeitos na produção de TNF- α pró-inflamatório e IL-17 não foram significativas (Mechkarska *et al.*, 2012).

1.9 Importância terapêutica

É importante ressaltar que existem diversas opções terapêuticas para a utilização de PAMs, além dos seus empregos como possíveis agentes antimicrobianos e imunomodulatórios, eles são relacionados nas pesquisas de agentes contra diversos tipos de câncer, como por exemplo os peptídeos catiônicos α -helicoidais (α -ACPs), os quais são ricos em lisina e arginina, levando à presença de carga líquida de pelo menos +2. Esta é uma propriedade fundamental para estabelecer e manter interações entre peptídeos catiônicos e superfícies aniônicas de membranas celulares de câncer (Huang *et al.*, 2012). Além desses direcionamentos, os PAMs são estudados como agentes terapêuticos contra parasitas, vírus e fungos, o que os tornam especialmente versáteis.

Recentemente, PAMs com atividades de promoção de cicatrização de feridas estão se tornando promissores candidatos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Hancock et al., 2016; Mansour et al., 2014).

A pele é o maior órgão e sua principal função é servir como uma barreira protetora contra o ambiente externo e perda de água. A pele consiste em duas camadas de tecido: uma camada estratificada queratinizada epiderme e uma espessa camada subjacente de tecido dérmico rico em colágeno tecido conjuntivo fornecendo suporte e nutrição (Kondo & Ishida, 2010)

Além de proporcionar uma barreira estrutural, a pele contém várias células imunes que podem ser ativadas por patógenos invasores ou danos à pele. Uma das células imunes mais importantes envolvidas na cicatrização de feridas é a macrófago, que exibe diferentes funções imunológicas na pele, incluindo fagocitose e apresentação de antígenos (Werner, 2003).

As propriedades imunomoduladoras dos PAMs são promissoras e muitos desses peptídeos são agora conhecidos por estimular o sistema imunológico ao suprimir a resposta inflamatória. Consequentemente, o termo peptídeo de defesa do hospedeiro (HDP) é utilizado para essas moléculas, uma vez que abrange tanto a atividade antibacteriana direta quanto sua capacidade de imunomodulação (Figura 6).

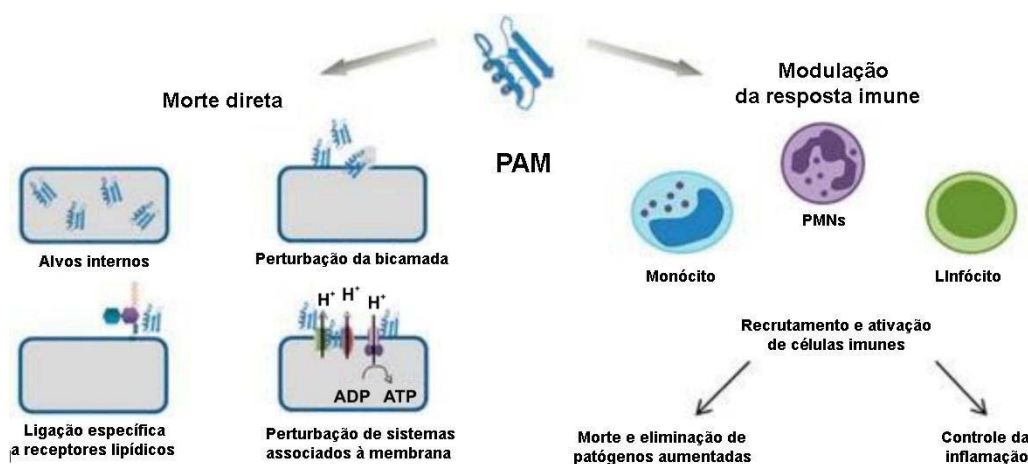


Figura 6. Efeitos terapêuticos dos PAMs que podem atuar promovendo a morte direta de microrganismos patogênicos e a ativação do sistema imunológico do hospedeiro. Fonte: Kumar et al., 2018.

A compreensão dos mecanismos complexos desses peptídeos imunomoduladores vem tornando-se atraente e representa uma nova via promissora

para expandir o seu emprego terapêutico. O mecanismo de ação desses peptídeos na promoção da cura dessas feridas, assim como os seus efeitos sobre neutrófilos, na interferência entre as células efectoras, e seus efeitos quimiotáticos sobre neutrófilos e macrófagos, precisam ser melhor investigados.

2. JUSTIFICATIVA

Os anfíbios têm se tornado objeto de estudo no que diz respeito à prospecção de peptídeos antimicrobianos (Ladram & Nicolas, 2016). Anuros do gênero *Phyllomedusa* têm chamado atenção dos cientistas por conterem em suas secreções cutâneas um verdadeiro arsenal de moléculas com propriedades antimicrobianas, antiparasitárias, anti tumorais e imunomodulatórias (Bartels et al., 2019; Lei et al., 2019).

Peptídeos antimicrobianos possuem características favoráveis quando se trata de interações com a membrana plasmática de microrganismos, conferindo a essa classe, vantagens em relação à morte celular destes, limitando a ocorrência de resistência antimicrobiana. Além da capacidade antimicrobiana, existem outras aplicações terapêuticas nas quais os PAMs podem ser empregados, como, por exemplo, na cicatrização de feridas. Há uma forte necessidade médica e social de melhorar as abordagens terapêuticas para aumentar a capacidade endógena regenerativa do tecido. A cicatrização de feridas cutâneas é um processo biológico altamente orquestrado exigindo os esforços colaborativos de muitos diferentes tipos de células e eventos celulares para alcançar a restauração do tecido. (Martin, 1997; Minutti et al., 2017)

Nos Estados Unidos, as feridas crônicas afetam cerca de 6,5 milhões de pacientes. Estima-se que um excedente de US\$ 25 bilhões é gasto anualmente no tratamento de feridas crônicas e esses valores podem crescer rapidamente devido ao aumento dos custos de saúde, envelhecimento da população e aumento acentuado na incidência de diabetes e obesidade em todo o mundo (Sen et al., 2009). O mundo está enfrentando um aumento na resistência antimicrobiana, levando a um aumento irreversível nas cepas de microrganismos, principalmente bactérias, que são resistentes. Isso se deve ao mau uso e uso excessivo de antimicrobianos em humanos. Uma atualização publicada pela OMS em 13 de janeiro de 2020 mostra que as infecções resistentes a medicamentos ainda são uma grande ameaça devido à falta de novos antibióticos, e em 2050, são esperadas 10 milhões de mortes por ano (Yacoub et al., 2020).

Embora a restauração de uma barreira epidérmica funcional é altamente eficiente em condições fisiológicas normais, a resposta de reparo é prejudicada quando a ferida da pele não se repara em tempo hábil, resultando em uma cura retardada, feridas crônicas ou cicatriz com formação anormal (Eming *et al.*, 2014),

(Greaves et al., 2013). Um fato negligenciado é que a lesão traumática foi uma das principais causas de mortalidade em muitos países (Eming *et al.*, 2014). Os pacientes com feridas crônicas frequentemente sofrem de doenças como diabetes e obesidade. Isso parece ter ofuscado a importância das feridas por serem como um grande problema de saúde. Para além do trauma, existem milhões de feridas cirúrgicas criadas no decurso de cuidados médicos de rotina todos os anos. O número de pacientes que sofrem com feridas crônicas está atingindo proporções epidêmicas e se tornará ainda mais oneroso para os sistemas de saúde (Sen et al., 2009). Dentro desse contexto, a avaliação das propriedades imunomodulatórias de PAMs de anuros têm sido um campo de estudo em expansão com vistas a se detectar agentes com potencial terapêutico relacionados ao processo de cicatrização.

O nosso grupo tem se dedicado, nos últimos anos, ao isolamento e à caracterização de peptídeos antimicrobianos de anuros encontrados nas secreções de espécies da fauna brasileira. O Brasil apresenta uma anurofauna altamente diversificada representando uma fonte de compostos de interesse farmacológico de valor inestimável. A espécie *Phyllomedusa bicolor* é um ícone da fauna Amazônica e sua secreção cutânea é riquíssima em compostos biologicamente ativos, dentre eles os peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina. Por serem componentes bastante abundantes dessa secreção e com atividades biológicas relevantes já descritas, decidimos avaliar seu potencial modulador na imunidade inata, especificamente sobre neutrófilos humanos como uma etapa inicial antes de ampliarmos a investigação empregando, por exemplo, modelos de feridas cutâneas excisionais em camundongos.

3. OBJETIVO E METAS

3.1 Objetivo geral

Purificar os peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina presentes na secreção cutânea do anuro *Phyllomedusa bicolor* e a avaliar seu potencial modulatório na imunidade inata.

3.2 Metas estabelecidas

- ✓ Coletar espécimes e obtenção da secreção bruta de *P. bicolor*;
- ✓ Fracionar secreção bruta de *P. bicolor* e purificar peptídeos empregando cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C₁₈;
- ✓ Avaliar os efeitos antimicrobianos das frações cromatográficas de interesse sobre as bactérias patogênicas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923);
- ✓ Analisar as frações ativas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF;
- ✓ Purificar os peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina;
- ✓ Avaliar os efeitos dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina na imunidade inata.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e obtenção da secreção cutânea de *Phyllomedusa bicolor*

Espécimes adultos de *P. bicolor* foram coletados em fragmentos de mata secundária, localizados no setor sul do campus universitário da Universidade Federal do Amazonas - UFAM (Figura 7), sob a licença de número 68193-1 - SISBIO. A coleta se deu no período chuvoso da cidade de Manaus (entre dezembro e janeiro), visto que o macho da espécie vocaliza um canto, para ajudar na sua reprodução, facilitando a coleta, pois são animais de hábitos noturnos. A *Phyllomedusa bicolor* por ser o maior exemplar do seu gênero, produz grande quantidade de secreção, rendendo uma boa quantidade de material com apenas 08 indivíduos machos.

A secreção cutânea foi recolhida em um recipiente estéril, após estímulo elétrico moderado, seguida de lavagem com água deionizada e, posteriormente, congelada, liofilizada e armazenada a -20°C até o momento do uso.



Figura 7. Entrada da trilha que leva ao local de captura dos exemplares de *P. bicolor* no campus universitário da UFAM. Fonte: Google maps.

4.2 Fracionamento cromatográfico da secreção bruta de *P. bicolor* e purificação dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina

Alíquotas de 10 mg da secreção cutânea bruta de liofilizada de *P. bicolor* foram dissolvidas em 1 mL de TFA 0,12% (v/v), centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos. Alíquotas de 200 μL do sobrenadante foram injetadas em coluna de fase reversa C₁₈ (Shimadzu VP-ODS, 4.6 x 150 mm), com fluxo de 1 mL/min. Inicialmente, a coluna

cromatográfica foi equilibrada com TFA 0,12% (v/v) (solvente A) durante 15 minutos. Após a aplicação da amostra foi realizada uma corrida padronizada com gradiente crescente de 0-25% de TFA 0,12% (v/v) em acetonitrila (solvente B) em 5 min., de 25-45% do solvente B em 25 min. e, finalmente, de 45-70% de solvente B em 45 minutos. A eluição das frações foi monitorada ao ultravioleta nos comprimentos de onda 216 e 280 nm. As frações eluídas foram manualmente coletadas em tubos de polipropileno e, em seguida, secas a vácuo por SpeedVac e armazenadas a -20°C.

