



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**ANA LUISA ALVES NOGUEIRA BARROS**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SARS-COV-2 DE UM PEPTÍDEO BIOATIVO IDENTIFICADO NO TRANSCRIPTOMA DA SALAMANDRA-DE-FOGO (*SALAMANDRA salamandra*)**

**BRASÍLIA - DF**

**2023**

**ANA LUISA ALVES NOGUEIRA BARROS**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SARS-COV-2 DE UM PEPTÍDEO BIOATIVO IDENTIFICADO NO TRANSCRIPTOMA DA SALAMANDRA-DE-FOGO (*SALAMANDRA salamandra*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

**Orientador:** Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.

**Co-orientadora:** Dra. Alexandra Plácido.

**BRASÍLIA – DF**

**2023**

ANA LUISA ALVES NOGUEIRA BARROS

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SARS-COV-2 DE UM PEPTÍDEO BIOATIVO IDENTIFICADO NO TRANSCRIPTOMA DA SALAMANDRA-DE-FOGO (SALAMANDRA salamandra)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

**Banca Examinadora**

**Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite**

Universidade de Brasília - UnB

(Presidente)

**Dra. Tatiana Karla dos Santos Borges**

Universidade de Brasília – UnB

(Membro interno)

**Dr. Rubens Fernandes**

Universidade Fernando Pessoa – UFP

(Membro externo)

**Dra. Andreanne Gomes Vasconcelos**

Centro Universitário do Distrito Federal – UDF

(Membro externo – Suplente)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiro, minha enorme e eterna gratidão à minha família, por ser meu maior suporte emocional e financeiro durante toda essa jornada: meus avós Graça e Ubirajara, meus pais Marisa e Júnior, madrasta Kelma, meus tios Andreia, Valério, Fredman e Oceanira e meus irmãos João Neto, Ana Beatriz, Kaio Tobias e João Guilherme. Obrigada por serem meu apoio durante esses anos! Amo vocês! À minha avó Maria Alves minha gratidão imensurável! Com certeza essa conquista não existiria se não fosse seus conselhos e consolo! Muito obrigada de verdade a todos vocês! É por vocês todas as minhas conquistas.

Ainda quero agradecer também ao meu grupo de pesquisa NuPMIA que foi meu suporte no desenvolvimento do meu projeto. Aos meus professores: orientador José Roberto Leite por todos os ensinamentos e oportunidades e coorientadora Alexandra Plácido por todos os ensinamentos minha sincera gratidão. Quero agradecer também ao prof. Guilherme Brandt e ao colega Samuel pela parceria na síntese do peptídeo. Aline, Simone e Jhones (minhas grandes amigadas de Brasília) e minha grande amiga Olga que me acompanharam, ajudaram e amparam: muito obrigada por tudo!

Por fim, agradeço ao meu bom Deus que colocou cada uma dessas pessoas na minha vida e que é meu alicerce e meu guia.

## EPÍGRAFE

“Quando for a hora certa, eu, o Senhor, farei acontecer”

**(Isaias, 60:22)**

## RESUMO

Anfíbios da ordem Urodela, salamandras e tritões, compreendem uma rica fonte de moléculas com propriedades bioativas, especialmente aquelas isoladas da secreção excretada na pele, com propriedades antimicrobiana, antioxidante, vasoativa, de modulação do sistema imunológico, entre outros. Em 2020 iniciou-se a pandemia da doença COVID-19, causada pelo vírus síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-Cov-2), que acarretou em milhares de mortes. O que ressaltou a importância dos estudos de substâncias para produção de drogas terapêuticas e profiláticas. Considerando isso, esse trabalho teve por objetivo realizar uma revisão de literatura a respeito das moléculas provenientes de urodelos, com ênfase em suas atividades biológicas e sintetizar e avaliar a atividade anti-SARS-Cov-2 de um peptídeo identificado no transcriptoma da salamandra-de-fogo (*Salamandra salamandra*). A literatura apresenta diversas classes de moléculas de urodelos, em especial peptídeos e alcaloides. Os quais apresentam principalmente propriedades antibacterianas. O peptídeo identificado e sintetizado, defensina SS-1, pertence à classe das defensinas e o experimento *in silico* de docking molecular 3D realizado entre o complexo enzima-ligante com Spike/ECA2 e o ligante peptídico demonstram sua interação com o sítio de ligação ativo. Embora estudos adicionais sejam necessários, o impacto preliminar da defensina SS1 avaliada *in silico* ilustrou seu potencial como molécula promissora para o desenvolvimento de medicamentos no tratamento da doença de COVID-19.

**Palavras-chave:** Defensina; Peptídeos; Salamandra salamandra; SARS-Cov-2; Urodelos;

## ABSTRACT

Amphibians of the Urodela order, salamanders and newts, comprise a rich source of molecules with bioactive properties, especially those isolated from the secretion excreted in the skin, with antimicrobial, antioxidant, vasoactive properties, modulating the immune system, among others. In 2020, the COVID-19 disease pandemic began, caused by the severe acute respiratory syndrome virus coronavirus 2 (SARS-Cov-2), which resulted in thousands of deaths. This highlighted the importance of studies of new substances to guide the production of therapeutic and prophylactic drugs for infectious diseases. Considering this, this work aimed to carry out a literature review regarding molecules from urodels, with emphasis on their biological activities and to synthesize and evaluate the anti-SARS-Cov-2 activity of a peptide identified in the transcriptome of the fire salamander (*Salamander salamander*). The literature presents several classes of urodelar molecules, especially peptides and alkaloids. The identified and synthesized peptide, defensin SS-1, belongs to the class of defensins and the *in silico* 3D molecular dynamics experiment performed between the enzyme-linker complex with Spike WT RBD/hACE2 and the peptide linker demonstrate its interaction with the binding site active. Although further studies are needed, the preliminary impact of SS1 defensin evaluated *in silico* in assay illustrated its potential as a promising molecule for drug development in the treatment of COVID-19 disease.

**Keywords:** Defensin; Peptides; Salamander salamander; SARS-CoV-2; Urodeles;

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécimes adultos de <i>Salamandra salamandra</i> ..	19
Figura 2 - Alcaloides identificados na secreção cutânea da salamandra-de-fogo ( <i>Salamandra salamandra</i> ).....	29
Figura 3 - Alinhamento múltiplo com os melhores scores de blastp para sequência traduzida que caracteriza o peptídeo maduro de defensina CFBD-1. ....	45
Figura 4 - Estrutura do peptídeo identificado no transcriptoma da Salamandra-de-fogo ( <i>Salamandra salamandra</i> ) – DSS-1. ....	45
Figura 5 - Confirmação por Espectrometria de Massa (ESI-TOF) do peptídeo DSS-1 de acordo com a relação massa/carga. ....	46
Figura 6 - (A) Frequência das ligações de H entre as proteínas dos complexos: ECA2-PEP-S1, ECA2-PEP-S2, SPIKE-PEP-S1 e SPIKE-PEP-S2 ao longo das simulações DM. (B) RMSD de simulações DM das duas melhores soluções de ancoragem: ECA2-PEP-S2 e SPIKE-PEP-S2. (C) Ilustração das ligações de H nos complexos ECA2-PEP-S2 e SPIKE-PEP-S2 das estruturas com as ligações de H mais altas durante o DM. ....	47
Figura 7 - Curva de concentração-resposta antiviral SARS-CoV-2 para o peptídeo.....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estrutura primária de peptídeos isolados de anfíbios urodelos. ...	35
Tabela 2 - Lista de resíduos dos complexos ECA2-PEP-S2 e SPIKE-PEP-S2 que formam ligações de H com ocupação superior a 10% ao longo da simulação DM. ....	49

## LISTA DE ABREVIações

APCs = Células apresentadoras de antígenos;

CCK-TV = Colecistocina-*Tylotriton verrucosus*;

CIM = Concentração inibitória mínima;

COVID-19 = Doença do coronavírus 2019;

Da = Daltons;

DM = dinâmica molecular;

DNA = Ácido desoxirribonucleico;

DSS1 = Defensina SS-1;

ECA = Enzima conversora de angiotensina;

ECA2 = Enzima conversora de angiotensina 2;

ECAI = Enzima conversora de angiotensina I;

ESI-TOF = Electrospray Ionization-Time of Flight (Ionização por eletrospray-Tempo de voo);

IL-6 = Interleucina 6;

KDa = Kilodalton;

LF = Lactoferrina;

PAMs = Peptídeos antimicrobianos;

PBs = Peptídeos bioativos;

RMSD = Desvio quadrático médio;

RNA = Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico);

RNA<sub>m</sub> = Messenger ribonucleic acid (Ácido ribonucleico mensageiro);

SARS-Cov-1 = Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 1;

SARS-Cov-2 = Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2;

SRA = *Sequence Read Archive*;

TGF- $\beta$ 1 = Fator de transformação do crescimento-beta 1.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. JUSTIFICATIVA .....	17
3. OBJETIVOS .....	18
3.1. Objetivo geral .....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
4.1. Salamandra-de-fogo.....	19
4.2. Peptídeos bioativos.....	20
4.3. Defensinas.....	22
4.4. Doença COVID-19.....	24
5. CAPÍTULO 2 – Artigo “O Arsenal de Moléculas Bioativas na Secreção da Pele de Anfíbios Urodelos” publicado no periódico <i>Frontiers in Pharmacology</i> . Fator de impacto: 5,988. ISSN: 1663-9812. DOI: <a href="https://doi.org/10.3389/fphar.2021.810821">https://doi.org/10.3389/fphar.2021.810821</a> .....	26
5.1. Resumo .....	26
5.2. Introdução.....	26
5.3. Alcaloides .....	28
5.4. Peptídeos.....	31
5.5. Outras moléculas.....	36
5.6. Conclusão.....	36
6. CAPÍTULO 3 – Antiviral activity against SARS-CoV-2 of a novel defensin peptide present in the transcriptome of the fire salamander ( <i>Salamandra salamandra</i> ) Artigo em preparação para a revista “Pharmaceuticals” (Journal Rank: JCR - Q1 (Pharmacology & Pharmacy) / CiteScore - Q2 (Pharmaceutical Science).....	38
6.1. Introdução.....	38

6.2. Materiais e métodos.....	39
6.2.1. Identificação do peptídeo .....	39
6.2.2. Síntese do peptídeo .....	40
6.2.3. Purificação e Caracterização da estrutura do peptídeo .....	41
6.2.4. Ensaios <i>in silico</i> : Avaliação das interações entre peptídeo DSS1 e enzima conversora de angiotensina humana 2.....	42
6.2.5. Ensaio <i>in vitro</i> de infecção por SARS-CoV-2 baseado em células Vero-E6.....	43
6.3. Resultados e Discussão.....	44
7. CONCLUSÃO.....	53
8. REFERÊNCIAS.....	53

## 1. INTRODUÇÃO

A compreensão da biodiversidade da Terra é importante para a descrição da diversidade genética e prospecção de moléculas bioativas de diversos organismos (Cancelarich, Wilke et al. 2020). Essas moléculas possuem aplicação principalmente no desenvolvimento de novos medicamentos (Afolabi, Saeed et al. 2018). Os anfíbios também têm compreendido uma rica fonte desses compostos (Tempone, Melhem et al. 2007).

Os anfíbios constituem a classe de animais vertebrados Amphibia que se subdivide em três ordens: Anura, que agrupa rãs e sapos, Gymnophiona ou Apoda, englobando as cecílias, e Caudata ou Urodela, a qual salamandras e tritões pertencem (Xiao, Liu et al. 2011). A ordem Urodela abrange 10 famílias, sendo a maior Plethodontidae, com 70% dos membros de toda a ordem. A característica anatômica unificadora desses anfíbios é a presença de cauda (Wake and Dresner 1967). Sua distribuição atual é limitada às regiões do hemisfério norte das Américas do Norte e Central, Europa, Ásia e norte da África, com ocorrência de poucas espécies abaixo do equador na América do Sul (Baitchman and Herman 2015).