As frações de interesse foram recromatografadas usando a mesma coluna da etapa anterior (Vydac VP-ODS 2122082) com as seguintes condições cromatográficas: a coluna foi previamente equilibrada com solvente A e a eluição foi realizada empregando-se o gradiente de 0 a 50% de solvente B em 10 minutos, de 50 a 70% de solvente B em 30 minutos, de 70 a 100% do solvente B em 35 minutos, seguida de uma lavagem a 100% por 5 minutos. As frações de interesse foram coletadas acumuladas em um único tubo do tipo Falcon (15 mL), totalizando 90 recromatografias, secas em SpeedVac SC100 (Savant) e armazenadas a -20°C até a realização dos experimentos.

4.3 Ensaios de varredura para identificação das frações com atividade antimicrobiana

As frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da secreção bruta de *P. bicolor* foram utilizadas para avaliar a capacidade de inibir o crescimento de duas bactérias patogênicas: a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922).

As bactérias foram cultivadas em 7 mL de meio Mueller-Hinton (MH), preparado segundo informações do fabricante, sob agitação a 37°C até atingirem densidade óptica (DO) em 625 nm igual a 0.08–0.1 e, em seguida, diluídas 1:10 com MH. Finalmente, a diluição 1:10 foi empregada para preparar o inóculo diluindo essa suspensão 1:20 (5×10^5 células/mL). Alíquotas secas de cada fração cromatográfica foram dissolvidas em 1 ml de água Milli Q e 50 µL de cada fração foram transferidos para os poços de fundo chato e, em seguida, adicionados 50 µL da suspensão de bactérias. Após 24 h de incubação a 37°C, a DO dos poços foi medida a 620 nm utilizando uma leitora de placas modelo Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,8% (v/v) e água Milli Q, ambos incubados com as

suspensões bacterianas. O experimento foi repetido três vezes e cada fração foi testada em triplicata.

4.4 Análise por espectrometria de massas

As frações ativas identificadas no ensaio antimicrobiano descrito no item 4.3 foram analisadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF em equipamento Autoflex II (Bruker Daltonics, Alemanha). As amostras foram ressuspensas em TFA 0,12% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v) e 1 µL de cada amostra foi aplicado em placa de aço inoxidável seguido da aplicação de 1 µL de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (20 mg/mL). A matriz foi diluída em TFA a 0,12% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v). As amostras foram analisadas no modo refletido positivo, sendo a faixa m/z analisada de 1000 a 5000. A calibração foi realizada com o padrão *Peptide Calibration Standard II*, contendo os seguintes peptídeos: Bradicinina(1-7)_{[M+H]⁺ mono} (757.399 Da), Angiotensina_I_{[M+H]⁺ mono} (1046.5418 Da), Angiotensina_II_{[M+H]⁺ mono} (1296.6848 Da), Substância_P_{[M+H]⁺ mono} (1347.7354 Da), Bombesina_{[M+H]⁺ mono} (1619.8223 Da), ACTH_clip(1-17)_{[M+H]⁺ mono} (2093.0862 Da), ACTH_clip (18-39)_{[M+H]⁺ mono} (2465.1983 Da) e Somatostatina(28)_{[M+H]⁺ mono} (3147.4710 Da).

4.5 Determinação das estruturas primárias dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina

As estruturas primárias dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina foram determinadas por degradação de Edman em sequenciador automático de peptídeos modelo PPSQ-33A (Shimadzu, Japão), de acordo com as orientações do fabricante. O equipamento foi previamente calibrado com uma mistura padrão de PTH-aminoácidos.

4.6 Dosagem dos peptídeos

Os peptídeos foram dosados em espectrofotômetro (Bel Photonics UV/Vis M51) por meio da leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm (Aitken e Learmonth, 2002). Os cálculos que permitiram obter a concentração protéica em µg/mL a partir das medidas de absorvância estão descritos abaixo:

$$\text{Concentração}_1 = \frac{\text{Abs}_{(205\text{nm})} \times 1000}{31}$$

$$\text{Concentração}_2 = 144 \times [\text{Abs}_{(215\text{nm})} - \text{Abs}_{(225\text{nm})}]$$

$$\frac{\text{Concentração}_1 + \text{Concentração}_2}{2} = \text{Concentração da alíquota analisada}$$

O volume total do estoque de cada peptídeo foi alíquotado em microtubos de 1 mL, que posteriormente foram secos a vácuo (SpeedVac SC100, Savant)

4.7 Avaliação da capacidade imunomodulatória dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina sobre neutrófilos humanos

4.7.1 Separação de neutrófilos

Amostras de sangue periférico foram coletados de três doadores saudáveis em seringa estéril e heparinizada. 12 mL de sangue foram colocados sobre gradiente de densidade utilizando Percoll (60 % e 70 %). O sangue sobre o gradiente foi centrifugado por 15 minutos a 1300 rpm, lavado 2x com HBSS 1X e as hemácias foram lisadas adicionando-se 3 mL de água Milli-Q por 25 seg seguido da adição de 3 mL de HBSS 2x. Os neutrófilos foram então avaliados quanto à viabilidade e quantidade na câmara de Neubauer e quanto à morfologia e pureza.

4.7.2. Ativação de neutrófilos

Os neutrófilos foram divididos igualmente em alíquotas para análise de cinco condições, sendo quatro delas estímulos simples (controle, fMLP 100 nM, PMA 10^{-7} M e peptídeo 16 μ M) e uma condição de estímulo duplo (peptídeo + fMLP). A concentração da suspensão de células foi ajustada com adição de HBSS com Ca^{2+} e Mg^{2+} e plasma autólogo de forma que a concentração final de células fosse 6660 células/mL. Todas as condições foram incubadas em ThermoMixer (Eppendorf AG, Alemanha) a 37 °C, 350 rpm durante 1 h. Na condição de estímulo duplo, o fMLP foi adicionado após 20 min de incubação com os peptídeos.

4.7.3. Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae*

Para avaliação da fagocitose, as células previamente ativadas foram alíquotadas de cada condição e ressuspendida na presença de *Saccharomyces cerevisiae* na proporção de 1:5 (neutrófilos: leveduras) e colocada em lâmina para incubação em câmara úmida por mais 40 minutos. Finalizada a incubação, as

lâminas foram secas e coradas utilizando o kit Panótico rápido (Reny Lab). Para análise, 100 células de cada poço foram avaliadas quanto à presença de leveduras no interior ou na membrana dos neutrófilos e quanto à quantidade de leveduras em cada fagócito. O experimento foi repetido três vezes e cada peptídeo foi testado em triplicata.

4.7.4 Avaliação da produção de NET-DNA

Neutrófilos (6600 células/mL) após incubação com os peptídeos (16 μ M) foram transferidos para poços de uma placa escura de 96 poços e marcados com Sytox Green[®] (Invitrogen S7020). A quantificação fluorimétrica de NET-DNA foi realizada em equipamento CLARIOstar[®] Multi-Mode Microplate Reader (BMG Labtech, Alemanha) a cada 15 minutos durante 120 minutos (parâmetros empregados ex:485 nm/em:535 nm). As leituras foram obtidas a 37 °C como unidades arbitrárias de fluorescência. O experimento foi repetido três vezes e cada peptídeo foi testado em triplicata.

4.7.5 Avaliação da migração de neutrófilos em tempo real (RTCA)

A placa de invasão celular e migração (cell invasion and migration, CIM) foi preparada no mínimo 1h antes da adição das células (neutrófilos) e da análise no instrumento xCELLigence RTCA-DP (Agilent). O preparo consistiu em 160 μ L do quimioatraente fMLP (N-formilmetionil-leucil-fenilalanina) para o controle positivo e 160 μ L dos peptídeos a serem testados a 16 μ M. Para os controles negativo e branco foram adicionados 160 μ L de HBSS com Ca²⁺ e Mg²⁺. A placa foi montada e então adicionados mais 25 μ L de HBSS com Ca²⁺ e Mg²⁺ no poço superior, sem que houvesse qualquer contato da ponteira com os eletrodos. Após 1 hora, foi adicionado 60 μ L de células (6600 células/ μ L) no poço superior. Posteriormente encaixada e programada no RTCA para avaliação do índice celular a cada 60 segundos pelo período total de 3 horas

4.7.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 7.03[®]. Foi realizado o teste ANOVA de 2-vias seguido de pós-teste de Tukey para comparação entre todos os valores obtidos adotando um valor de significância de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Coleta e obtenção da secreção cutânea de *P. bicolor*

Foram coletados 8 espécimes de *P. bicolor* que foram submetidos à estimulação elétrica de baixa intensidade e a secreção liberada dissolvida em água Milli Q, liofilizada e, posteriormente, pesada, obteve-se aproximadamente 50 g de conteúdo seco.

5.2 Fracionamento cromatográfico da secreção bruta de *P. bicolor*

Alíquotas de 15 mg da secreção bruta de *P. bicolor* foram fracionadas em coluna C₁₈ com fluxo de 1 ml/min, obtendo-se o perfil cromatográfico abaixo (Figura 8). Cada corrida cromatográfica resultou, em média, em 42 frações que foram coletadas manualmente.

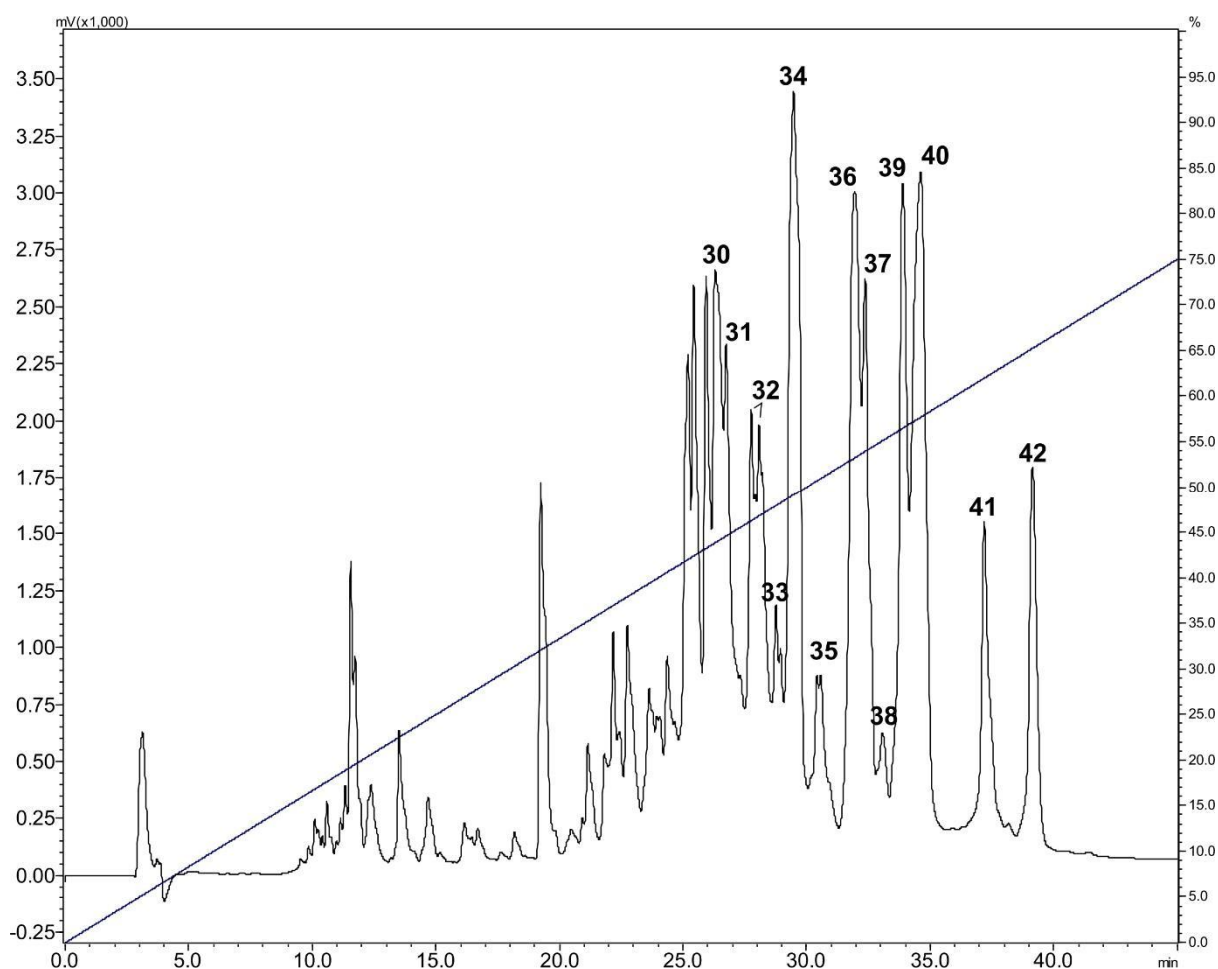


Figura 8. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea bruta de *P. bicolor* em uma coluna C₁₈ (Shimadzu VP-ODS, 150 x 4.6) em sistema HPLC com um fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 216 nm.

Todas as frações cromatográficas coletadas foram avaliadas quanto ao seu potencial antibacteriano e as frações capazes de inibir o crescimento das bactérias empregadas nos ensaios foram submetidas a análises por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF a fim de se obter as informações de massas moleculares dos componentes presentes em cada fração de modo a se avaliar seu grau de homogeneidade, bem como para comparação com os dados de massas moleculares dos peptídeos já isolados e caracterizados das secreções de espécies do gênero *Phyllomedusa*.

5.3 Ensaios antimicrobianos de varredura para identificação das frações ativas

Nos ensaios antimicrobianos, 13 frações cromatográficas mostraram-se capazes de inibir o crescimento da bactéria patogênica Gram-negativa *E. coli*. As frações identificadas como 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42 foram capazes de inibir completamente o crescimento de *E. coli* nas condições do ensaio. Ao avaliar os efeitos inibitórios das frações de *P. bicolor* sobre o patógeno Gram-positivo *S. aureus*, observou-se inibição considerável a partir da fração 21, onde as frações 21, 22, 23, 24, 29, 31, 33, 37, 41 e 42 demonstraram inibição a partir de 20%, no entanto, não atingiram 100% ficando entre 20% e 60% de inibição e as frações 34, 36, 39 e 40, demonstraram 100% de inibição nas condições empregadas neste ensaio.

5.4 Análise por espectrometria de massas

As frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da secreção bruta de *P. bicolor* foram submetidas a análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF e os componentes moleculares detectados estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1. Relação dos componentes moleculares detectados nas frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da secreção cutânea de *Phyllomedusa bicolor*.

Fração cromatográfica	Massas moleculares protonadas dos componentes presentes na secreção cutânea de <i>P. bicolor</i> (Da)
1	883,169
2	877,139; 1727,167
3	877,139; 1727,167
4	877,076; 172,195
6	877,054; 1610,131; 1727,085

7	855,269; 893,267; 1066,322; 1082,303; 1727,545
8	881,333; 1726,824
9	751,315; 881,455; 1727,152
10	1833,448; 1783,232; 1610,172; 994,234; 881,436
11	1727,045; 1610,084; 912,389; 828,322
12	1727,105; 1610,202; 1547,889; 1186,466
13	1726,998; 1146,459; 997,341; 827,446
14	2426,317; 2297,847; 2010,186; 1727,252; 1083,560; 842,616
15	1242,548;1255,598;2229,760;1223,491; 1691,756; 2336,015; 2207,873
16	1188,676; 2336,213; 1299,610; 825,612; 843,666
17	1207,507; 1026,656; 807,422; 1252,334; 944,384; 869,540; 1610,122; 1727,084
18	945,458; 2906,933;1181,020;1223,038; 916,763
19	1384,591; 3159,318; 2204,501; 1727,045; 3166,423; 1399,662; 2189,171; 2332,912;1610,073
20	2292,971;1363,822; 2285,638; 2179,678;908,545; 2303,022; 2450,829; 2317,695
21	2501,894; 1696,153; 2436,353;2109,294; 2450,398
22	1032,780;1138,708; 1646,221; 1717,260; 1809,186; 1076,551
23	2884,448;1660,158; 2727,787; 2116,362
24	3435,808; 2221,352; 3009,176; 2736,979; 2803,841; 3279,168; 1830,133; 2367,594
25	1272,673; 1545,945; 2394,714; 3281,041
26	1041,680; 1353,992; 2909,437
27	1188,025; 1339,635;1369,032;1433,095
28	1171,630; 1336,891
29	1171,601; 1579,862; 1639,783
30	1172,406; 1180,464;1557,508
31	2568,480; 3810,186
32	1556,808; 2440,634; 3094,576
33	1540,709; 1850,772; 2322,285; 2997,815; 3181,571
34	3180,549 ^a
35	3163,873; 1775,748; 2596,67; 2735,725; 3163,873
36	2999,463; 2665,211
37	2633,256; 1998,812; 2021,41; 2037,332; 2418,350
38	2020,991; 2632,917
39	2684,107;2418,806; 2722,327; 3093,875; 3128,738; 3181,151
40	2781,272; 2036,526; 3165,016
41	2418,690
42	3191,517 ^b

^aComponente de massa molecular equivalente ao peptídeo dermaseptina B2.

^bComponente de massa molecular equivalente ao peptídeo dermatoxina.

Identificada as massas moleculares dos componentes presentes nas frações cromatográficas, foi realizada uma busca em bancos de dados procurando se identificar os peptídeos já isolados da secreção cutânea de *P. bicolor* empregando-se o banco UniProt, resultando em 19 (dezenove) peptídeos descritos (Tabela 2)

Tabela 2. Relação de peptídeos já descritos isolados da secreção cutânea de *Phyllomedusa. bicolor*.

Nº	Peptídeo	Sequência (aa)	Fração	Massa (Da)
1	Dermaseptin-B2	GLWSKIKEVGEAAKAAKAAGK AALGAVSEAV	34	3179.80
2	Skin calcitonin gene-related peptide S-CGRP	SCDTSTCATQRLADFLSRSGGIGS PDFVPTDVSANSF	31	3808.73
3	[D-Ala2]-deltorphins	YAFWYPN		959.42
4	Dermaseptin-B4	ALWKDILKNVKGAAAGKAVLNTVT DMVNQ	36	2996.65
5	Phylloxin	GWMSKIASGIGTFLSGMQQ		1997.97
6	Dermatoxin	SLGSFLKGVGTTLASVGKVVSDQF GKLLQAGQ	42	3191.76
7	Dermaseptin-B3	ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAV KTLVGAE		2907.67
8	Dermaseptin-B6	ALWKDILKNAGKAALNEINQLVN Q	36	2663.48
9	Phyllomedusin	QNPNRFIGLM	30	1188.61
10	Dermaseptin DRG3	ALWKTIKAGAGKMIGSLAKNLLGS QAQPES		3109.73
11	Dermaseptin-B5	GLWNKIKEAASKAAGKAALGFVN EMV		2702.46
12	Dermaseptin DRG1	GLWSNIKTAGKEAAKAAALKAAGK AALGAVTDAV		3151.77
13	Dermaseptin DRG2	RGLWSKIKEAGKAALTAAGKAAL GAVSDAV		2909.64
14	Dermaseptin-B6	ALWKDILKNAGKAALNEINQLVN QGE		2849.54
15	Dermaseptin-B1	AMWKDVLKKGITVALHAGKAAL GAVADTISQ	35	3162.76
16	Phyllokininogen-B1	RPPGFSPFRIY		1335.71
17	Dermaseptin-like PBN2	GLVTSLIKGAGKLLGGLFGSVTGG QS	41	2416.37
18	PBN1	FLSLIPHIVSGVAALAKHLG		2042.20
19	Phylloseptin-B2	FLSLIPHIVSGVASIAKHFG		2092.18

Ao se confrontar as massas moleculares dos componentes identificados no presente trabalho com as massas moleculares dos peptídeos já descritos para essa secreção, foi possível a identificação de 8 (oito) frações com componentes de massas moleculares semelhantes a peptídeos previamente descritos para essa espécie (Tabela 3).

Tabela 3. Relação dos peptídeos identificados no presente trabalho com outros peptídeos já descrito para *Phyllomedusa. bicolor*.

Fração cromatográfica	Massa molecular experimental monoprotionada observada nesse estudo (<i>m/z</i>)	Peptídeo já descrito para <i>P. bicolor</i>	Massa molecular do peptídeo de <i>P. bicolor</i> (Da)
31	3810.186	<i>Skin calcitonin</i>	3808.73
34	3180.549	<i>Dermaseptin B2</i>	3179.80
35	3163.873	<i>Dermaseptin B1</i>	3162.76
36	2997.015 2665.211	<i>Dermaseptin B4</i> <i>Dermaseptin B6</i>	2996.65 2663.48
41	2418.690	<i>Dermaseptin-like PBN2</i>	2416.37
42	3191.517	<i>Dermatoxin</i>	3191.76

5.5 Determinação das seqüências parciais de aminoácidos dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina

Dentre esses peptídeos, as frações 34 e 42 foram submetidas a recromatografia e os espectros de massas dos componentes purificados estão apresentados nas Figuras 9 e 10, exibindo componentes com massas moleculares equivalentes às dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina, respectivamente.

A identidade desses peptídeos foi confirmada por sequenciamento químico empregando-se degradação de Edman, com apresentado na tabela 4. A Figura 11 apresenta o alinhamento das seqüências completas de aminoácidos dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina.

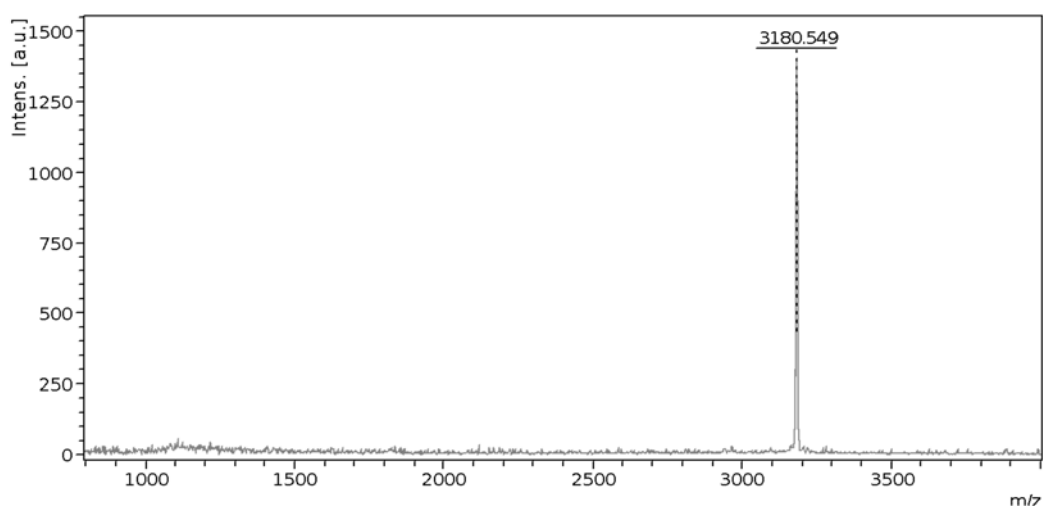


Figura 9. Espectro de massas (MALDI-TOF) da fração 34 após purificação por RP-HPLC em coluna analítica C₁₈. O componente de massa molecular protonada igual a 3180.549 Da corresponde ao peptídeo dermaseptina B2 presente na secreção de *P. bicolor*.