Na pele dos anfíbios existem dois tipos de glândulas - mucosas e granulares. As glândulas granulares são responsáveis pela síntese de compostos químicos que desempenham a função de proteção contra predadores e infecções causadas por microorganismos (Clarke 1997). Sabe-se que a secreção excretada na pele desempenha diversas funções, como de defesa contra predadores, realização de comunicação intraespecífica através dos feromônios e ainda de proteção contra infecções por microorganismos (Bucciarelli, Green et al. 2016).

Diversas moléculas bioativas tem sido isoladas da secreção da pele de espécies de anfíbios ordem Urodela. Os alcaloides obtidos a partir da secreção dérmica da *Salamandra maculosa* apresentaram uma atividade

contra bactérias e fungos (Preusser, Habermehl et al. 1975). Também na secreção dérmica da salamandra *Plethodon cinerius* (*P.cinereus*) foi observada a presença de ácidos graxos com atividade contra bactérias Gram-positivas (Rickrode, Mueller et al. 1986). O CCK-TV é uma colecistocina, identificado a partir da pele da salamandra *Tylotriton verrucosus* que mostrou potencial de indução da contração de músculo estriado liso (Jiang, Hakim et al. 2015).

Além desses compostos, também foram encontrados em salamandras e tritões peptídeos, principalmente com ação antimicrobiana. A mistura de peptídeos isolada da pele de *Ambystoma tigrinum*, mostrou capacidade de inibir o crescimento de bactérias (Sheafor, Davidson et al. 2008). O peptídeo F15 obtido da pele da *P.cinereus* foi capaz de reduzir a sobrevivência do *Staphylococcus aureus* (Fredericks and Dankert 2000). Andricina 01, peptídeo isolado da secreção da pele da salamandra gigante chinesa *Andrias davidianus*, apresentou atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Pei and Jiang 2017). CFBD-1, um peptídeo da classe das defensinas, foi isolado da secreção dérmica da *Cynops fudingens*. Essa defensina apresentou-se ativa principalmente contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* (Meng, Yang et al. 2013).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) constituem uma classe moléculas compostas encontradas em diversos organismos e fazem parte de seus sistemas imune inato (Jenssen, Hamill et al. 2006). Em geral, possuem tamanho pequeno e carga residual positiva, por isso interagem facilmente com a membrana de microorganismos (Mookherjee and Hancock 2007, Nguyen, Haney et al. 2011). Ademais, sua estrutura contém partes tanto hidrofóbicas quanto hidrofílicas, o que favorece sua interação em ambiente tanto aquosos como de natureza hidrofóbica ou lipídica, como das membranas celulares (Yamasaki and Gallo 2008, Nguyen, Haney et al. 2011).

As defensinas são uma família de PAMs, em geral são formadas por 18 a 45 resíduos de aminoácidos e estão classificados em três grupos:  $\alpha$ -

defensinas,  $\beta$ -defensinas e  $\theta$ -defensinas de acordo com o local da ligação dissulfeto (Zhao and Lu 2014, Gao, Wu et al. 2017). Essas moléculas estão presentes em diversos organismos e desempenham funções importantes no sistema imune inato contra infecções microbianas (Lehrer and Lu 2012).

*Salamandra salamandra*, popularmente conhecida como salamandra-de-fogo, é uma espécie de anfíbio que pertence a ordem Urodela e é encontrada nas regiões sul e central da Europa (Manenti, Ficetola et al. 2009). Assim como nos demais anfíbios, a secreção da pele desses animais é composta por diversos componentes como alcaloides, peptídeos, aminas biogênicas, proteínas e esteroides (Luddecke, Schulz et al. 2018). Um estudo com a secreção cutânea da *S. salamandra* revelou a presença de um peptídeo com potencial antioxidante, o salamandrina-I (Placido, Bueno et al. 2020).

Em março de 2020 a doença viral COVID-19, que afeta principalmente o trato respiratório, foi declarada pandêmica pela Organização Mundial de Saúde (Singhal 2020, Velavan and Meyer 2020). O síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-Cov-2) é o agente etiológico dessa doença (Jean, Lee et al. 2020). É um vírus de RNA de fita simples, envelopado, senso positivo e tem por mecanismo de entrada na célula hospedeira a ligação à enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) presente na superfície das células, em especial do pulmão e intestino (Mahmoud, Jarrar et al. 2020, Zhu, Yu et al. 2020). O principal meio de transmissão é através do contato com gotículas aerossolizadas, apesar de que outras vias de transmissão, como contato direto, terem sido relatadas (Holshue, DeBolt et al. 2020). A pandemia causada por SARS-CoV-2 foi responsável por um grave problema de saúde, afetando a economia global, o que mostra a urgência de desenvolvimento de novos fármacos contra doenças infecciosas (Zhu, Yu et al. 2020).

## 2. JUSTIFICATIVA

A pandemia da doença infecciosa coronavírus-19 (COVID-19) compreende um importante problema de saúde pública e que acarretou em diversos impactos a nível global, inclusive econômicos. De acordo com Organização Mundial de Saúde, até março de 2023 estima-se 759 milhões de casos e 6,8 milhões de mortes decorrentes dessa doença em todo o mundo. O Brasil foi um dos países mais severamente afetado pela pandemia de COVID-19, sendo relatado quase 200.000 mortes por COVID-19 apenas em 2020 (Sansone, Nathalia et al. 2022). Estudos demonstraram que a mortalidade é maior na população idosa e que outros fatores, como certas comorbidades, influenciam na severidade da doença (Salian, Wright et al. 2021). Diversas vacinas foram desenvolvidas, no entanto, ainda há casos e mortes da doença relatados, o que evidencia a necessidade de uma terapia direcionada disponível.

Moléculas de origem de anfíbios vem sendo exploradas pela comunidade científica como modelos para o desenho de novas drogas devido a sua baixa toxicidade. Pesquisas demonstram que PAMs apresentam uma importante capacidade antiviral, em especial as defensinas. Além disso, quanto aos urodélos, existem poucos estudos voltados para a elucidação de suas moléculas e atividades biológicas, o que ressalta a importância da exploração dessa área. Portanto, o estudo de moléculas oriundas da espécie *Salamandra salamandra* (ordem Urodela) e avaliação de suas atividades biológicas é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de medicações antivirais.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Identificação de peptídeo antimicrobiano através do transcriptoma da espécie *Salamandra salamandra* e avaliação da sua atividade antiviral contra o vírus SARS-CoV-2.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- 3.2.1. Identificar, reunir e analisar as principais publicações sobre as moléculas bioativas identificadas em anfíbios da Ordem Urodela e suas atividades biológicas;
- 3.2.2. Identificação de peptídeo antimicrobiano através do transcriptoma da espécie *Salamandra salamandra*;
- 3.2.3. Síntese em fase sólida do peptídeo previamente identificado;
- 3.2.4. Purificação do peptídeo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- 3.2.5. Avaliação da interação entre a proteína S do vírus SARS-CoV-2 e o peptídeo *in silico*;
- 3.2.6. Avaliação *in vitro* da atividade antiviral contra SARS-CoV-2 em células Vero-E6 (ATCC® CRL-1586™).

## 4. CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1. Salamandra-de-fogo

*Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758), popularmente conhecida por salamandra-de-fogo, é uma espécie de anfíbio que pertence a ordem Urodela e ocorre principalmente nas regiões sul e central da Europa (Manenti, Ficetola et al. 2009). Encontra-se amplamente distribuída nos ecossistemas florestais folhosos dessas áreas (Bani, Pisa et al. 2015) e possui uma pele fina, glandular e vascularizada que fornece um importante órgão respiratório que funciona bem em ambientes aquáticos e terrestres (Feder and Burggren 1992).

Em geral o aspecto da pele desses animais é liso e brilhante apresentando uma coloração de fundo negro, com manchas e linhas amarelas, ou uma combinação de ambas, sendo variável entre as subespécies (Figura 1). O tamanho e a forma das manchas amarelas no corpo sofrem mudanças com o tempo. O fundo também pode ser marrom escuro e pode apresentar manchas de cor vermelha ou vinho (Beukema, Nicieza et al. 2016). Acredita-se que a coloração esteja diretamente relacionada a toxicidade dos animais, sendo um importante aliado antipredador, considerada uma forma de aposematismo (Łaciak 2022).



Figura 1 - Espécimes adultos de *Salamandra salamandra*. Foto: Peter Eaton.

Na pele desses animais existem dois tipos de glândulas - mucosas e granulares (Clarke 1997). As glândulas granulares são responsáveis pela produção de uma secreção que apresenta em sua composição alcaloides, peptídeos bioativos, aminas biogênicas, proteínas e esteroides (Luddecke, Schulz et al. 2018). Esses compostos possuem diversas funções, como proteção contra predadores, liberação de feromônios e um importante papel de defesa contra infecções bacterianas e fúngicas na epiderme desse animal (Gomes, Giri B Fau - Saha et al. , Mebs and Pogoda 2005, Bucciarelli, Green et al. 2016).

#### **4.2. Peptídeos bioativos**

Peptídeos bioativos (PBs) compreendem um grupo de moléculas que desempenham importantes funções nas células e podem ser encontrados em formatos simples ou atrelados a estrutura de proteínas (Daliri, Oh et al. 2017, Akbarian, Khani et al. 2022). São classificados em dois tipos: endógenos, produzidos por células e glândulas do próprio organismo, e exógenos, os adquiridos de diversas fontes, como alimentos e medicamentos (Lorenzo, Munekata et al. 2018).

Desde a síntese da insulina, em 1921, os PBs são largamente estudados e utilizados nas indústrias alimentícia, têxtil, de biocombustíveis e principalmente na farmacêutica, como alternativa terapêutica, pois apresentam diversas atividades biológicas e, atualmente há mais de 80 fármacos peptídicos desenvolvidos e aprovados (Mathieu, Gillard et al. 2017, Wang, Wang et al. 2022).

As drogas peptídicas apresentam vantagens em relação às convencionais: têm atividades mais especializadas no tecido alvo e, portanto, apresentam menos efeito tóxico; são eficazes em baixas concentrações; não se acumulam nos organismos e são facilmente excretados e destruídos, o que proporciona a eliminação adequada após o uso (Akbarian 2021, Akbarian, Khani et al. 2022).

Anfíbios são uma rica fonte natural de peptídeos com uma gama de atividades, tais como antibacterianas, antivirais, cicatrizantes, antidiabéticas, analgésicas e anticancerígenas (Depta, Małkowska et al. 2022). Dentre os anfíbios há os urodelos, dos quais diversas moléculas já foram identificados, em especial da secreção excretada de sua pele (Plácido, Bueno et al. 2020).

Os PAMs, constituem uma classe de moléculas encontradas em diversas espécies de organismos (Lau e Dunn 2018). Em geral, apresentam tamanho pequeno e carga residual positiva o que lhe confere uma forte interação com a membrana de microorganismos (Mookherjee e Hancock 2007, Nguyen, Haney et al. 2011). Assim, a membrana celular é o principal alvo dessas moléculas (Yeaman e Yount 2003).

PAMs possuem diversas atividades, mas destacam-se como agente antimicrobiano, com ação em bactérias Gram-negativas e positivas, fungos, vírus e parasitas (Agrawal, Bhalla et al. 2018). Além dessas também já foram descritas ações como de imunomodulação, atuando como regulador do sistema imune (Molhoek, van Dijk et al. 2011), de neutralização de endotoxinas, ação cicatrizante e de promoção de angiogênese (Molhoek, van Dijk et al. 2011). PAMs têm sido identificados em diversos anfíbios, como as salamandras e tritões da Ordem Urodela, em especial obtidos a partir da secreção excretada na pele (Pereira, Crother et al. 2018).