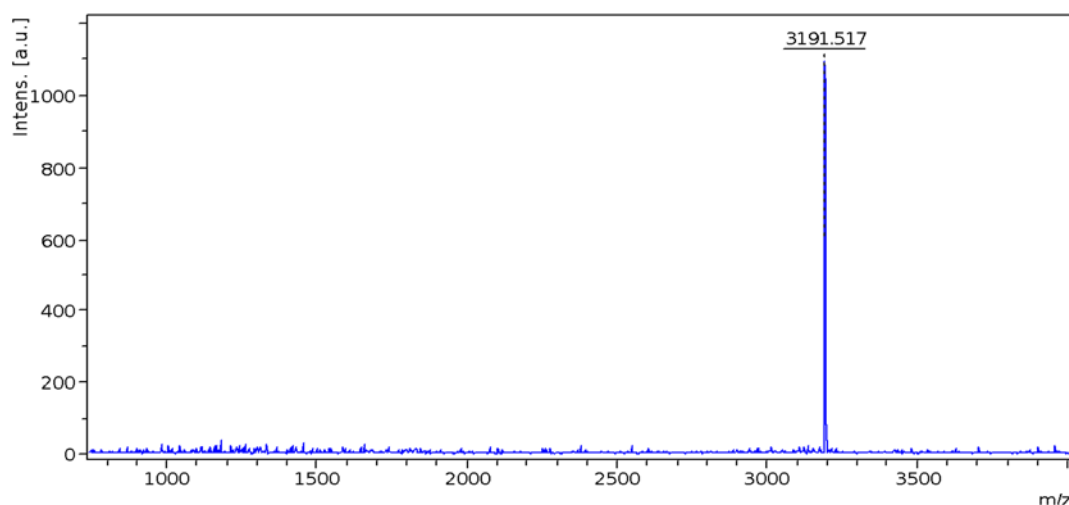


Figura 10. Espectro de massas (MALDI-TOF) da fração 42 após purificação por RP-HPLC em coluna analítica C₁₈. O componente de massa molecular protonada igual a 3191.517 Da corresponde ao peptídeo dermatoxina presente na secreção de *P. bicolor*.

Tabela 4. Sequências parciais de aminoácidos da dermaseptina B2 e da dermatoxina obtidas por degradação de Edman.

Fração cromatográfica	Sequência parcial de aminoácidos
34 Dermaseptina B2	GLWSKIKEVG
42 Dermatoxina	SLGSFLKGVG

```

Dermaseptina B2   1  -----GLWSKIKEVGKEAAKAAK--AAGKAALGAVSEAV   33
                   | : : : | | | : | | :
Dermatoxina      1  SLGSFLKGVGTTLASVGKVVSDQFGKLLQAGQ-----   32
  
```

Figura 11. Alinhamento das sequências completas dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina.

5.6 Avaliação da capacidade imunomodulatória dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina sobre neutrófilos humanos

5.6.1 Separação de neutrófilos

O percentual de pureza obtido para os neutrófilos foi de 97,2% (Figura 12), garantindo o adequado nível de pureza para a execução dos experimentos previstos.

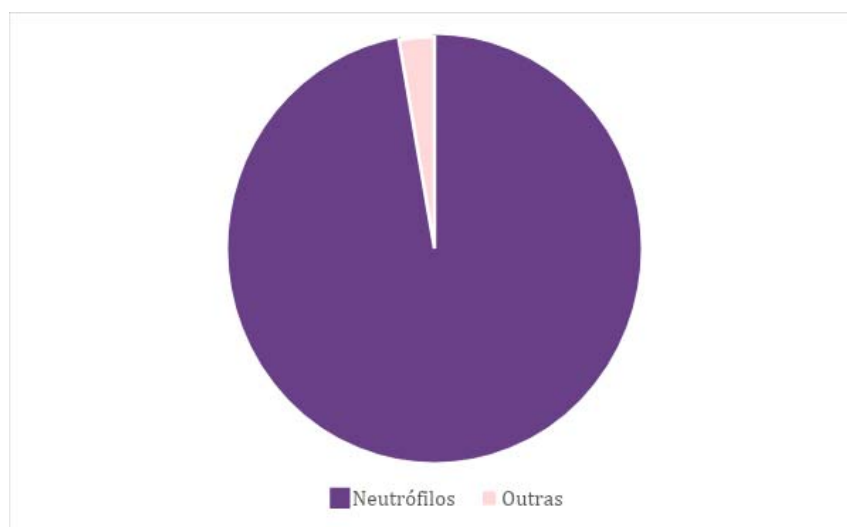


Figura 12. Distribuição (%) de neutrófilos após o procedimento de separação celular.

5.6.2 Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae*

Os resultados obtidos neste ensaio foram avaliados pela porcentagem de neutrófilos fagocitando a levedura utilizada no experimento, *Saccharomyces*

cerevisiae, conforme Figura 13, e pela quantidade de leveduras observadas no interior dos neutrófilos, conforme Figura 14.

Observa-se que os peptídeos estudados, dermaseptina B2 e dermatoxina, apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo utilizado (tampão), observando aumento na porcentagem de neutrófilos fagocitando leveduras. Entretanto, não houve diferença significativa quanto ao número de leveduras fagocitadas por neutrófilo.

A dermaseptina B2 parece interferir com a estimulação da atividade fagocítica induzida pelo fMLP, aumentando-a, enquanto a combinação fMLP e dermatoxina parece promover inibição dessa atividade.

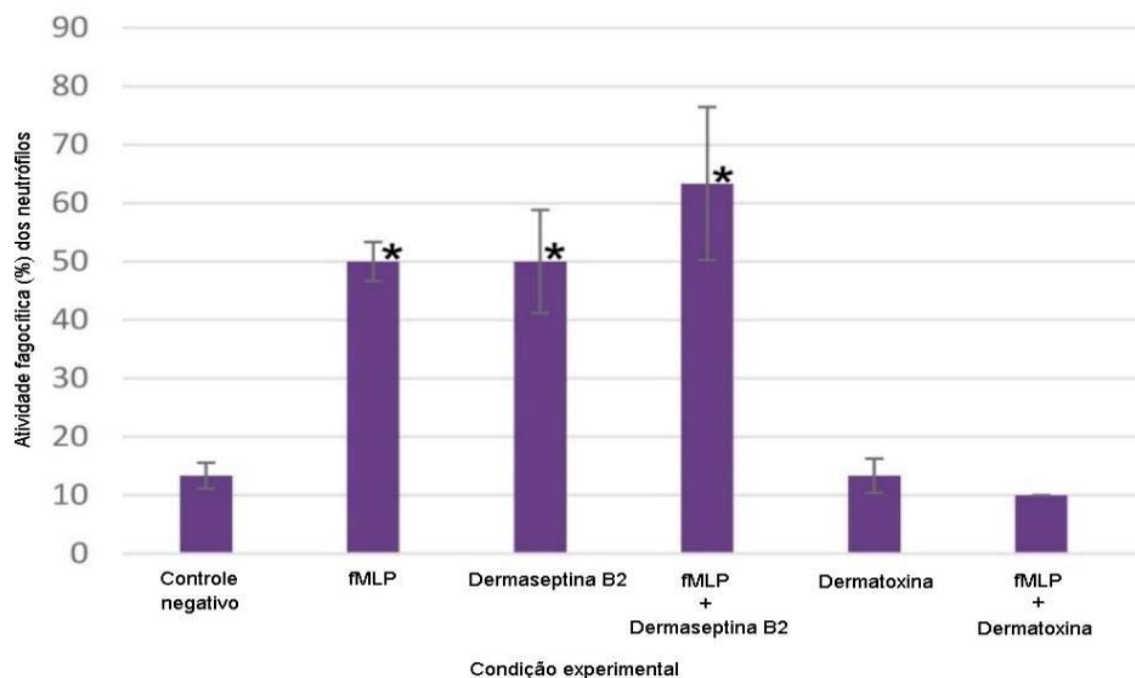


Figura 13. Atividade fagocítica (%) dos neutrófilos. Os asteriscos indicam aumento estatisticamente significativo na atividade fagocítica em relação ao controle ($p < 0,005$).

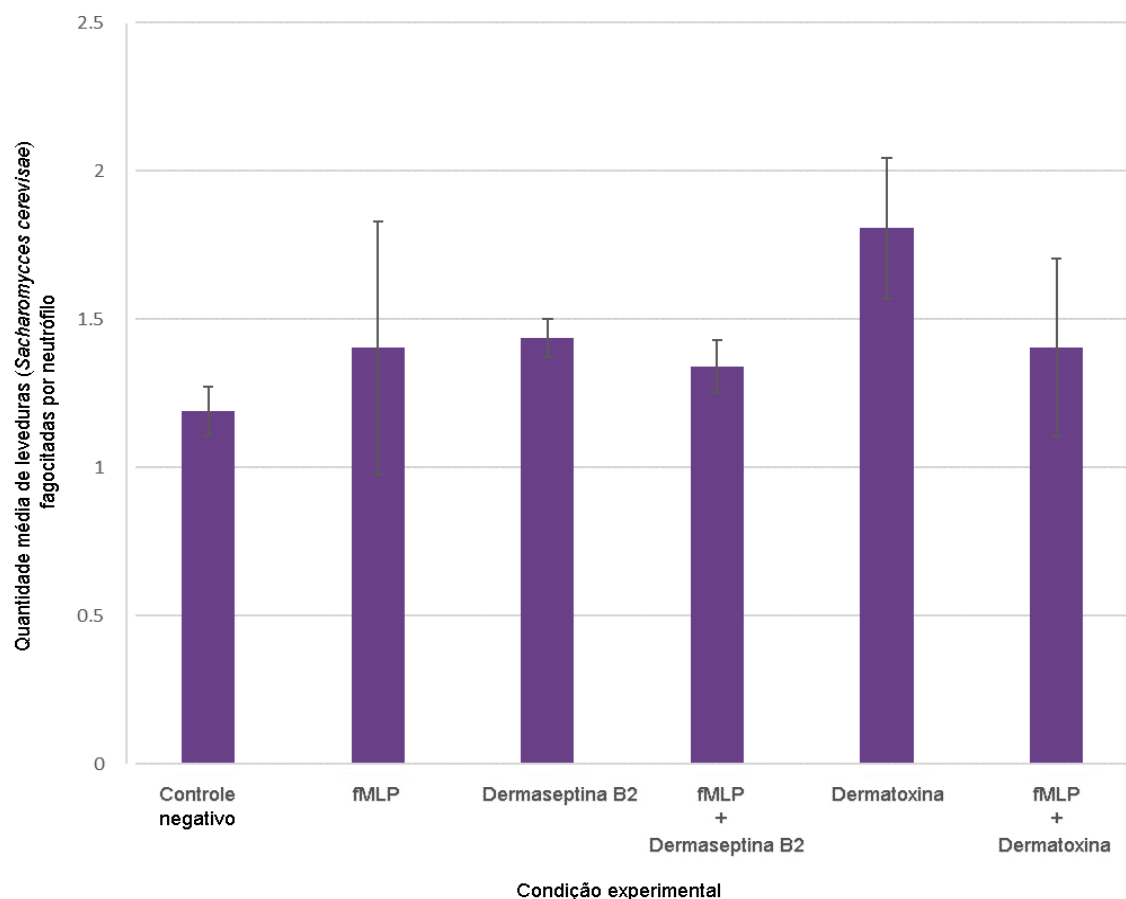


Figura 14. Quantidade média de leveduras (*Sacharomyces cerevisae*) fagocitadas por neutrófilo. Não houve diferença estatisticamente significativa no número de leveduras fagocitadas.

5.6.3 Avaliação da produção de NET-DNA

A análise dos resultados dos experimentos de produção de NET pelos neutrófilos permitem concluir que a dermaseptina B2 é capaz de promover liberação de NETs pelos neutrófilos, enquanto que a dermatoxina exibiu baixa capacidade de induzir a liberação de NETs com um perfil semelhante ao exibido pelo fMLP (Figura 15).

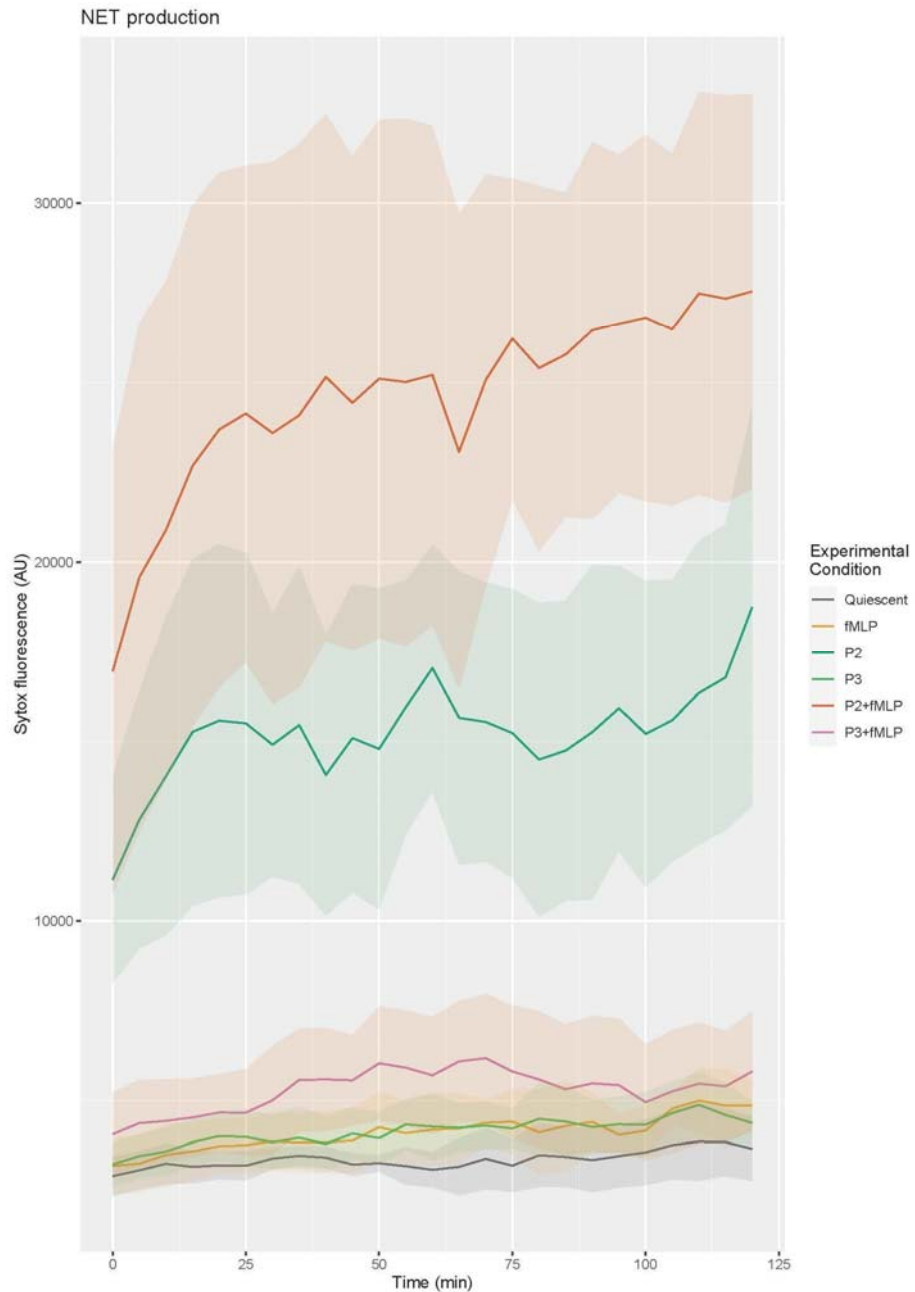
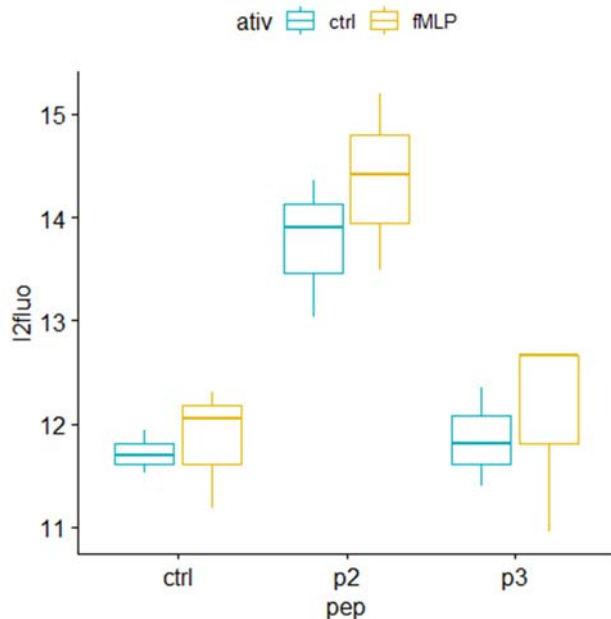


Figura 15. Evolução temporal (120 min) na liberação de NETs por neutrófilos com detecção baseada na fluorescência emitida por Sytox. Condições experimentais: células quiescentes - tampão (quiescent), células na presença de fMLP (fMLP), células na presença de dermaseptina B2 (P2), células na presença de dermatoxina (P3), células na presença de dermaseptina B2 e fMLP (P2 + fMLP) e células na presença de dermatoxina e fMLP (P3 + fMLP).

De modo a se avaliar se as tendências exibidas pelas curvas são estatisticamente significativas, foi realizada análise por ANOVA de 2-vias e teste de Tukey no tempo de 30 min, podendo-se constatar que dentre os peptídeos estudados, a dermaseptina B2 (P2) promoveu aumento significativo na liberação de NET em comparação ao controle e também ao peptídeo dermatoxina, conforme Figuras 16 A e B.

A



B

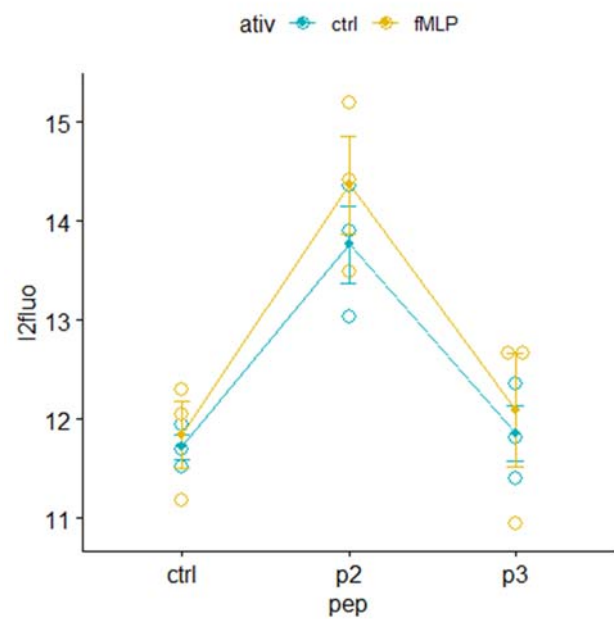


Figura 16. Análise por ANOVA de 2-vias do efeito da incubação dos peptídeos dermaseptina B2 (p2) e dermatoxina (p3), bem como do fMLP sobre a produção de NETs por neutrófilos humanos. O efeito dos peptídeos moduladores p2 e p3 foi tratado como um fator e do fMLP como outro fator. Ambos apresentam os respectivos controles de incubação com tampão. (A) Boxplot para visualização das distribuições em cada condição, em que se observa não haver influência significativa do fator fMLP comparado ao seu controle, porém observa-se aumento significativo da produção de NETs em resposta a p2, comparado tanto ao controle quanto a p3 ($p < 0,001$). (B) Gráfico de linhas representando a ausência de efeito interativo da incubação dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina sobre a produção de NETs por neutrófilos humanos. Nota-se que ambas as linhas seguem tendências similares, o que ilustra a ausência de interação mostrada no teste ANOVA de 2-vias.

5.6.4 Avaliação da migração de neutrófilos em tempo real (RTCA)

Os peptídeos testados exibiram capacidade quimioatraente relevante em relação aos controles utilizados. Observamos nesse estudo que a dermaseptina B2 (p12) na primeira hora de análise revelou um potencial quimioatraente superior ao controle positivo (fMLP 100 nM), sendo que após 1 hora essa capacidade quimioatraente decaiu, enquanto que a queda na curva do controle positivo passou a cair mais lentamente. Também foi possível observar que a incubação das células na presença da dermaseptina B2 interferiu com a capacidade quimioatraente do fMLP 100 nM, reduzindo-a drasticamente (Figura 17).

A capacidade quimioatraente da dermatoxina também foi constatada, mas com um efeito mais discreto e persistente, sendo também capaz de inibir a migração dos neutrófilos para o quimioatrente fMLP (Figura 18).

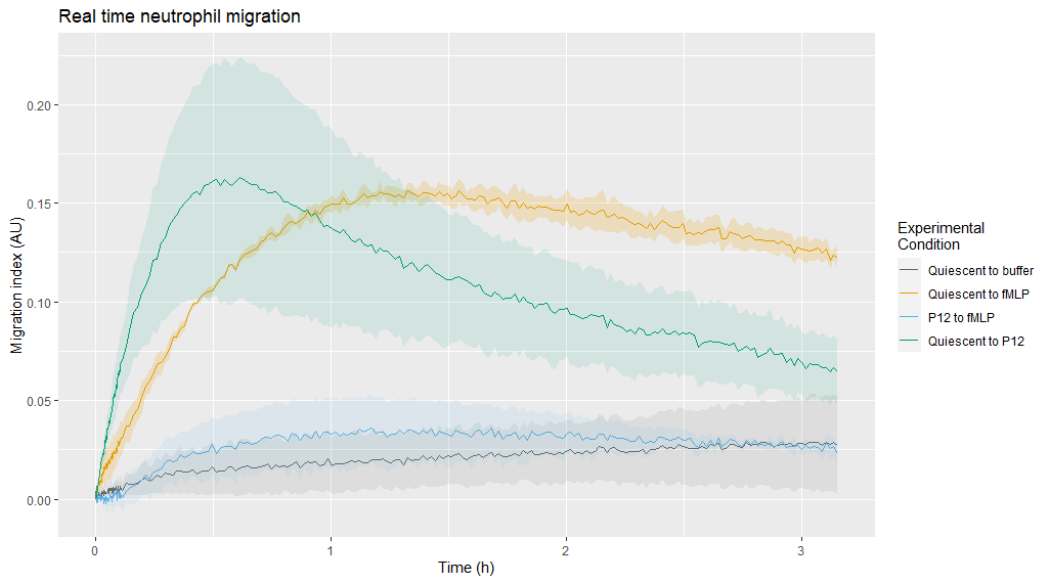


Figura 17. Migração de neutrófilos em tempo real na presença de fMLP e de dermaseptina B2 (P12). Migração das células para o tampão (quiescent to buffer); migração das células para o fMLP (quiescent to fMLP); migração das células incubadas com a dermaseptina B2 para o fMLP (P12 to fMLP) e migração das células para a dermaseptina (quiescent to P12).