Em decorrência da baixa capacidade dos microorganismos realizarem mutações que alterem os componentes de sua membrana e por essa estrutura da célula ser o principal alvo dos PAMs, além da variabilidade de epítomos presentes nos PAMs, o que dificulta seu reconhecimento, o desenvolvimento de resistência dos microorganismos a essas moléculas é considerado atípico (Yeaman e Yount 2003, Shen, He et al. 2018). Diante disso, os PAMs têm sido vistos como uma alternativa para o desenvolvimento de novas fármacos (Nicola, Albuquerque et al. 2019).

Vários trabalhos já relataram a ação de PAMs em evitar a internalização de vírus nas células ligando a receptores celulares usados como ponto de

ancoragem inicial (Jenssen e Hancock, 2009; Currie et al., 2013). Um grupo de PAMs bastante estudados quanto a sua ação antiviral é o das defensinas. De modo geral, são peptídeos pequenos com ação contra uma ampla gama de microrganismos podendo ser classificados em duas subfamílias,  $\alpha$ -defensinas,  $\beta$ -defensinas e  $\theta$ -defensinas (Oppenheim et al., 2003; Park et al., 2018). Já foi relatado que esse peptídeo consegue se ligar a receptores de membrana usados por vírus, como é o caso do sulfato de heparana que são receptores primários do herpes vírus (Hazrati et al., 2006). Sabe-se também que esses peptídeos se ligam a receptores CD4 que são importantes na internalização celular por HIV (Demirkhanyan et al., 2012).

A Lactoferrina (LF) é um PAM com um amplo espectro de atividade antimicrobiana e de acordo com (Elnagdy e Alkhazindar, 2020), esse peptídeo pode ser considerado um agente terapêutico contra COVID-19 em potencial. Foi demonstrado que a LF impede a infecção por pseudovírus SARS bloqueando proteoglicanos de sulfato de heparano na membrana que funcionam como pontos de ancoragem fracos para o vírus sugerindo, assim, que esse peptídeo pode desempenhar um papel importante em uma infecção por SARS-Cov (Lang et al., 2011).

### **4.3. Defensinas**

As defensinas constituem uma classe de pequenos peptídeos catiônicos, ricos em folhas beta e estruturados por três pontes dissulfeto. Constituem um componente antigo altamente conservada do sistema imune inato (Lehrer e Lu 2012). Em animais vertebrados é possível identificar três tipos de defensinas, que se diferenciam pelo local de ocorrência dessas pontes:  $\alpha$ -defensinas,  $\beta$ -defensinas e  $\theta$ -defensinas (Teclé, Tripathi et al. 2010). Das quais as  $\beta$ -defensinas representam o maior grupo de moléculas identificadas nos vertebrados e as do tipo  $\theta$  estão restritas a macacos do Velho Mundo (Família Cercopithecidae) (Diamond, Kaiser et al. 2000).

A maioria das defensas apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro, bem como funções imunomoduladoras (Dale, Kimball et al. 2001). Em humanos, os neutrófilos e as células de Paneth (células do intestino delgado) são responsáveis pela secreção das  $\alpha$ -defensas e  $\beta$ -defensas que são expressas por células epiteliais de todo o corpo, em resposta a patógenos (Gehrke, Lausmann et al. 2018, Koeninger, Armbruster et al. 2020).

Essas moléculas são liberadas em locais de infecção, onde promovem o recrutamento de células do sistema imune, assim acarretando em uma ação ampliada da resposta imunológica (Droin, Hendra et al. 2009). Além disso, elas se ligam a componentes de carga negativa da membrana bacteriana, como lipopolissacarídeos, ácido teicóico, e fosfatidilglicerol das bactérias (Kerenga, McKenna et al. 2019). Uma vez atrelados à membrana podem causar sua ruptura ou despolarização, que provoca interrupção da síntese de DNA, RNA e proteína impedindo a respiração, levando à morte desses microorganismos (Wong, Xia et al. 2007). Esses peptídeos também podem se organizar em redes fibrosas emaranhadas e aprisionar patógenos microbianos, bloqueando a invasão (Fan, Li et al. 2020).

A ação antiviral das defensas também é permitida pela sua capacidade de ligar-se a partículas virais: interagem com as bicamadas lipídicas, devido a presença de fosfolipídios carregados negativamente, podem fazer ligação com glicoproteínas e glicolipídeos e também são capazes de se envolver em interações proteína-proteína ou proteína-DNA (Wilson, Wiens et al. 2013). Essas interações são permitidas pois as defensas são moléculas catiônicas e anfipáticas, devido a sua oligomerização, em especial para  $\alpha$ -defensas, e a estabilidade conformacional promovida pelas ligações dissulfeto de suas estruturas (Smith, Silvestry et al. 2010).

Níveis elevados de defensas são detectados em diversas doenças pulmonares inflamatórias, incluindo síndrome do desconforto respiratório agudo, fibrose cística, bronquiolite, fibrose pulmonar idiopática e em doenças infecciosas (van Wetering, Sterk et al. 1999). O que corrobora o papel dessas

moléculas na defesa contra essas doenças. Diversos trabalhos têm demonstrado PAMs como alternativa terapêutica promissora para a doença COVID-19, incluindo as defensinas (Ferreira, Santos et al. 2021).

#### **4.4. Doença COVID-19**

Recentemente, a doença do coronavírus 2019 (COVID-19), de características principalmente respiratórias, surgiu na China e tornou-se pandêmica em 2020 causando um grave problema de saúde global com consequências devastadoras (Sawadogo, Tsegaye et al. 2022). Essa pandemia acarretou em 6.755.786 mortes até janeiro de 2023 (Worldometer, 2023). O agente etiológico da COVID-19 é o síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), um vírus de RNA de fita simples que pertence ao gênero Coronavírus e família Coronaviridae (Filchakova, Dossym et al. 2022, Montani, Savale et al. 2022).

A transmissão da COVID-19 ocorre por contato com um indivíduo infectado que produz gotículas respiratórias ao tossir ou espirrar. Essa doença pode variar entre um quadro leve até casos mais graves (Salian, Wright et al. 2021). Os sintomas geralmente envolvem febre, tosse não produtiva, mialgia, falta de ar, entre outros (Nehme, Braillard et al. 2021). Nos casos mais graves de infecção pode ocorrer pneumonia, síndrome da pneumonia aguda grave, insuficiência renal e morte (Freitas, Napimoga et al. 2020). Alguns fatores estão associados ao prognóstico ruim dessa doença como a idade avançada, sexo masculino e comorbidades como diabetes, hipertensão, doença renal crônica, doença respiratória crônica e doença cardiovascular (Sepandi, Taghdir et al. 2020).

O SARS-CoV-2 contém proteínas estruturais semelhantes a outros coronavírus: as proteínas S (pico), E (envelope), (membrana) e N (nucleocapsídeo). A proteína S é responsável pela ligação e entrada do SARS-CoV-2 ao receptor da célula do hospedeiro, a enzima conversora de

angiotensina 2 (ECA2) expressa nas células epiteliais alveolares tipo II e também nos tecidos extrapulmonares, como coração, rim, endotélio e intestino. Estudos demonstraram que a proteína spike do SARS-Cov-2 apresenta grande afinidade a o receptor celular ECA-2. Após a internalização nas células do hospedeiro, os antígenos virais são apresentados por meio de células apresentadoras de antígenos (APCs) para linfócitos T citotóxicos, desencadeando uma resposta inflamatória do organismo (Jackson, Farzan et al. 2022).

**5. CAPÍTULO 2 – Artigo “O Arsenal de Moléculas Bioativas na Secreção da Pele de Anfíbios Urodelos” publicado no periódico *Frontiers in Pharmacology*. Fator de impacto: 5,988. ISSN: 1663-9812. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.810821>**

**5.1. Resumo**

Anfíbios da Ordem Urodela (~768 spp.), salamandras e tritões, são uma rica fonte de moléculas com propriedades bioativas, especialmente aquelas isoladas de suas secreções cutâneas. Estes incluem atributos farmacológicos, como atividades antimicrobianas, antioxidantes, vasoativas, modulação do sistema imunológico e cicatrização de feridas dérmicas. Considerando a alta demanda por novos compostos para guiar a descoberta de novos fármacos para o tratamento de doenças convencionais e novas, esta revisão resume as características de moléculas identificadas na pele de anfíbios urodelos. Descrevemos peptídeos e alcaloides derivados de urodelos, com ênfase em suas atividades biológicas, que podem ser considerados novos promissores para a indústria farmacêutica. Embora muito mais atenção tenha sido dada aos anuros, as moléculas bioativas produzidas pelos urodelos têm potencial para serem utilizadas para fins biotecnológicos e se apresentam como alternativas viáveis para o desenvolvimento de agentes terapêuticos.

**5.2. Introdução**

A pele dos anfíbios exerce e apresenta um amplo espectro de funções de grande importância para sua homeostase e interação com o ambiente. Diferentes glândulas multicelulares da pele desses animais produzem compostos que estão envolvidos em seus processos vitais e mecanismos de defesa (Clarke 1997, Heiss, Natchev et al. 2009).

As glândulas mucosas produzem uma película de muco escorregadio, composta basicamente por mucopolissacarídeos e mucoproteoglicanos, que minimizam o atrito subaquático e também tornam o animal escorregadio auxiliando na proteção contra predadores. Esse muco também contribui para a prevenção da perda de água e a manutenção de uma superfície úmida para a realização de troca de gases pela pele quando o animal sai da água. As glândulas granulares, classificadas em diferentes tipos de acordo com suas características histológicas, são responsáveis pela síntese de compostos, como aminas, peptídeos e alcalóides, que participam de vários mecanismos de defesa contra potenciais agressores, desde grandes predadores a microorganismos patogênicos (Bucciarelli, Green et al. 2016, Demori, Rashed et al. 2019). No primeiro caso, os compostos podem irritar as mucosas, causar sensação desagradável (por exemplo, dor ou desconforto), ou ainda ser altamente tóxicos e letais para seus agressores. No segundo caso, substâncias antimicrobianas, em associação com a microbiota comensal, previnem a colonização ou infecção por fungos, bactérias e vírus (Brunetti, Bunk et al. 2021).

As secreções cutâneas de anfíbios têm sido historicamente utilizadas como drogas etnofarmacêuticas em diversas culturas. Diversas pesquisas sobre esse tópico foram acumuladas ao longo dos anos e muitas das moléculas secretadas por anfíbios foram isoladas e caracterizadas até o momento. Verificou-se que esses compostos influenciam diferentes processos nos sistemas vivos, atuando, por exemplo, como compostos miotrópicos, imunomoduladores, antibióticos, anti-inflamatórios e antioxidantes. Por esta razão, a pele dos anfíbios tem sido reconhecida como um depósito de moléculas bioativas com potencial farmacológico. Nesse contexto, "bioatividade" refere-se à capacidade de uma molécula de exercer um determinado efeito em um organismo que pode ser explorado para aplicações biotecnológicas (por exemplo, indústrias alimentícias ou farmacêuticas), independentemente de sua função original (evolutiva) em sua fonte. Moléculas bioativas derivadas de anfíbios atualmente se apresentam

como possíveis substitutos para drogas convencionais ou como drogas líderes para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. Entre as ordens de anfíbios, muito mais atenção tem sido dada aos anuros do que aos cecílias e urodelos na pesquisa de moléculas bioativas.