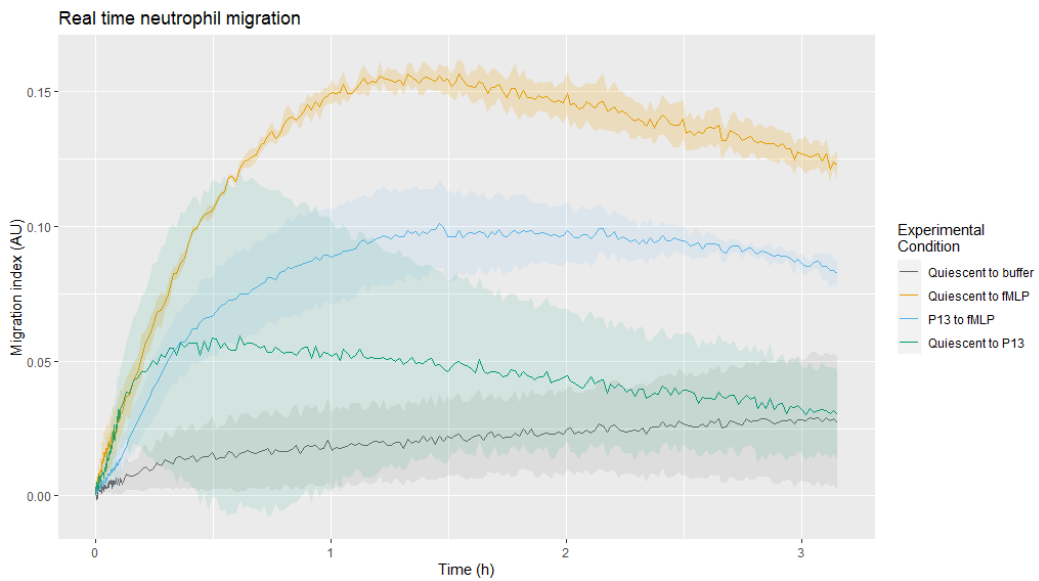


Figura 18. Migração de neutrófilos em tempo real na presença de fMLP e de dermatoxina (P13). Migração das células para o tampão (quiescent to buffer); migração das células para o fMLP (quiescent to fMLP); migração das células incubadas com a dermatoxina para o fMLP (P13 to fMLP) e migração das células para a dermatoxina (quiescent to P13).

6. DISCUSSÃO

A secreção da espécie *Phyllomedusa bicolor* foi estudada primeiramente no início dos anos 60 pelo grupo de pesquisadores liderados pelo professor Vittorio Erspamer. Por meio desses estudos, constatou-se que a sua pele era uma rica fonte de peptídeos bioativos, despertando assim o interesse da comunidade científica.

O método empregado no fracionamento da secreção cutânea bruta de *P. bicolor* foi adequado ao comparar o perfil cromatográfico obtido com os gerados em outros estudos, como o estudo realizado por (de Moraes et al., 2018).

No presente trabalho foram identificadas 8 (oito) frações cromatográficas com atividade antimicrobiana com componentes de massas moleculares equivalentes a peptídeos previamente descritos para essa espécie sendo eles os peptídeos phyllomedusina, skin calcitonina, dermaseptina B2, dermaseptina B1, dermaseptina B4, dermaseptina B6, dermaseptina-like PBN2 e dermatoxina.

Além desses peptídeos já descritos, novos componentes com atividade antimicrobiana foram observados em diversas frações cromatográficas (32, 33, 37, 38, 39, 40) demonstrando a grande diversidade de peptídeos antimicrobianos presentes nessa secreção e que merecem uma investigação mais aprofundada.

Observou-se que, a maioria das frações antimicrobianas, foram capazes de inibir o crescimento das duas bactérias empregadas corroborando os estudos realizados por (Charpentier et al., 1998) com as dermaseptinas, Amiche *et al.* (2000) com a dermatoxina, Mor *et al.* (1994) com a dermaseptina B2 e com a filoxina, todos trabalhos nos quais foram relatadas as propriedades antibacterianas dos peptídeos isolados da secreção de *P. bicolor*.

A inibição do crescimento bacteriano se dá aos mecanismos que promovem uma ruptura da membrana plasmática de bactérias gram-positivas e gram-negativas quando um alto conteúdo de lipídios aniônicos em membranas procarióticas e uma ligação preferencial de peptídeos catiônicos a membranas bacterianas através de interações eletrostáticas de longo alcance.

O modelo unificador Shai-Matzusaki-Huang propõe: (i) que o peptídeo catiônico se liga, paralelamente ao plano da membrana, para os grupos de cabeça de fosfolipídica e cobrem a membrana com os aminoácidos apolares penetrando parcialmente no núcleo de hidrocarboneto de bicamada e os resíduos catiônicos

interagindo negativamente com o porções de fosfato carregadas dos grupos principais de lipídios, (ii) formação subsequente de uma hélice peptídica anfipática; (iii) rotação dos peptídeos helicoidais levando à reorientação dos resíduos hidrofóbicos em direção ao núcleo hidrofóbico da membrana; (iv) para liberar a tensão, uma fração de os peptídeos mudam sua orientação de paralelo para transversal, formando fosfolípido-peptídeo misto transitório poros toroidais. (v) uma vez que um acúmulo de limite de peptídeo ligado à membrana é atingido, o que pode levar a ruptura / solubilização da membrana de uma maneira semelhante a um detergente. Estes resultados vêm a somar com um número crescente de trabalhos que têm abordado as secreções cutâneas de anuros como fontes de substâncias com potencial anti-infeccioso.

A maior parte desses componentes eluíram com altas concentrações de acetonitrila (acima de 40%) e estudos demonstram que um maior tempo de retenção em RP-HPLC está associado a uma maior hidrofobicidade e, geralmente, uma carga líquida positiva menor, resultando em um aumento da atividade hemolítica e uma redução da atividade antimicrobiana dessas moléculas (Conlon et al., 2013; Kim et al., 2004). A alta hidrofobicidade é resultado da presença de aminoácidos apolares como leucina (L), isoleucina (I), valina (V), metionina (M) e prolina (P) e a carga líquida positiva está associada ao número de aminoácidos carregados positivamente, como lisina (K) e arginina (R). Ao analisar as sequências dos peptídeos escolhidos para os testes imunomodulatórios é possível observar que são compostos por um percentual elevado de aminoácidos hidrofóbicos, justificando os tempos de retenção observados durante a corrida cromatográfica, essa alta hidrofobicidade pode ser uma desvantagem para as aplicações terapêuticas, no entanto, pode – se sugerir uma nanoencapsulação para a administração dessas moléculas em formulações futuras.

Os dois peptídeos podem estar ligados a efeitos imunomodulatórios sobre neutrófilos humanos, devido a capacidade fagocitária, observou-se que os peptídeos estudados, dermaseptina B2 e dermatoxina, induziram aumento significativo na atividade dos neutrófilos, sugerindo que eles induzem nesta concentração testada a ativação por parte dos neutrófilos, em contrapartida há na literatura um peptídeo que testado em menor concentração, o peptídeo figainina 2 isolada da *Boana raniceps*, na concentração de 8 μ M, não promove mudança significativa na atividade fagocítica das células (ao contrário do efeito causado pelo ativador fMLP), sugerindo que a atividade imunomoduladora específica que desencadeia vias intracelulares

provavelmente independentes da família de receptores formil de peptídeos (Santana et al., 2020). Espécie esta que é da mesma família, a família Hylidae, observa-se que há diferença nas concentrações utilizadas, devido a este motivo, sugere-se que a não promoção possa ter a ver também com a concentração.

No experimento de fagocitose, para nenhum dos peptídeos não foi observado uma diferença estatisticamente significativa quanto à quantidade de leveduras por célula.

No ano de 2004, foi descrito por Brinkmann e colaboradores uma terceira função efetiva de neutrófilos contra microrganismos. Esta nova estratégia se refere à capacidade dos neutrófilos de lançarem redes extracelulares compostas por proteínas derivadas do citoplasma celular e, surpreendentemente, por DNA. O mecanismo de extrusão destas redes foi denominado NETose e, as redes em si, NETs (*neutrophil extracellular traps*). As NETs são estruturas complexas, compostas por milhares de filamentos de aproximadamente 15 nm de diâmetro que se entrelaçam formando redes extracelulares (Brinkmann et al., 2004). NETs são estruturas de DNA e proteínas liberadas por neutrófilos em locais inflamatórios e suas principais funções são capturar e matar patógenos (Döring et al., 2020).

A avaliação da produção de NETs neste trabalho demonstrou que dentre os peptídeos estudados, a dermaseptina B2, após a avaliação do teste de significância estatística no tempo 30 minutos, promoveu aumento estatisticamente significativo, indicando que as propriedades antimicrobianas da dermaseptina B2 podem também envolver a eliminação do patógeno ao hospedeiro por meio da liberação de NETs.

Os neutrófilos constituem cerca de 50 a 70% do total de leucócitos circulantes na corrente sanguínea e são recrutados para o sítio de infecção por sinais quimiotáticos. Inicialmente, por meio de interações transitórias entre moléculas de adesão da família das selectinas (presentes em células endoteliais e neutrófilos), ocorre o rolamento pela parede do vaso sanguíneo adjacente ao sítio de inflamação. Após firme adesão, os neutrófilos realizam a diapedese, processo pelo qual migram entre as células endoteliais para alcançar o sítio de infecção extravascular em que ocorreu a resposta. Como primeiros respondentes em situações de inflamação aguda, os neutrófilos migram da corrente sanguínea para os locais de inflamação. Descobertas recentes revelaram a capacidade dessas células de moldar a resposta

do sistema imunológico, desempenhando um papel importante na interface entre a imunidade inata e adaptativa (Cano et al., 2016).

Alguns estudos avaliando as propriedades quimioatraentes têm sido descritos para peptídeos antimicrobianos de anfíbios. Todos eles se relacionam com peptídeos anfipáticos formadores de α -hélices, como Drs S1 (Ammar et al., 1998) e temporina A e seus análogos (Radzishovsky et al., 2005). Drs S1 e temporina A mostraram ser quimiotáticos a 10 e 250 μ M.

A dermaseptina B2 exibiu uma intensa atividade quimioatraente na primeira hora de incubação com os neutrófilos em relação ao ativador fMLP. Já a dermatoxina também se mostrou quimioatraente, mas com um perfil de atração distinto, mais discreto e persistente. Outro efeito interessante foi a capacidade dos dois peptídeos (dermaseptina B2 e dermatoxina) em interferir com a capacidade quimioatraente do fMLP.

Os nossos resultados com a dermaseptina B2 se assemelham com os resultados obtidos no trabalho desenvolvido por (Auvynet et al., 2008), onde a dermaseptina DRS-S9 demonstra atividade quimiotática. No trabalho realizado pelo mesmo autor, a Dermaseptin DA4 (DRS-DA4) de um sapo mexicano a *Paquimedusa dacnicolor*, onde demonstrou atividade quimiotática e bactericida, sugerindo que o efeito quimiotático foi mediado pelo receptor acoplado à proteína G de baixa afinidade para FPRL-1, recentemente relatado para interagir com muitos diferentes ligantes, como fMLP, os peptídeos antimicrobianos α -helicoidais LL-37 e temporina A, e os peptídeos amiloidogênicos Ab1-42 e DRS-S9. (Auvynet et al., 2008).

A maioria dos peptídeos pertencentes dessa família de dermaseptinas foram identificados principalmente com base em sua atividade antimicrobiana. No entanto, as funções biológicas não são bem reconhecidas podendo estar diretamente associadas ou não aos patógenos. Por exemplo, a dermaseptina B2 (DRS-B2) foi identificado pela primeira vez como um peptídeo capaz de estimular a ligação de agonistas dos receptores A1-adenosina (Daly et al., 1992), e ainda mostrou aumentar a potência de ligação de vários GPCRagonistas (Moni et al., 1995). O peptídeo insulíntrópico de pele de rã (FSIP), também um membro desta superfamília, teve significativamente a liberação tardia de insulina em BRINBD responsivo à glicose das células (Marenah et al., 2004), e a dermaseptina S1 (DRS-1) foi relatada para estimular a atividade microbicida de poli-leucócitos morfonucleares (PMN) (Ammar et.

al., 1998) e dermaseptina S9 (DRS-S9) para quimio atrair leucócitos PMN (Auvynet et. al., 2008).

A quimiotaxia induzida por peptídeos antimicrobianos é presumivelmente mediada por receptores acoplados à proteína G, como pré-tratamento das células com toxina pertussis ou fosfolipase C, fosfoinositida-3-quinase e os inibidores da Rho quinase eliminam a migração celular (Vongsa et al., 2009). De acordo com o peptídeo e a célula, vários receptores têm sido identificados. LL-37, os peptídeos de rã temporina A e provavelmente Drs S9, atraem células através de receptor de peptídeo formil-like-1. (Auvynet et. al., 2008).

Os efeitos imunomodulatórios sobre neutrófilos promovidos pela dermaseptina B2 e pela dermatoxina no presente estudo demonstram o potencial de PAMs de anuros como agentes imunomodulatórios, ampliando seu leque de atividades biológicas e, conseqüentemente, de possíveis aplicações terapêuticas.

7. Conclusão

A secreção cutânea de anfíbios é uma fonte rica de PAMs e anuros do gênero *Phyllomedusa* têm chamado atenção dos cientistas por conterem em suas secreções cutâneas um verdadeiro arsenal de moléculas com propriedades antimicrobianas, antiparasitárias, anti tumorais e imunomodulatórias. O presente projeto teve como objetivos gerais a purificação dos peptídeos dermaseptina B2 e dermatoxina presentes na secreção cutânea do anuro *Phyllomedusa bicolor* e a avaliação de seu potencial modulador em neutrófilos humanos.

A dermaseptina B2 promoveu aumento na capacidade fagocítica de neutrófilos, na produção e liberação de NETs e exibiu propriedades quimioatraentes sobre os neutrófilos. Já a dermatoxina também se mostrou capaz de aumentar a atividade fagocítica de neutrófilos, assim como de agir como um quimioatraente, no entanto não foi capaz de promover a liberação de NETs pelos neutrófilos nas condições experimentais empregadas.

A modulação dos neutrófilos promovidos pela dermaseptina B2 e pela dermatoxina avaliados no presente estudo demonstram o potencial de PAMs de anuros como agentes imunomodulatórios, ampliando seu leque de atividades biológicas e, conseqüentemente, de possíveis aplicações terapêuticas.

8. Referências Bibliográficas

- Abbas, A. (2012). *Imunologia celular e molecular 7a edição*. Elsevier Brasil.
- Amiche, M., Seon, A. A., Wroblewski, H., & Nicolas, P. (2000). Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family. *European Journal of Biochemistry*, 267(14), 4583–4592. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01514.x>.
- Ammar, B., Périanin, A., Mor, A., Sarfati, G., Tissot, M., Nicolas, P., Giroud, J.-P., & Roch-Arveiller, M. (1998). Dermaseptin, a peptide antibiotic, stimulates microbicidal activities of polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 247(3), 870–875.
- Auvynet, C., El Amri, C., Lacombe, C., Bruston, F., Bourdais, J., Nicolas, P., & Rosenstein, Y. (2008). Structural requirements for antimicrobial versus chemoattractant activities for dermaseptin S9. *The FEBS Journal*, 275(16), 4134–4151. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06554.x>.
- Azevedo Calderon, L. de, Silva, A. de A. E., Ciancaglini, P., & Stábeli, R. G. (2011). Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: From biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. *Amino Acids*, 40(1), 29–49. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0622-3>.
- Bartels, E. J. H., Dekker, D., & Amiche, M. (2019). Dermaseptins, multifunctional antimicrobial peptides: A review of their pharmacology, effectivity, Mechanism of action, and possible future directions. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1421. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01421>.
- Batista, C. V., da Silva, L. R., Sebben, A., Scaloni, A., Ferrara, L., Paiva, G. R., Olamendi-Portugal, T., Possani, L. D., & Bloch, C. (1999). Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. *Peptides*, 20(6), 679–686. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(99\)00050-9](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(99)00050-9).
- Bechinger, B. (1999). The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1462(1–2), 157–183. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00205-9](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00205-9).
- Belaid, A., Aouni, M., Khelifa, R., Trabelsi, A., Jemmali, M., & Hani, K. (2002). In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. *Journal of Medical Virology*, 66(2), 229–234. <https://doi.org/10.1002/jmv.2134>.

- Bókony, V., Móricz, Á. M., Tóth, Z., Gál, Z., Kurali, A., Mikó, Z., Pásztor, K., Szederkényi, M., Tóth, Z., Ujszegi, J., Üveges, B., Krüzselyi, D., Capon, R. J., Hoi, H., & Hettyey, A. (2016). Variation in chemical defense among natural populations of common toad, *Bufo bufo*, tadpoles: The role of environmental factors. *Journal of Chemical Ecology*, 42(4), 329–338. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0690-2>.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>.
- Brunetti, A. E., Hermida, G. N., Iurman, M. G., & Faivovich, J. (2016). Odorous secretions in anurans: Morphological and functional assessment of serous glands as a source of volatile compounds in the skin of the treefrog *Hypsiboas pulchellus* (Amphibia: Anura: Hylidae). *Journal of Anatomy*, 228(3), 430–442. <https://doi.org/10.1111/joa.12413>.
- Calis, H., Sengul, S., Guler, Y., & Karabulut, Z. (2020). Non-healing wounds: Can it take different diagnosis? *International Wound Journal*, 17(2), 443–448. <https://doi.org/10.1111/iwj.13292>.
- Cano, P. M., Vargas, A., & Lavoie, J.-P. (2016). A real-time assay for neutrophil chemotaxis. *BioTechniques*, 60(5), 245–251. <https://doi.org/10.2144/000114416>.
- Caramaschi, U., & Cruz, C. A. G. (2002). *Phyllomedusa*: Taxonomic status, habits, and biology (Amphibia, Anura, hylidae). *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 1(1), 05–10. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v1i1p05-10>.
- Charpentier, S., Amiche, M., Mester, J., Vouille, V., Le Caer, J. P., Nicolas, P., & Delfour, A. (1998). Structure, synthesis, and molecular cloning of dermaseptins B, a family of skin peptide antibiotics. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 14690–14697. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.14690>.
- Chen, Q., Wade, D., Kurosaka, K., Wang, Z. Y., Oppenheim, J. J., & Yang, D. (2004). Temporin A and related frog antimicrobial peptides use formyl peptide receptor-like 1 as a receptor to chemoattract phagocytes. *The Journal of Immunology*,

- 173(4), 2652–2659. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2652>.
- Chen, T., Gagliardo, R., Walker, B., Zhou, M., & Shaw, C. (2005). Partial structure of the phylloxin gene from the giant monkey frog, *Phyllomedusa bicolor*: Parallel cloning of precursor cDNA and genomic DNA from lyophilized skin secretion. *Peptides*, 26(12), 2624–2628. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.04.017>.
- Clarke, B. T. (1997). The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 72(3), 365–379. <https://doi.org/10.1017/s0006323197005045>.
- Colombo, B. M., Scalvenzi, T., Benlamara, S., & Pollet, N. (2015). Microbiota and mucosal immunity in amphibians. *Frontiers in Immunology*, 6, 111. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00111>.
- Conlon, J. M., Mechkarska, M., Pantic, J. M., Lukic, M. L., Coquet, L., Leprince, J., Nielsen, P. F., & Rinaldi, A. C. (2013). An immunomodulatory peptide related to frenatin 2 from skin secretions of the Tyrrhenian painted frog *Discoglossus sardus* (Alytidae). *Peptides*, 40, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.12.012>.
- Daly, J. W., Caceres, J., Moni, R. W., Gusovsky, F., Moos, M., Seamon, K. B., Milton, K., & Myers, C. W. (1992). Frog secretions and hunting magic in the upper Amazon: Identification of a peptide that interacts with an adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22), 10960–10963. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10960>.
- de Kraker, M. E. A., Stewardson, A. J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Medicine*, 13(11), e1002184. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>.
- de Lima, E. C., & Labate, B. C. (2007). “Remédio da Ciência” e “Remédio da Alma”: Os usos da secreção do kambô (*Phyllomedusa bicolor*) nas cidades. *Campos-Revista de Antropologia*, 8(1).
- de Moraes, D. R., Lanaro, R., Barbosa, I. L., Santos, J. M., Cunha, K. F., Hernandez, V. V., Tessaro, E. P., Gomes, C. S., Eberlin, M. N., & Costa, J. L. (2018). Ayahuasca and Kambo intoxication after alternative natural therapy for depression, confirmed by mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, 36(1), 212–221. <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0394-5>.
- Döring, Y., Libby, P., & Soehnlein, O. (2020). Neutrophil extracellular traps participate

- in cardiovascular diseases: Recent experimental and clinical insights. *Circulation Research*, 126(9), 1228–1241. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.315931>.
- Dornelles, M. F., Marques, M. da G. B., & Renner, M. F. (2010). Revisão sobre toxinas de Anura (Tetrapoda, Lissamphibia) e suas aplicações biotecnológicas - DOI: [Http://dx.doi.org/10.15602/1983-9480/cmbs.v12n24p103-114](http://dx.doi.org/10.15602/1983-9480/cmbs.v12n24p103-114). *Ciência em Movimento*, 12(24), 103–113. <https://doi.org/10.15602/1983-9480/cmbs.v12n24p103-114>.
- Duellman, W. E., Marion, A. B., & Hedges, S. B. (2016). Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, 4104(1), 1–109. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4104.1.1>.
- Eming, S.A., Martin, P. & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.*, 6(265), 265sr6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>.
- Erspamer, V., Melchiorri, P., Broccardo, M., Erspamer, G. F., Falaschi, P., Improta, G., Negri, L., & Renda, T. (1981). The brain-gut-skin triangle: New peptides. *Peptides*, 2 Suppl 2, 7–16. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(81\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0196-9781(81)90003-6).
- Fleury, Y., Vouille, V., Beven, L., Amiche, M., Wróblewski, H., Delfour, A., & Nicolas, P. (1998). Synthesis, antimicrobial activity and gene structure of a novel member of the dermaseptin B family. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1396(2), 228–236. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(97\)00194-2](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(97)00194-2).
- Frost, D. (2021). *Amphibian Species of the World*. <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>.
- Giuliani, A., Pirri, G., & Nicoletto, S. (2007). Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*, 2(1), 1–33.
- Greaves, N. S., Ashcroft, K. J., Baguneid, M., & Bayat, A. (2013). Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *Journal of Dermatological Science*, 72(3), 206–217. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.07.008>.
- Gustafsson, A., Olin, A. I., & Ljunggren, L. (2010). LPS interactions with immobilized and soluble antimicrobial peptides. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 70(3), 194–200. <https://doi.org/10.3109/00365511003663622>.
- Hancock, R. E. W., Haney, E. F., & Gill, E. E. (2016). The immunology of host defence