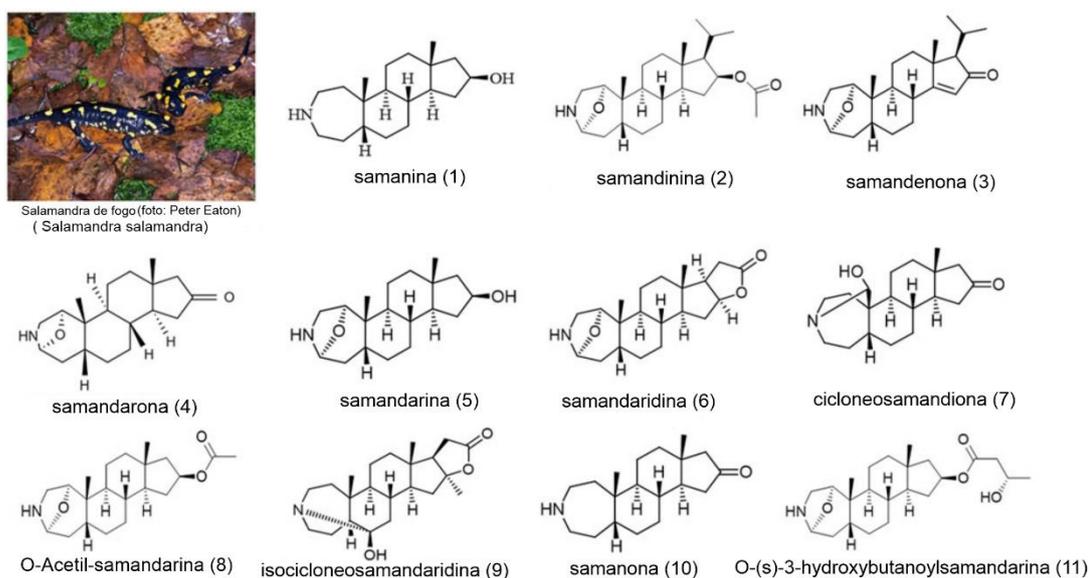
A ordem Urodela compreende as salamandras e tritões que atualmente estão distribuídas na América do Norte e Central, Europa, Ásia e Norte da África, com algumas espécies ocorrendo na América do Sul (Baitchman e Herman 2015). A ordem é dividida nas subordens *Salamandroidea* e *Cryptobranchoidea* (Anderson 2012, Jia e Gao 2016). Assim como os anuros, as moléculas bioativas produzidas pelos urodelos têm potencial para serem utilizadas para fins biotecnológicos, o que torna esse grupo de anfíbios uma alternativa promissora para o desenvolvimento de produtos com aplicação na saúde humana (Afolabi, Saeed et al. 2018). Nesta revisão, apresentamos uma breve avaliação das moléculas isoladas da pele de anfíbios urodelos e uma visão geral de suas atividades biológicas, com ênfase em peptídeos e alcaloides.

### **5.3. Alcaloides**

Alcaloides foram isolados de organismos diversos filogeneticamente, incluindo microrganismos (Casciaro, Calcaterra et al. 2019, Zhang, Morris-Natschke et al. 2021), plantas (Lelario, De Maria et al. 2019, Petruczynik, Plech et al. 2019) e animais (Dumbacher, Spande et al. 2000, Jones, Adams et al. 2012, Santos, Melo Coutinho et al. 2012, Saporito, Donnelly et al. 2012, Cushnie, Cushnie et al. 2014, Jeckel, Grant et al. 2015, Ligabue-Braun e Carlini 2015, Knepper, Luddecke et al. 2019). Os alcaloides demonstraram possuir importantes atividades biológicas, como um mecanismo de defesa contra microrganismos e predadores (De Luca e Laflamme 2001, Zhang, Morris-Natschke et al. 2021). Em geral, são derivados de fontes alimentares desses animais (Macfoy, Danosus et al. 2005), mas certos alcaloides, como

os samandarinas das salamandras, são sintetizados a partir do colesterol (Habermehl e Haaf 1968, Daly, Spande et al. 2005).

A busca por alcaloides em anfíbios da ordem Urodela foi iniciada por Zalesky em 1866, que isolou da secreção da salamandra-de-fogo (*Salamandra salamandra*) um alcaloide denominado samandrina. Então, Schöpf e Habermehl descreveram uma série de alcaloides esteroides e elucidaram suas configurações (Weitz e Wolfel 1962, Habermehl 1967, Knepper, Luddecke et al. 2019). Até o momento, os alcaloides caracterizados a partir da secreção cutânea de salamandras de fogo incluem samanina (1), samandinina (2), samandenona (3), samandarona (4), samandrina (5), samandaridina (6), cicloneosamandiona (7), O-Acetil-samandrina (8) e isocicloneosamandaridina (9) (Habermehl 1964, Habermehl 1967, Habermehl 1971, Daly, Spande et al. 2005), samanona (10) e O-(S)-3-hydroxybutanoylsamandrina (11) (Knepper, Luddecke et al. 2019) – Figura 2.



**Figura 2 - Alcaloides identificados na secreção cutânea da salamandra-de-fogo (*Salamandra salamandra*).**

(1): (Habermehl 1967, Habermehl e Haaf 1968, Habermehl e Preusser 1969, Habermehl 1971); (2): (Habermehl e Vogel 1969); (3, 4, 5, 6 e 7): (Habermehl 1964, Habermehl 1967, Habermehl e Haaf 1968, Habermehl e Preusser 1969,

Habermehl 1971); (8): (Habermehl 1964); (9): (Daly, Spande et al. 2005); (10, 11): (Knepper, Luddecke et al. 2019).

Um estudo de toxinas usando cromatografia gasosa/espectrometria de massa confirmou a presença de alcaloides esteroides samandarina e/ou samandarona em todas as espécies de Salamandra, bem como em representantes do grupo *Lycia salamandra*. Outros salamandridos, como *Calotriton*, *Euproctus*, *Lissotriton* e *Triturus*, também apresentam baixas concentrações de samandarona (Vences, Sanchez et al.), 2014 o que evidencia a disseminação de alcaloides na secreção cutânea desse grupo de animais.

A resistência aos antibióticos tornou-se uma das principais preocupações dos sistemas de saúde globais e o surgimento mundial de resistência microbiana aos antibióticos disponíveis levou a uma busca exaustiva por novas moléculas com propriedades antimicrobianas, sendo as de urodelos alternativas promissoras. Os alcaloides da secreção da *S. salamandra* foram capazes de inibir o crescimento de fungos (*Geotrichum candidum*) e bactérias (*Bacillus subtilis*) (Habermehl e Preusser 1969).

A samandarona inibiu completamente o crescimento de fungos (*Phycomyces blakesleeanus*) em uma concentração inibitória mínima de  $3 \times 10^{-6}$  M. A samandarona e a salamandarina de *Salamandra maculosa* inibiram o crescimento de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum candidum* e *Trichoderma viride* em testes de difusão em ágar. A samandarona apresentou as zonas de inibição mais amplas para todas as cepas e também inibiu o crescimento de *Penicillium expansum*. Samandarona, samandarina e samandaridina inibiram completamente o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em uma concentração inibitória mínima de  $1,5 \times 10^{-6}$  M (Preusser, Habermehl et al. 1975).

Apesar do bom desempenho dos alcaloides como antibióticos contra uma variedade de microrganismos, a toxicidade em grandes grupos de vertebrados

também foi documentada, desestimulando seu uso farmacológico (von Byern, Mebs et al. 2017). Além disso, os alcaloides dos anfíbios urodelos são conhecidos por serem neurotoxinas para os vertebrados (Phisalix 1900, Mebs e Pogoda 2005, Erjavec, Lukanc et al. 2017, Preißler, Gippner et al. 2019).

#### **5.4. Peptídeos**

Os peptídeos compõem outro grupo de moléculas com atividade antibiótica produzidas pela pele de salamandras e tritões, mas com suposta (e, em alguns casos, comprovada) baixa toxicidade (Peters, Shirliff et al. 2010). Tais como os peptídeos antimicrobianos (PAMs), que são encontrados em diversas espécies (Jenssen, Hamill et al. 2006). Em geral, os PAMs apresentam entre 12 e 100 resíduos de aminoácidos, são catiônicos, anfipáticos e apresentam uma variedade de estruturas secundárias típicas, como  $\alpha$ -hélices,  $\beta$ -folhas e alças estendidas e flexíveis (Nguyen, Haney et al. 2011, Gao, Wu et al. 2017).

O desenvolvimento de resistência por microrganismos aos PAMs é considerado relativamente improvável, principalmente porque eles atingem diretamente a membrana celular. Ademais, eles têm uma estrutura pouco mutável e apresentam uma ampla gama de epítomos, o que dificulta seu reconhecimento (Yeaman and Yount 2003, Shen, He et al. 2018). Portanto, os PAMs têm sido considerados como candidatos alternativos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos isoladamente (Nicola, Albuquerque et al. 2019) ou em combinação com antibióticos convencionais (Choi e Lee 2012, Nuding, Frasch et al. 2014).

Em anfíbios da ordem Urodela, peptídeos com potencial atividade biológica foram isolados principalmente da secreção da pele, mas também de diferentes partes dos animais (Tabela 1) (Pei, Feng et al.). O peptídeo Andricina 01 foi isolado da secreção cutânea da salamandra gigante chinesa *Andrias davidianus*. Andricina 01 apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, porém não apresentou atividade

citotóxica para hepatócitos humanos ou células renais, e nenhuma atividade hemolítica foi observada (Pei e Jiang 2017).

O peptídeo F15 de 13,75 kDa foi isolado da pele da salamandra de dorso vermelho *Plethodon cinereus*. Em um ensaio de contagem de colônias, F15 reduziu *Staphylococcus aureus* em 90% em 2 horas, assim mostra forte atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (Fredericks e Dankert 2000).

Outro trabalho identificou o CFBD-1 na pele do tritão *Cynops fudingens*, um peptídeo da classe  $\beta$ -defensina, composto por 41 aminoácidos, com massa molecular de 4251,37 Da. Essa defensina mostrou-se ativa principalmente contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, de forma semelhante ao peptídeo F15 descrito anteriormente, com uma concentração inibitória mínima (MIC) de 65  $\mu\text{g/mL}$  (Meng, Yang et al. 2013).

Inicialmente, diversos colegas determinaram a atividade antimicrobiana do extrato bruto total ou da fração proteica da secreção cutânea de vários urodelos. Um estudo realizado com a análise do número total de peptídeos isolados da pele de larvas de salamandras e adultos da espécie *Ambystoma tigrinum* revelou atividade antibacteriana contra *Bacillus dendrobatidis*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella* sp. (Sheafor, Davidson et al. 2008).

Estudos com o extrato bruto das secreções cutâneas das espécies *Lissotriton vulgaris* e *Triturus ivanbureschi* mostraram que essas secreções apresentam um total de 18 e 20 frações proteicas, respectivamente. Esses extratos apresentaram atividade antimicrobiana para bactérias, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, e fungos, *Candida albicans*, e atividade hemolítica para hemácias humanas e de coelhos (Mert, Doğancan et al. 2018). Essa atividade antimicrobiana pode ser resultado da ação de peptídeos ativos (Pukala, Bowie et al. 2006). Além disso, eles também mostraram altos efeitos citotóxicos para linhagens de células cancerígenas, com a maior atividade anticancerígena de ambas as amostras de secreção (*L. vulgaris* e *T. ivanbureschi*) sendo para a linha celular de câncer de mama MDA-MB-231

(Mert, Dođancan et al. 2018). Esses achados preliminares destacam a importância de mais pesquisas sobre as secreções cutâneas desses animais, para caracterizar as moléculas responsáveis pelas atividades antibióticas.

Além dos peptídeos antimicrobianos, outros peptídeos isolados de urodélos também podem apresentar outras propriedades farmacológicas, como atividades antioxidantes e imunomoduladoras (Coorens, Scheenstra et al. 2017, Holthausen, Lee et al. 2017, Lee, Harris et al. 2019, Woodhams, Rollins-Smith et al. 2020).

Espécies reativas de oxigênio são necessárias para os processos bioquímicos naturais das células (Litescu, Eremia et al. 2011). Porém, em quantidades excessivas, quando ocorre o estresse oxidativo, podem danificar algumas estruturas, como DNA, proteínas e lipídios (Duarte e Lunec 2005). Este processo está relacionado a doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurodegenerativas, câncer, doenças inflamatórias crônicas (Llesuy, Evelson et al. 2001).