- peptides: Beyond antimicrobial activity. *Nature Reviews. Immunology*, 16(5), 321–334. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.29>.
- Haney, E. F., & Hancock, R. E. W. (2013). Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. *Biopolymers*, 100(6), 572–583. <https://doi.org/10.1002/bip.22250>.
- Hesselink, J. M. K., & Sacerdote, P. (2019). Frogs as a rich source for new treatment Principles: A review of bio-active peptides in *Phyllomedusae* (*Phyllomedusa bicolor*) and *Bombinae* (*Bombina variegata*). *SL Pharmacology and Toxicology*, 2(1), 116.
- Huang, Y. B., He, L.Y., Jiang, H. Y., & Chen, Y. X. Role of helicity on the anticancer mechanism of action of cationic-helical peptides. *Int J Mol Sci.*, 13(6), 6849-6862. <https://doi.org/10.3390/ijms13066849>.
- Jm, E., & Exbrayat, J.-M. (2018). From oviparity to marsupialism: Strange modes of reproduction in amphibians. *International Journal of Zoology and Animal Biology*, 1. <https://doi.org/10.23880/IZAB-16000108>.
- Kim, W., Koo, H., Richman, A. M., Seeley, D., Vizioli, J., Klocko, A. D., & O'brochta, D. A. (2004). Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*. *Journal of Medical Entomology*, 41(3), 447–455.
- Kondo, T., & Ishida, Y. (2010). Molecular pathology of wound healing. *Forensic Science International*, 203(1–3), 93–98.
- Kumar, H., & Tolia, N. H. (2019). Getting in: The structural biology of malaria invasion. *PLoS pathogens*, 15(9), e1007943.
- Ladram, A., & Nicolas, P. (2016). Antimicrobial peptides from frog skin: Biodiversity and therapeutic promises. *Front. Biosci*, 21, 1341–1371.
- Lazarus, L. H., Bryant, S. D., Cooper, P. S., & Salvadori, S. (1999). What peptides these deltorphins be. *Progress in Neurobiology*, 57(4), 377–420. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00050-1)
- Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H., & He, Q. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, 11(7), 3919–3931.
- Leite, J. R. S., 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. (2005). Phylloseptins: A novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from

- the *Phyllomedusa* genus. *Peptides*, 26(4), 565–573.
- Lescure, J., Marty, C., & Marty, C. (2000). Atlas des amphibiens de Guyane (Vol. 45). Publications Scientifiques du MNHN Paris.
- Lima, L. L. C., Oliveira, J. P. S., Silva, L. E. B., & dos Santos, C. B. (2019). Características gerais dos anfíbios anuros e sua biodiversidade. *Diversitas Journal*, 4(3), 774–789.
- Lorin, C., Saidi, H., Belaid, A., Zairi, A., Baleux, F., Hocini, H., Bélec, L., Hani, K., & Tangy, F. (2005). The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. *Virology*, 334(2), 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.02.002>.
- Mansour, S. C., Pena, O. M., & Hancock, R. E. W. (2014). Host defense peptides: Front-line immunomodulators. *Trends in Immunology*, 35(9), 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.07.004>.
- Marenah, L., Shaw, C., Orr, D. F., McClean, S., Flatt, P. R., & Abdel-Wahab, Y. H. A. (2004). Isolation and characterisation of an unexpected class of insulinotropic peptides in the skin of the frog *Agalychnis litodryas*. *Regulatory peptides*, 120(1–3), 33–38.
- Martin, P. (1997). Wound healing—Aiming for perfect skin regeneration. *Science (New York, N. Y.)*, 276(5309), 75–81. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.75>.
- Matsuzaki, K. (2009). Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(8), 1687–1692.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., & Miyajima, K. (1996). An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*, 35(35), 11361–11368. <https://doi.org/10.1021/bi960016v>.
- Mechkarska, M., Prajeep, M., Coquet, L., Leprince, J., Jouenne, T., Vaudry, H., King, J. D., & Conlon, J. M. (2012). The hymenochirins: A family of host-defense peptides from the Congo dwarf clawed frog *Hymenochirus boettgeri* (Pipidae). *Peptides*, 35(2), 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.03.029>.
- Minutti, C. M., Knipper, J. A., Allen, J. E., & Zaiss, D. M. W. (2017). Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 61, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.08.006>.
- Mócsai, A. (2013). Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation,

- and beyond. *Journal of Experimental Medicine*, 210(7), 1283–1299.
- Moni, R. W., Romero, F. S., & Daly, J. W. (1995). The amphiphilic peptide adenoregulin enhances agonist binding to A1-adenosine receptors and [35S] GTPγS to brain membranes. *Cellular and molecular neurobiology*, 15(4), 465-493.
- Mor, A., Amiche, M., & Nicolas, P. (1994). Structure, synthesis, and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: Relationship with adenoregulin. *Biochemistry*, 33(21), 6642–6650. <https://doi.org/10.1021/bi00187a034>.
- Mor, A., & Nicolas, P. (1994). Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *European Journal of Biochemistry*, 219(1–2), 145–154. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb19924.x>.
- Moridi, K., Hemmaty, M., Eidgahi, M. R. A., Najafi, M. F., Zare, H., Ghazvini, K., & Neshani, A. (2020). Construction, cloning, and expression of Melittin antimicrobial peptide using *Pichia pastoris* expression system. *Gene Reports*, 21, 100900.
- Nicolas, P., Vanhoye, D., & Amiche, M. (2003). Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. *Peptides*, 24(11), 1669–1680. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.08.017>.
- Nothan, C. (2006). Neutrophils and immunity: Challenges and port unities. *Nat. Rev. Immunol*, 6(6), 173.
- O'Rourke, D. P. (2007). Amphibians used in research and teaching. *ILAR Journal*, 48(3), 183–187.
- Pantoja, D. L., & de Fraga, R. (2012). Herpetofauna of the Reserva Extrativista do Rio Gregório, Juruá Basin, southwest Amazonia, Brazil. *Check List*, 8(3), 360–374.
- Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 134–147.
- Park, J.-B. (2003). Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. *Experimental & molecular medicine*, 35(5), 325–335.
- Park, S. Y., Shrestha, S., Youn, Y.-J., Kim, J.-K., Kim, S.-Y., Kim, H. J., Park, S.-H., Ahn, W.-G., Kim, S., & Lee, M. G. (2017). Autophagy primes neutrophils for neutrophil extracellular trap formation during sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 196(5), 577–589.
- Petrie, R. J., Doyle, A. D., & Yamada, K. M. (2009). Random versus directionally

- persistent cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8), 538-549.
- Pierre, T. N., Seon, A. A., Amiche, M., & Nicolas, P. (2000). Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/opioid peptide precursors. *European Journal of Biochemistry*, 267(2), 370–378.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., & Shai, Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 31(49), 12416–12423. <https://doi.org/10.1021/bi00164a017>.
- Qi, J., Zulfiker, A. H. M., Li, C., Good, D., & Wei, M. Q. (2018). The Development of toad toxins as potential therapeutic agents. *Toxins*, 10(8), E336. <https://doi.org/10.3390/toxins10080336>
- Radzishewsky, I. S., Rotem, S., Zaknoon, F., Gaidukov, L., Dagan, A., & Mor, A. (2005). Effects of acyl versus aminoacyl conjugation on the properties of antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2412–2420. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2412-2420.2005>.
- Richter, K., Egger, R., Negri, L., Corsi, R., Severini, C., & Kreil, G. (1990). cDNAs encoding [D-Ala²] deltorphin precursors from skin of *Phyllomedusa bicolor* also contain genetic information for three dermorphin-related opioid peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4836–4839.
- Rollins-Smith, L. A., Reinert, L. K., O’Leary, C. J., Houston, L. E., & Woodhams, D. C. (2005). Antimicrobial peptide defenses in amphibian skin. *Integrative and Comparative Biology*, 45(1), 137–142. <https://doi.org/10.1093/icb/45.1.137>.
- Santana, C. J. C., Magalhães, A. C. M., Prías-Márquez, C. A., Falico, D. A., Dos Santos Júnior, A. C. M., Lima, B. D., Ricart, C. A. O., de Pilger, D. R. B., Bonotto, R. M., Moraes, C. B., Freitas-Júnior, L. H., Álvares, A. da C. M., Freitas, S. M., Luz, I. S., Pires, O. R., Fontes, W., & Castro, M. S. (2020). Biological properties of a novel multifunctional host defense peptide from the skin secretion of the Chaco tree frog, *Boana raniceps*. *Biomolecules*, 10(5), E790. <https://doi.org/10.3390/biom10050790>.
- Santos, J. C., Tarvin, R. D., & O’Connell, L. A. (2016). A review of chemical defense in poison frogs (Dendrobatidae): Ecology, pharmacokinetics, and autoresistance. *Chemical Signals in Vertebrates* 13, 305–337.
- Scorciapino, M. A., Manzo, G., Rinaldi, A. C., Sanna, R., Casu, M., Pantic, J. M., Lukic,

- M. L., & Conlon, J. M. (2013). Conformational analysis of the frog skin peptide, plasticin-L1, and its effects on production of proinflammatory cytokines by macrophages. *Biochemistry*, *52*(41), 7231–7241. <https://doi.org/10.1021/bi4008287>.
- Sen, C. K., Gordillo, G. M., Roy, S., Kirsner, R., Lambert, L., Hunt, T. K., Gottrup, F., Gurtner, G. C., & Longaker, M. T. (2009). Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration*, *17*(6), 763–771. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x>.
- Severini, C., Improta, G., Falconieri-Erspamer, G., Salvadori, S., & Erspamer, V. (2002). The tachykinin peptide family. *Pharmacological Reviews*, *54*(2), 285–322. <https://doi.org/10.1124/pr.54.2.285>.
- Serhan, C. N., & Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: The beginning programs the end. *Nature Immunology*, *6*(12), 1191–1197.
- Silva, F. V. A. da, Monteiro, W. M., & Bernarde, P. S. (2019). “Kambô” frog (*Phyllomedusa bicolor*): Use in folk medicine and potential health risks. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *52*.
- Strahilevitz, J., Mor, A., Nicolas, P., & Shai, Y. (1994). Spectrum of antimicrobial activity and assembly of dermaseptin-b and its precursor form in phospholipid membranes. *Biochemistry*, *33*(36), 10951–10960. <https://doi.org/10.1021/bi00202a014>.
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., & Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2066. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>.
- Toledo, R. d., & Jared, C. (1995). Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *111*(1), 1–29.
- Uhlig, T., Kyprianou, T., Martinelli, F. G., Oppici, C. A., Heiligers, D., Hills, D., Calvo, X. R., & Verhaert, P. (2014). The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EuPA Open Proteomics*, *4*, 58–69.
- Vanhoye, D., Bruston, F., Nicolas, P., & Amiche, M. (2003). Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *European Journal of Biochemistry*, *270*(9), 2068–2081.

<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03584.x>.

- Vianello, F., Olszak, I. T., & Poznansky, M. C. (2005). Fugetaxis: Active movement of leukocytes away from a chemokinetic agent. *Journal of Molecular Medicine*, 83(10), 752–763.
- Vongsa, R. A., Zimmerman, N. P., & Dwinell, M. B. (2009). CCR6 regulation of the actin cytoskeleton orchestrates human beta defensin-2-and CCL20-mediated restitution of colonic epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(15), 10034–10045.
- Wang, G., Mishra, B., Lau, K., Lushnikova, T., Golla, R., & Wang, X. (2015). Antimicrobial peptides in 2014. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 8(1), 123–150. <https://doi.org/10.3390/ph8010123>.
- Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*, 83(3), 835–870.
- Yacoub, T., Rima, M., Karam, M., & Fajloun, J.-M. S. A. Z. (2020). Antimicrobials from venomous animals: An overview. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(10), E2402. <https://doi.org/10.3390/molecules25102402>.
- Yamaguchi, S., Hong, T., Waring, A., Lehrer, R. I., & Hong, M. (2002). Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a beta-sheet antimicrobial peptide, protegrin. *Biochemistry*, 41(31), 9852–9862. <https://doi.org/10.1021/bi0257991>.
- Zasloff, M. (2019). Antimicrobial peptides of multicellular organisms: My perspective. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1117, 3–6. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_1.