Os antioxidantes químicos sintéticos geralmente apresentam baixa estabilidade, efeitos citotóxicos e carcinogênicos, o que levou à busca por antioxidantes naturais com baixa citotoxicidade (Gürlek, Yarkent et al. 2020). A salamandrina-I é uma molécula recentemente descrita que apresentou relevante atividade antioxidante. Essa molécula foi o primeiro peptídeo identificado na pele da salamandra-de-fogo europeia (*Salamandra salamandra*). O peptídeo neutraliza os radicais livres DPPH e ABTS em concentrações não tóxicas para células da microglia e hemácias humanas (Placido, Bueno et al. 2020). A descoberta desse peptídeo abre caminho para uma investigação mais aprofundada de outros peptídeos antioxidantes na secreção cutânea de urodélos.

Atualmente a medicação disponível para cicatrização de feridas é cara, tem baixa atividade e produz cicatrizes hiperplásicas, o que ressalta a necessidade da busca por novos medicamentos (Hardwicke, Schmaljohann et al. 2008). Peptídeos de anfíbios têm mostrado potencial alternativa

terapêutica (Cao, Wang et al. 2018). O peptídeo tilotoína identificado na pele da salamandra *Tylototriton verrucosus* mostrou-se eficaz em ensaios com feridas dérmicas em camundongos. Ele mostrou uma capacidade de cicatrização de feridas semelhante ao fator de crescimento epidérmico. O peptídeo demonstrou promover maior motilidade e proliferação de queratinócitos, células endoteliais vasculares e fibroblastos, resultando em reepitelização acelerada e formação de tecido de granulação no local da ferida. A tilotoína promove a liberação do Fator de transformação do crescimento-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) e da Interleucina 6 (IL-6), que são essenciais na resposta de cicatrização de feridas (Mu, Tang et al. 2014).

Em geral, devido às suas propriedades bioquímicas e terapêuticas distintas, os peptídeos estão em desenvolvimento para interromper as interações proteína-proteína e direcionar ou inibir moléculas intracelulares, como receptores proteicos (Lee, Harris et al. 2019). Além disso, inúmeras moléculas peptídicas foram descritas para interagir com as membranas microbianas por meio de diferentes mecanismos, desestabilizando-as, o que torna os peptídeos uma classe especial de compostos farmacêuticos (Vineeth Kumar e Sanil 2017).

O campo da descoberta de medicamentos peptídicos evoluiu do design racional auxiliado por computador e da química combinatória para a descoberta de novas moléculas como trampolins para o design de novos medicamentos, envolvendo grupos acadêmicos e empresas privadas (Al Shaer, Al Musaimi et al. 2020, Sampaio de Oliveira, Leite et al. 2020). Com alto dinamismo, vários medicamentos peptídicos são aprovados para uso clínico nos Estados Unidos, Europa e Japão, e cerca de 400 peptídeos já estão em desenvolvimento clínico (Lee, Harris et al. 2019). Portanto, os peptídeos de urodelos merecem mais atenção para esclarecer suas características estruturais e mecanismo de ação.

**Tabela 1- Estrutura primária de peptídeos isolados de anfíbios urodelos.**

Fonte	Nome	Estrutura	Massa	Atividade	Referência
<i>Andrias davidianus</i>	Andricina 01	AIGHCLGATL	955,1 Da	Antibacteriana	(Pei and Jiang 2017)
<i>Andrias davidianus</i>	Andricina B	GLTRLPSVIK	-	Antibacteriana Antifúngica	(Pei, Feng et al.)
<i>Plethodon cinereus</i>	F15	-	13,75 kDa	Antibacteriana	(Frederick e Dankert 2000)
<i>Cynops fudingens</i>	CFBD-1	FAVWGCADYRGYCR ACFAFEYSLGPKGCTE GYVCCVPNTF	4251,37 Da	Antibacteriana	(Meng, Yang et al. 2013)
<i>Salamandra salamandra</i>	Salamandrina-l	FAVWGCADYRGY-NH2	1406,6 Da	Antioxidante	(Placido, Bueno et al. 2020)
<i>Cynops pyrrhogaster</i>	NVRP-1	HSDAVFTDNYSRLLGKT ALKNYLDGALKKE	3000 Da	Indução da contração muscular	(Teranishi, Muneoka et al. 2004)
	NVRP-2	HSDAVFTDNYSRLLAKT ALKNYLDGALKKE			
	NVRP-3	HSDAVFTDNYSRLLGKI ALKNYLDEALKKE			
	NVRP-4	HSDAVFTDNYSRLLGKT ALKNYLDSALKKE			
<i>Tylototriton verrucosus</i>	Tylotoína	KCVRQNNKRVCK	1473,80 Da	Cicatrização de feridas	(Mu, Tang et al. 2014)

## 5.5. Outras moléculas

Além dos alcaloides e peptídeos, outros compostos foram descritos em salamandras e tritões. O CCK-TV é uma molécula da classe das colecistocininas, um hormônio gastrointestinal, identificado a partir da pele da salamandra *Tylotriton verrucosus*. CCK-TV mostrou potencial para induzir contração muscular estriado liso isolado da vesícula biliar suína em concentrações que variam de  $5,0 \times 10^{-11}$  a  $2,0 \times 10^{-6}$  (Jiang et al., 2015).

A análise da secreção dérmica da salamandra *Plethodon cinereus*, mostra a presença de três ácidos graxos com atividade antibacteriana. O teste de inibição mostrou que o ácido miristoleico, o ácido linolênico e o ácido palmitoleico inibiram o crescimento de *Bacillus cereus* em 24 horas, nas concentrações de 27, 7 e 6,9  $\mu\text{g}$ , respectivamente, com halos de inibição em torno de 8,0 a 6,5 mm de diâmetro (Rickrode, Mueller et al. 1986).

Outra classe de moléculas bioativas encontradas na pele dos anfíbios são as aminas biogênicas. Aminas, como putrescina, histamina, triptamina e feniletilamina, são bases de baixo peso molecular encontradas em organismos vivos ou como produtos de decomposição do processo de fermentação (Erspamer 1971, Jovaisiene, Bakutis et al. 2017). Estudos relataram a presença de altas concentrações de triptamina e serotonina na pele de espécies de salamandras (Erspamer 1971, Rickrode, Mueller et al. 1986, Luddecke, Schulz et al. 2018).

## 5.6. Conclusão

Compreender a biodiversidade da Terra é importante para descrever a diversidade genética e prospecção de moléculas bioativas de diversos organismos. A secreção cutânea de anfíbios da ordem Urodela é uma fonte importante de alcaloides, peptídeos, aminas biogênicas e outros compostos com diversas estruturas e funções considerados como compostos bioativos.

Os estudos compilados nesta revisão apontam que os alcaloides esteroides e peptídeos das secreções da pele de animais da Urodela são considerados a primeira linha de defesa contra patógenos, porém esses estudos apresentaram limitações, como dificuldades extração dos compostos ou na síntese por métodos artificiais. O que acarretou em um estudo restrito da capacidade total dessas moléculas como antimicrobianos, assim a maioria das pesquisas descritas ainda são preliminares.

No caso de peptídeos, a disponibilidade de metodologia sintética forneceu acesso para explorar as estruturas de análogos, enquanto no caso de moléculas complexas, a síntese parcial ou total pode ser mais desafiadora, especialmente quando apenas compostos putativos são inferidos a partir dos dados de espectrometria de massa e os números de centros quirais e o número de diastereoisômeros possíveis tornam a tarefa ainda mais complexa.

Apesar do conhecimento considerável sobre alcaloides de urodelos, estudos de secreções em termos de componentes antimicrobianos ainda não identificados são necessários para melhorar a compreensão atual do complexo sistema de toxinas de sua pele (Luddecke, Schulz et al. 2018). Moléculas derivadas de anfíbios urodelos são alternativas terapêuticas pouco exploradas aos antibióticos convencionais usados para tratar infecções fúngicas e bacterianas.

**6. CAPÍTULO 3 – Antiviral activity against SARS-CoV-2 of a novel defensin peptide present in the transcriptome of the fire salamander (*Salamandra salamandra*) Artigo em preparação para a revista “Pharmaceuticals” (Journal Rank: JCR - Q1 (Pharmacology & Pharmacy) / CiteScore - Q2 (Pharmaceutical Science)).**

**6.1. Introdução**

Em dezembro de 2019, um novo coronavírus, o síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), causou uma série de doenças respiratórias atípicas agudas em Wuhan, na China. O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples que pertence ao gênero Coronavírus e família Coronaviridae (Savale et al. 2022). Essa doença viral foi denominada doença coronavírus 19 (COVID-19), tornou-se pandêmica em março de 2020 (Zheng, Shao et al. 2022) e acarretou em 6.755.786 mortes até janeiro de 2023 (Worldometer, 2023). O que alertou a comunidade científica para a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas e profiláticas para doenças virais.

As defensinas compreendem um grupo de peptídeos antimicrobianos conhecido por sua ação antiviral. De modo geral, são peptídeos pequenos com ação contra uma ampla gama de microrganismos podendo ser classificados em subfamílias,  $\alpha$ -defensinas,  $\beta$ -defensinas e  $\theta$ -defensinas, de acordo com o local de ocorrência das pontes dissulfeto (Oppenheim et al., 2003; Park et al., 2018). Essas moléculas conseguem evitar a internalização dos vírus às células hospedeiras ligando-se a receptores de membrana celular utilizados por esses microrganismos durante esse processo. A enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) está presente na membrana de alguns tipos celulares podendo ser encontrado amplamente no coração, rins e alvéolos pulmonares (Donoghue et al., 2000; Reynolds et al., 2020). Células

que expressam ECA2 são mais susceptíveis a invasão por SARS-Cov-2, já que essa enzima atua como receptor de ligação dando início a invasão celular pelo vírus (Li et al., 2020).

A salamandra-de-fogo (*Salamandra salamandra*) é um anfíbio da ordem Urodela, com maior ocorrência nas regiões sul e central da Europa (Manenti, Ficetola et al. 2009). Na secreção dérmica desses animais são encontradas moléculas como alcaloides, aminas, esteroides e peptídeos, que são responsáveis principalmente pela defesa contra microorganismos patógenos (Luddecke, Schulz et al. 2018, Placido, Bueno et al. 2020). Uma pesquisa identificou na pele de outro urodelo, o tritão *Cynops fudingens*, um peptídeo da classe defensinas (Meng, Yang et al. 2013).

Neste estudo, avaliamos o transcriptoma da *Salamandra salamandra* para a existência de peptídeos antimicrobianos. Um peptídeo antimicrobiano da classe das defensinas foi identificado, suas interações com enzima conversora de angiotensina humana 2 foram avaliadas e um teste de infecção por SARS-CoV-2 baseado em células Vero-E6 foi realizado.

## **6.2. Materiais e métodos**

### **6.2.1. Identificação do peptídeo**

Para a identificação do peptídeo um conjunto de dados de amostra de RNA-Seq da *Salamandra salamandra* foi obtido do arquivo SRA (*Sequence Read Archive*) de número de acesso SRR11118085. O controle de qualidade dos dados brutos e o corte dos adaptadores foram feitos respectivamente pelos programas FastQC (v0.11.4) (Andrews, S. 2010) e Trim Galore (v0.4.1) usando a opção de executar Cutadapt (v1.8.3) (Martin 2011) com valores padrão. Em seguida, as leituras foram montadas usando rnaSPAdes (v3.14.0) (Bushmanova, Antipov et al. 2019) sem o modo de correção de erro de leitura (parâmetro --only-assembler). Finalmente, makeblastdb (v2.6.0) (Camacho, Coulouris et al. 2009) foi usado para criar um banco de dados de transcritos

montados seguido por um alinhamento por tblastn local tomando a sequência da defensina CFBD-1 de *Cynops fudingensis* como consulta (query). As melhores transcrições de acertos retornadas como resultado foram usadas para análise de tradução.

Para tradução dos transcritos foi usado o Translate tool (Gasteiger, Gattiker et al. 2003) que gerou as sequências de aminoácidos que foram alinhados por blastp contra o banco de proteínas do NCBI para buscar identidade com a sequência de defensina CFBD-1 de *Cynops fudingensis*. A montagem do transcriptoma gerou 589690 transcritos. A análise por tblastn produziu um transcrito que foi utilizado para tradução e busca de identidade por blastn com banco de dados do NCBI.

#### 6.2.2. Síntese do peptídeo

A síntese do peptídeo foi realizada de acordo com a metodologia da técnica de Síntese de Peptídeo em Fase Sólida (Chan e White 2000). Para isso utilizamos a resina Rink Amide e aminoácidos contendo grupo protetor 9-fluorenilmetil carbonila (Fmoc). Primeiro, inchou-se a resina adicionando-se diclorometano (DCM) e deixando-se sob agitação. Em seguida, foi realizado o procedimento de desproteção do grupo protetor Fmoc (também contido na resina), utilizando-se uma solução de 4-Metil-Piperidina a 20% em DMF (dimetilformamida).

Após isso, para a confirmação da desproteção foi realizado o teste de Kaizer que indica se o grupo amina está livre para as reações de acoplamento formando uma cor escura. Para isso, retirou-se uma parcela pequena da amostra e a ela foi adicionado uma solução composta por 5% de ninidrina em etanol (m/v), 80% de fenol em etanol (m/v) e KCN (Cianeto de potássio) em piridina (2 mL 0,001 M KCN em 98 mL de piridina). A mistura foi aquecida a 120 °C. Ao final observou-se a formação ou não da coloração escura.

O terceiro passo do procedimento consistiu no acoplamento de cada aminoácido em sequência, de acordo com a estrutura do peptídeo (descrita na seção 6.2 – Figura 4), utilizando-se equivalentes dos amoniácido DIC (diisopropil carbodiimida) OXIMA®. Assim, adicionava-se à resina o aminoácido referente da sequência e DMF (Dimetilformamida), deixava-se sob agitação para ocorrer a reação, lava-se com DCM e DMF e secava-se a mistura através de separação à vácuo. Após isso, para avaliar o sucesso do acoplamento, também realizava-se o teste de Kaizer.

Ao final dos acoplamentos de todos os aminoácidos, foi feita a clivagem da resina ligada aos aminoácidos acoplados, utilizando-se uma solução de clivagem contendo TFA (Ácido trifluoracético)/Tioanisol/Água/Fenol/EDT sendo 82.5:5:5:5:2.5 (V/V). Assim, adicionou-se essa solução à mistura peptídeo-resina e deixou-se sob agitação. Em seguida, removeu-se o TFA através de evaporação com fluxo de Nitrogênio e colocou-se diisopropil éter gelado para a precipitação do peptídeo e solubilização do restante dos reagentes de clivagem e estruturas de proteção de cadeia lateral. Posteriormente, realizou-se uma filtragem para separação da fase sólida e fase etérea. Esta foi descartada. Em seguida, solubilizou-se o peptídeo em água/acetonitrila 1:1 (v/v). O peptídeo solubilizado foi submetido a liofilização.

### 6.2.3. Purificação e Caracterização da estrutura do peptídeo

Após a síntese, foi realizada a purificação da molécula através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – Shimadzu Co). Para isso, o peptídeo bruto foi diluído em uma concentração de 5mg/mL em uma solução de 55% acetonitrila e 45% de água ultrapura. Foi utilizado uma coluna preparativa Phenomenex® Jupiter 10µm C-18 com duas soluções de eluentes, acetonitrila e água ultrapura, ambas com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA). Seguido a purificação, a massa e a estrutura do peptídeo

foram confirmadas por análise em espectrometria de massas do tipo ESI-TOF (Ionização por eletrospray-Tempo de voo).

#### 6.2.4. Ensaios *in silico*: Avaliação das interações entre peptídeo DSS1 e enzima conversora de angiotensina humana 2

A estrutura básica do peptídeo DSS1 foi projetada por meio de modelagem de homologia com o auxílio do MPI Bioinformatics Toolkit (Zimmermann, Stephens et al. 2018, Gabler, Nam et al. 2020) e corrigido via software Pymol (SCHRÖDINGER, L., DELANO W. 2020). Os estados de protonação dos resíduos foram avaliados com auxílio do servidor PDB2PQR (Dolinsky, Nielsen et al. 2004) em pH neutro.

As interações entre peptídeo DSS1 e enzima conversora de angiotensina humana 2 (ECA2-PEP) e peptídeo DSS1 e estrutura de ligação do novo pico de coronavírus (SPIKE-PEP) foram avaliadas via *docking* proteína-peptídeo, com o auxílio do servidor HADDOCK2.4 (van Zundert, Rodrigues et al. 2016, Honorato, Koukos et al. 2021). As estruturas ECA2 e SPIKE foram obtidas dos arquivos Protein Data Bank (6LZG) (Wang, Zhang et al. 2020) e isoladas via software Pymol. Os aminoácidos interfaciais ECA2/SPIKE foram selecionados como resíduos ativos para *docking*.

Simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas usando os complexos de estrutura conformacional obtidos na etapa anterior do *docking* molecular, aqui denominados como: ECA2-PEP-S1 e ECA2-PEP-S2 (complexos correspondentes às duas melhores soluções do *docking* entre os proteína ECA2 e o peptídeo em estudo) e; SPIKE-PEP-S1 e SPIKE-PEP-S2 (complexos correspondentes às duas melhores soluções do *docking* entre a proteína SPIKE e o peptídeo em estudo). Todas as simulações de DM foram realizadas usando o software GROMACS v.2018 (Van Der Spoel, Lindahl et al. 2005). O servidor PDB2PQR (Dolinsky, Nielsen et al. 2004) foi usado para avaliar os estados de protonação dos resíduos de aminoácidos em pH 7,0.

A estrutura dos complexos ECA2-PEP-S1, ECA2-PEP-S2, SPIKE-PEP-S1 e SPIKE-PEP-S2 foram otimizadas energeticamente aplicando descida mais íngreme (SD) e energia baseada em Newton-Raphson de base adotada (ABNR), minimização (500 passos), e então submetido a uma simulação de 100 ps-DM para o equilíbrio de temperatura ( $T = 300$  K) usando o campo de força de Charmm (Vanommeslaeghe, Hatcher et al. 2010) com solvente explícito (TIP3P). Em seguida, foram realizadas simulações de 100 ns-DM sob temperatura ( $T=300$  K) e pressão (1,0 bar) constantes, também aplicando o campo de força de Charmm. A estabilidade dos complexos durante as simulações DM foi avaliada com base nas pontes de hidrogênio entre os ligantes e os receptores. Os parâmetros de corte para determinação das pontes de hidrogênio foram: distância doador-aceptor  $\sim 3,5$  Å e ângulos em torno de  $30^\circ$ .

#### 6.2.5. Ensaio *in vitro* de infecção por SARS-CoV-2 baseado em células Vero-E6

O peptídeo foi diluído para a concentração de 2 mM em DMSO antes de realizar o tratamento das células, diluídos 33,33x em PBS, e 10  $\mu$ L de cada diluição foi transferida para as placas de ensaio, tendo, portanto, um fator de diluição final de 200x. Os compostos foram testados em dose resposta com uma concentração inicial de 10  $\mu$ M. Como controle positivo foi utilizada cloroquina.

Células Vero E6 foram plaqueadas em placas de 384 poços. Após 24 horas, as células receberam os compostos conforme indicado acima e, em seguida, o vírus foi adicionado em uma multiplicidade de ensaio (MOI) de 0,1 partículas virais por célula. A concentração final de DMSO nas placas de ensaio foi 0,5% (v/v). Após 33 horas de ensaio SARS-CoV-2, as placas foram fixadas, a imunofluorescência foi realizada com soro de pacientes de covid-19 foi feita e as imagens foram adquiridas e analisadas pelo equipamento de HCS Operetta.

Os parâmetros medidos em cada um dos poços foram: número total de células e número total de células infectadas. A redução no número de células infectadas indica a porcentagem de atividade antiviral das amostras. A partir dos controles infectado e não infectado, a atividade de cada um dos compostos foi normalizada, assim como a taxa de sobrevivência celular.

### 6.3. Resultados e Discussão

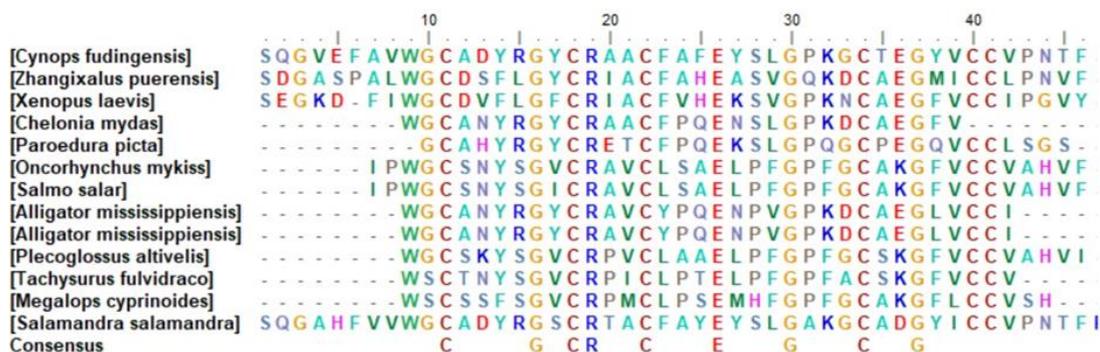
A sequência do transcrito obtido por tblastn gerou a sequência abaixo:

Transcrito de *Salamandra salamandra*

>NODE\_106908\_length\_431\_cov\_6.795812\_g92401\_i0

```
GGCGTGAATTAGCTGAAATCAGAAATTCAAAGTTGTAAAAACAGG
GGCCCCAAAATATGTTTGGCCCGGGCCCCAAAATCCTTAAGATGTC
CCTGACTGGATTACATTTGACGAGAAGCCCGCTTGTTGCCTTTTAACT
ATCGTGTTTCATTAGAAAGCAGAGGATTCGTATCAGCAAAGTTTCTCGT
CTTTTCCTTGATCGCTGGGCCAGATAAATAGATCACATTCACTTGGACTC
CAGCTAGACTCTTCTTCTGTGACTCTTCTTCTGTTACATAAGTCTAAAGG
TGTTTGGCACACAACATATGTAACCGTCTGCACATCCCTTCGCTCCCAA
CGAATATTCATAAGCGAAGCAGGCTGTTTCGGCAGCTTCCTCTGTAATCA
GCGCAGCCCCAGACTACAAAGTGCGCTCCCTGGCTGCCG
```

Esse transcrito teve identidade de 78.72% com a sequência de defensina CFBD-1 de *Cynops fudingensis*. Quando traduzido, o transcrito produziu a sequência 3-'5' Frame 2 - G S Q G A H F V V W G C A D Y R G S C R T A C F A Y E Y S L G A K G C A D G Y I C C V P N T F R L Met Stop. A análise por blastp confirmou a identidade de 78% para defensina de *C. fudingensis*. A Figura 3 mostra o resultado do alinhamento do peptídeo maduro de *S. salamandra* com a defensina de outras espécies com coberturas que varia de 95 a 70%.



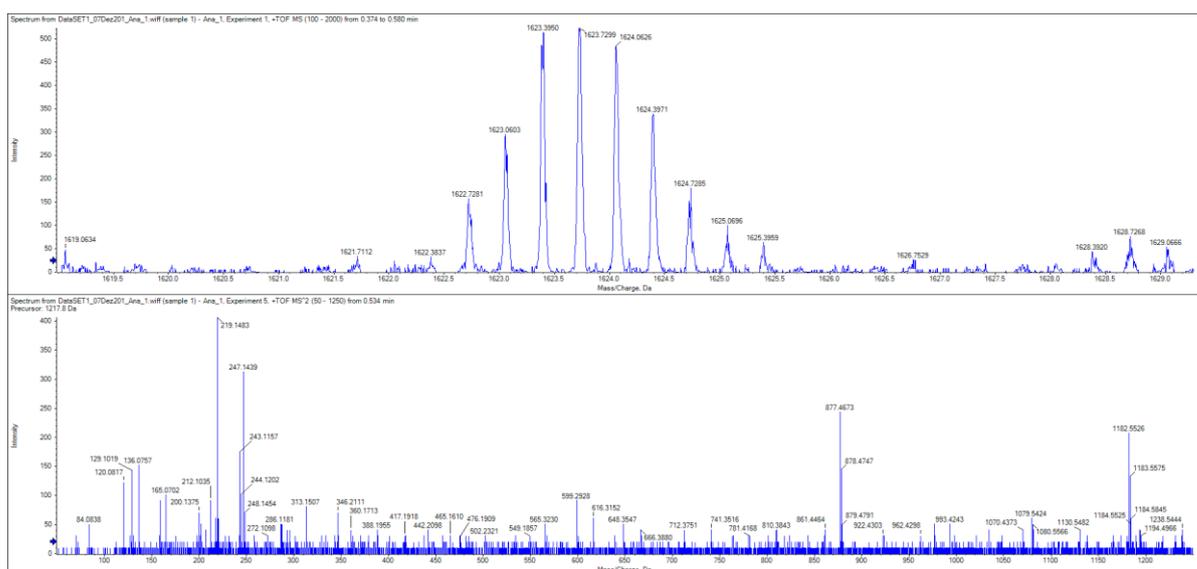
**Figura 3 - Alinhamento múltiplo com os melhores scores de blastp para sequência traduzida que caracteriza o peptídeo maduro de defesa CFBD-1.**

A Figura 4 apresenta a estrutura do peptídeo identificado, o qual foi denominado de defesa SS-1 (DSS-1) e posteriormente sintetizado quimicamente. As defensas são uma classe de peptídeos antimicrobianos, em geral constituídas por 18 a 45 aminoácidos, incluindo seis ou oito resíduos de cisteína conservados que apresentam pontes dissulfeto em sua estrutura (Wong, Xia et al. 2007, Yang, Dong et al. 2012). Peptídeos antimicrobianos de anfíbios contendo segmentos de pontes dissulfeto já foram identificadas anteriormente, no entanto, apenas algumas pertencem à classe das defensas (Li, Xu et al. 2007, Zhang, Zhang et al. 2009). Outra defesa de uma espécie de urodelo, o tritão *Cynops fudingensis*, foi anteriormente identificada por Meng, Yang et al. 2013, denominada de CFBD-1.



**Figura 4 - Estrutura do peptídeo identificado no transcriptoma da Salamandra-de-fogo (*Salamandra salamandra*) – DSS-1.**

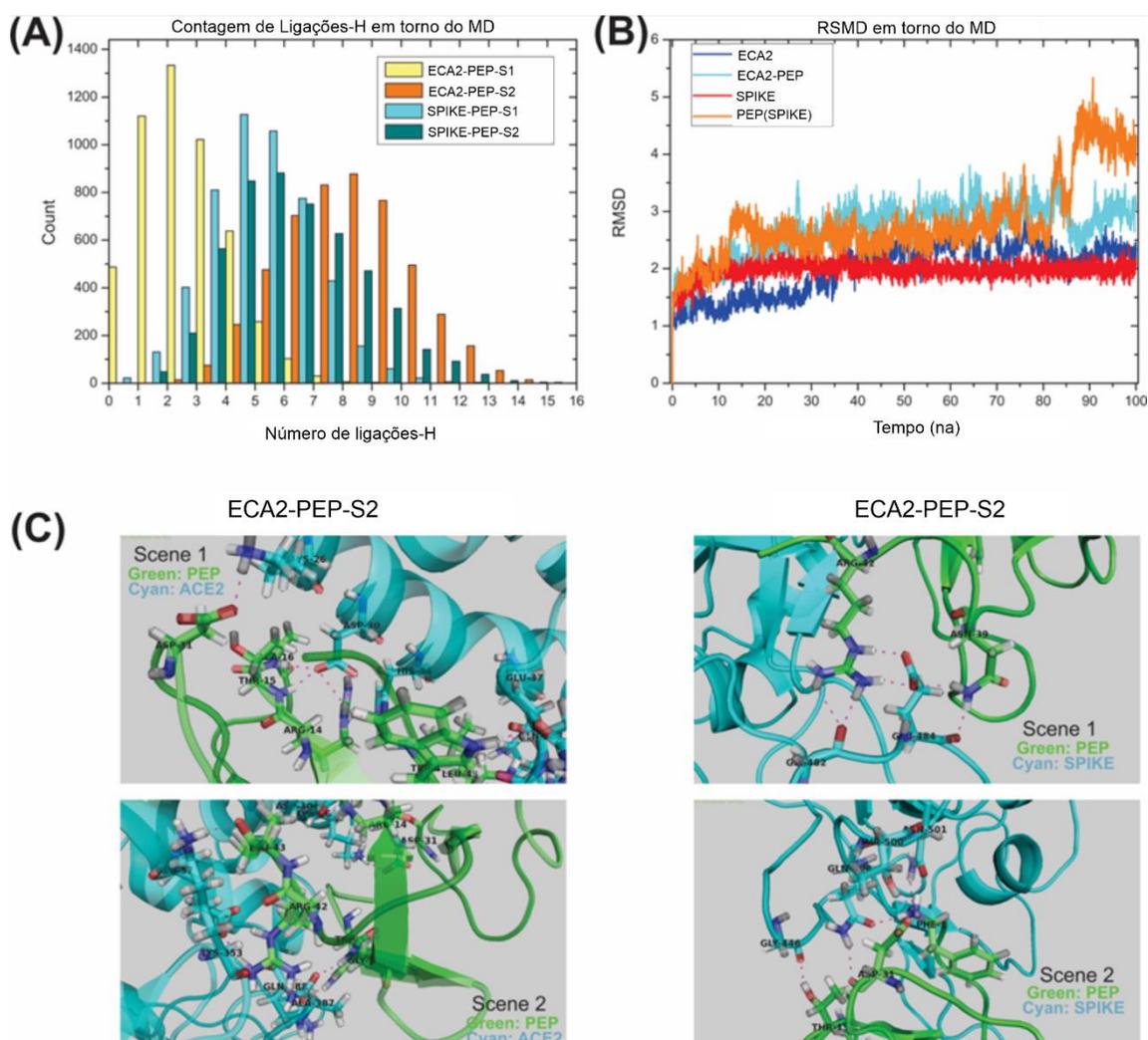
A análise por espectrometria de massas (ESI-TOF) confirmou a estrutura do peptídeo e o sucesso do procedimento de síntese em fase sólida, conforme aponta o espectro na Figura 5.



**Figura 5 - Confirmação por Espectrometria de Massa (ESI-TOF) do peptídeo DSS-1 de acordo com a relação massa/carga.**

As interações proteína-proteína são essencialmente estabilizadas por ligações de hidrogênio (H-ligações) (Nazario de Moraes, Tommasini Grotto et al. 2019). Portanto, a Figura 5A mostra que o número de ligações de H ao longo das simulações DM diferiu significativamente para os complexos. As interações entre as proteínas dos complexos ECA2-PEP-S1 e SPIKE-PEP-S1 apresentaram alta frequência de H-ligações entre 0 e 3, o que torna a interação entre as proteínas do complexo bastante instável. Dessa forma, mesmo essas soluções de *docking* sendo energeticamente viáveis, esses resultados evidenciaram que a formação desses complexos não pode ser promissora.

Por outro lado, os complexos ECA2-PEP-S2 e SPIKE-PEP-S2 apresentaram frequência de ligações de H predominantemente variando entre 4 e 10, o que é relativamente alto, pois o peptídeo DSS1 possui apenas 44 aminoácidos. Esses resultados sugerem que os complexos ECA2-PEP-S2 e SPIKE-PEP-S2 são relativamente estáveis, evidenciando que o peptídeo DSS1 pode interagir tanto com as proteínas SPIKE quanto com as ECA2.



**Figura 6 - (A) Frequência das ligações de H entre as proteínas dos complexos: ECA2-PEP-S1, ECA2-PEP-S2, SPIKE-PEP-S1 e SPIKE-PEP-S2 ao longo das simulações DM. (B) RMSD de simulações DM das duas melhores soluções de ancoragem: ECA2-PEP-S2 e SPIKE-PEP-S2. (C) Ilustração das ligações de H nos complexos ECA2-PEP-S2 e SPIKE-PEP-S2 das estruturas com as ligações de H mais altas durante o DM.**

As ligações de H com ocupação superior a 50% ao longo do DM entre os resíduos dos complexos ECA2-PEP-S2 e SPIKE-PEP-S2 são apresentadas na Tabela 2. Esses são os resíduos mais críticos para a estabilidade dos complexos. A Figura 6B mostra o desvio quadrático médio (RMSD) das posições atômicas das simulações DM. Esses resultados são apresentados independentemente para cada proteína: ECA2, complexo peptídeo com a proteína ECA2 (PEP(ECA2)), SPIKE e complexo peptídeo

com a proteína SPIKE (PEP(SPIKE)). Os resultados do RMSD mostraram poucas mudanças conformacionais nas proteínas ECA2 e SPIKE, mostrando a estabilidade das moléculas ao longo dos 100 ns de simulação.

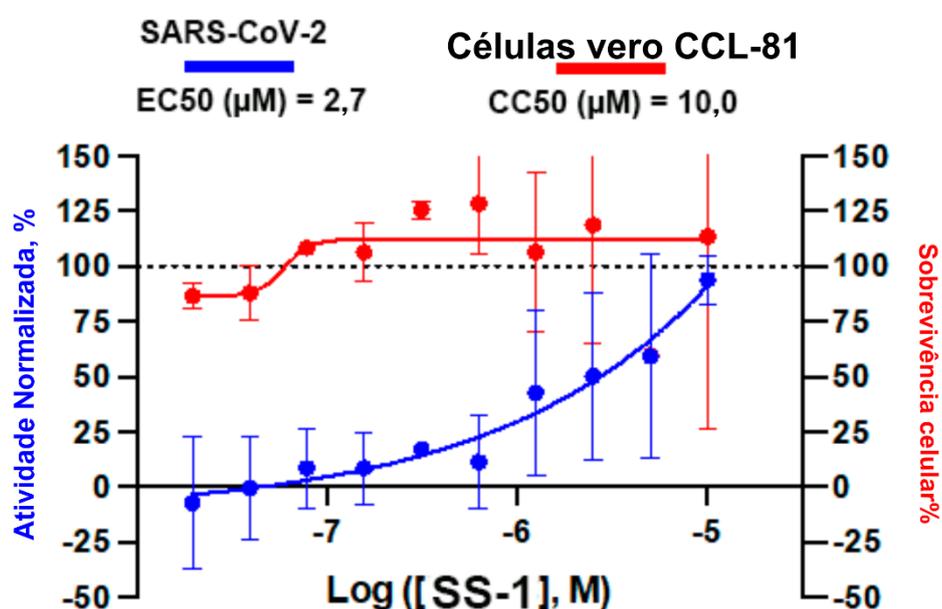
**Tabela 2 - Lista de resíduos dos complexos ECA2-PEP-S2 e SPIKE-PEP-S2 que formam ligações de H com ocupação superior a 10% ao longo da simulação DM.**

ECA2-PEP-S2			SPIKE-PEP-S2		
Doador	Receptor	Ocupação	Doador	Receptor	Ocupação
<b>ALA16-PEP</b>	ASP30-ECA2	93,72%	ARG42-PEP	GLU484-SPIKE	97,74%
<b>THR15-PEP</b>	ASP30-ECA2	93,28%	THR500-SPIKE	ASP31-PEP	30,33%
LYS26-ECA2	ASP31-PEP	65,47%	PHE1-PEP	ASN501-SPIKE	22,97%
<b>GLY-PEP</b>	ALA387-ECA2	64,17%	ARG42-PEP	GLY482-SPIKE	20,09%
<b>ARG42-PEP</b>	GLU37-ECA2	62,71%	PHE1-PEP	GLN498-SPIKE	19,83%
<b>ARG14-PEP</b>	ASP30-ECA2	62,67%	ASN450-SPIKE	MET44-PEP	19,13%
<b>TRP4-PEP</b>	GLN388-ECA2	36,05%	ASN39-PEP	GLU484-SPIKE	17,19%
LYS353-ECA2	LEU43-PEP	27,77%	GLN498-SPIKE	ASP31-PEP	14,91%
<b>TYR33-PEP</b>	ASP30-ECA2	15,81%	ASN501-SPIKE	PHE1-PEP	14,73%
<b>TRP4-PEP</b>	ALA387-ECA2	15,35%	TYR33-PEP	GLN498-SPIKE	12,20%
			THR15-PEP	GLY446-SPIKE	11,32%
			ASN39-PEP	GLU484-SPIKE	10,58%

Apesar de ser uma molécula menor, o peptídeo DSS1 apresentou maiores valores de RMSD em ambas as simulações e, portanto, mudanças

conformacionais mais marcantes durante o DM. Isso ocorreu porque o peptídeo mostrou excelente flexibilidade, sendo o peptídeo recursivamente rearranjado para manter as ligações de hidrogênio. Finalmente, a Figura 6C apresenta as estruturas dos complexos ECA2-PEP-S2 e SPIKE-PEP-S2 com o maior número de ligações de H durante o DM.

Avaliamos a capacidade de inibição do vírus SARS-CoV-2 do peptídeo defensina SS-1 em células vero transfectadas. Como demonstrado na Figura 7, o peptídeo mostrou inibição da infecção viral com  $EC_{50} = 2,7\mu M$  para nas células nesse ensaio. Além disso, houve sobrevivência celular mesmo com o peptídeo a uma concentração de  $10\mu M$ .



**Figura 7 - Curva de concentração-resposta antiviral SARS-CoV-2 para o peptídeo.**

Pesquisas anteriores também relataram a ação antiviral de alguns peptídeos através do mecanismo de evitar a internalização de vírus nas células ligando a receptores celulares usados como ponto de ancoragem inicial (Jenssen e Hancock, 2009; Currie et al., 2013). Segundo Hazrati et al., 2006, defensinas são capazes de se ligar a receptores de membrana usados

por vírus, como é o caso do sulfato de heparana, que são receptores primários do herpes vírus. Além disso, Demirkhanyan et al., 2012 relatam que essas moléculas também se ligam a receptores CD4 que estão relacionados a internalização do vírus HIV às células. Em um outro estudo, o peptídeo lactoferrina impediu a infecção por pseudovírus SARS bloqueando proteoglicanos de sulfato de heparano na membrana que funcionam como pontos de ancoragem para o vírus. (Lang et al., 2011).

Segundo Maiti, 2020, resíduos específicos de aminoácidos são responsáveis pela ligação entre o SARS-Cov-2 e ECA2, o que sugere que um peptídeo com capacidade de bloquear o receptor reduza a capacidade de infecção viral. Wang, C. et al., 2020, em estudo utilizando o AMP HD5, uma  $\alpha$ -defensina localizada no intestino, os autores observaram que esse peptídeo se liga fortemente a ECA2, bloqueando a ligação da subunidade S1 da proteína spike de SARS-Cov-2 ao receptor, levando a crer, que HD5 pode evitar a ligação do vírus com as células hospedeiras.

Dessa forma, evitar a interação entre o vírus, através da proteína S, e o receptor da célula hospedeira, ECA2, como apresentado no ensaio *in silico* de dinâmica molecular aqui realizado, é um mecanismo interessante a ser explorado como possível alternativa terapêutica para a COVID-19. Tendo isso em vista, avaliamos a capacidade de inibição do vírus SARS-CoV-2 do peptídeo defensina SS-1 em células vero transfectadas. Em estudos anteriores outros peptídeos foram avaliados e apresentaram resultados semelhantes ao desse trabalho. Os peptídeos (p-BthTX-I)2K e análogos isolados da miotoxina do veneno da serpente *Bothrops jararacuçu* mostraram inibição da infecção viral por SARS-Cov-2 em até 70%, com  $EC_{50}$  de 51  $\mu$ M, 65  $\mu$ M e 67  $\mu$ M (Freire, Noske et al. 2021). Outra pesquisa com o peptídeo de um anfíbio, o Hylin a1 (Hy-a1), proveniente da toxina do sapo *Hypsiboas albopunctatus*, também foi avaliado quando a sua inibição de SARS-Cov-2 e citotoxicidade, e apresentou  $EC_{50} = 4 \mu$ M e  $CC_{50} = 81 \mu$ M (Alves, Junior et al. 2015).



## 7. CONCLUSÃO

A literatura apresenta diversas classes de moléculas de urodelos, com maior ênfase em peptídeos e alcaloides, os quais apresentam principalmente potencial antibacteriano. No entanto, os estudos realizados ainda apresentam algumas limitações, como a dificuldade de extração e de síntese desses compostos, restringindo a exploração do potencial antimicrobiano.

Nessa pesquisa foi identificado através do transcriptoma da *Salamandra salamandra* um peptídeo da classe das defensinas, o DSS1. De acordo com os ensaios *in silico* realizados entre o complexo enzima-ligante com Spike/ECA e ligante peptídico, há uma interação com o sítio de ligação ativo. Além disso, os ensaios *in vitro* realizados demonstraram que a defensina DSS1 é ativo contra SARS-CoV-2, sendo capaz de inibir esse vírus em concentrações não tóxicas para células vero, com  $EC_{50} = 2,7\mu\text{M}$ . Portanto, o peptídeo identificado no transcriptoma da espécie *Salamandra salamandra* deve ser explorado para melhor avaliação da sua atividade de contenção da internalização vírus SARS-Cov-2.

Peptídeos antimicrobianos têm se mostrado uma alternativa promissora no desenvolvimento de novos fármacos para uso no manejo terapêutico de diversas doenças infecciosas. A recente pandemia destacou a importância de a ciência estar preparada para enfrentar novos desafios futuros. A bioprospecção e caracterização de novas moléculas são de extrema relevância para a pesquisa e desenvolvimento de drogas para tratamento e manejo viral. Os anfíbios são uma fonte rica de peptídeos antimicrobianos, incluindo as espécies da ordem Urodela. Por conseguinte, as descobertas aqui apresentadas representam um recurso valioso na exploração de novas moléculas que podem servir de protótipos para desenvolvimento de medicamentos contra infecções por SARS-CoV-2.

## 8. REFERÊNCIAS

- Afolabi, L. T., F. Saeed, H. Hashim and O. O. Petinrin (2018). "Ensemble learning method for the prediction of new bioactive molecules." PLoS One **13**(1): e0189538.
- Akbarian, M. (2021). "Insulin therapy; a valuable legacy and its future perspective." Int J Biol Macromol **181**: 1224-1230.
- Akbarian, M., A. Khani, S. Eghbalpour and V. N. Uversky (2022). "Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action." Int J Mol Sci **23**(3).
- Al Shaer, D., O. Al Musaimi, F. Albericio and B. G. de la Torre (2020). "2019 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest." Pharmaceuticals (Basel) **13**(3).
- Alves, E. S., E. C. Junior, E. M. Cilli, M. S. Castro, W. Fontes, M. T. de Magalhaes, L. M. Liao and A. L. de Oliveira (2015). "Micelle Bound Structure and Model Membrane Interaction Studies of the Peptide Hylin a1 from the Arboreal South American Frog *Hypsiboas albopunctatus*." Protein Pept Lett **22**(8): 719-726.
- Anderson, J. S. (2012). "Fossils, molecules, divergence times, and the origin of Salamandroidea." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(15): 5557-5558.
- Baitchman, E. J. and T. A. Herman (2015). Chapter 2 - Caudata (Urodela): Tailed Amphibians. Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine, Volume 8. R. E. Miller and M. E. Fowler. St. Louis, W.B. Saunders: 13-20.
- Bani, L., G. Pisa, M. Luppi, G. Spilotros, E. Fabbri, E. Randi and V. Orioli (2015). "Ecological connectivity assessment in a strongly structured fire salamander (*Salamandra salamandra*) population." Ecol Evol **5**(16): 3472-3485.
- Beukema, W., A. Nicieza, A. Lourenço and G. Velo-Antón (2016). "Colour polymorphism in *Salamandra salamandra* (Amphibia: Urodela), revealed by a lack of genetic and environmental differentiation between distinct phenotypes." Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research **54**.
- Brunetti, A. E., B. Bunk, M. L. Lyra, C. A. Fuzo, M. M. Marani, C. Sproer, C. F. B. Haddad, N. P. Lopes and J. Overmann (2021). "Molecular basis of a

bacterial-amphibian symbiosis revealed by comparative genomics, modeling, and functional testing." ISME J.

Bucciarelli, G. M., D. B. Green, H. B. Shaffer and L. B. Kats (2016). "Individual fluctuations in toxin levels affect breeding site fidelity in a chemically defended amphibian." Proc Biol Sci **283**(1831).

Cancelarich, N. L., N. Wilke, M. A. L. Fanani, D. C. Moreira, L. O. Perez, E. Alves Barbosa, A. Placido, R. Socodato, C. C. Portugal, J. B. Relvas, B. G. de la Torre, F. Albericio, N. G. Basso, J. R. Leite and M. M. Marani (2020). "Somuncurins: Bioactive Peptides from the Skin of the Endangered Endemic Patagonian Frog *Pleurodema somuncurense*." J Nat Prod **83**(4): 972-984.

Cao, X., Y. Wang, C. Wu, X. Li, Z. Fu, M. Yang, W. Bian, S. Wang, Y. Song, J. Tang and X. Yang (2018). "Cathelicidin-OA1, a novel antioxidant peptide identified from an amphibian, accelerates skin wound healing." Sci Rep **8**(1): 943.

Casciaro, B., A. Calcaterra, F. Cappiello, M. Mori, M. R. Loffredo, F. Ghirga, M. L. Mangoni, B. Botta and D. Quaglio (2019). "Nigritanine as a New Potential Antimicrobial Alkaloid for the Treatment of *Staphylococcus aureus*-Induced Infections." Toxins **11**(9).

Chan, W. C. and P. D. White (2000). Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach. New York, Oxford University Press.

Choi, H. and D. G. Lee (2012). "Synergistic effect of antimicrobial peptide arenicin-1 in combination with antibiotics against pathogenic bacteria." Res Microbiol **163**(6-7): 479-486.

Clarke, B. T. (1997). "The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications." Biol Rev Camb Philos Soc **72**(3): 365-379.

Coorens, M., M. R. Scheenstra, E. J. Veldhuizen and H. P. Haagsman (2017). "Interspecies cathelicidin comparison reveals divergence in antimicrobial activity, TLR modulation, chemokine induction and regulation of phagocytosis." Sci Rep **7**: 40874.

Cushnie, T. P., B. Cushnie and A. J. Lamb (2014). "Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities." Int J Antimicrob Agents **44**(5): 377-386.

Dale, B. A., J. R. Kimball, S. Krisanaprakornkit, F. Roberts, M. Robinovitch, R. O'Neal, E. V. Valore, T. Ganz, G. M. Anderson and A. Weinberg (2001). "Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva." J Periodontal Res **36**(5): 285-294.

Daliri, E. B., D. H. Oh and B. H. Lee (2017). "Bioactive Peptides." Foods **6**(5).

Daly, J. W., T. F. Spande and H. M. Garraffo (2005). "Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds." J Nat Prod **68**(10): 1556-1575.

De Luca, V. and P. Laflamme (2001). "The expanding universe of alkaloid biosynthesis." Curr Opin Plant Biol **4**(3): 225-233.

Demori, I., Z. E. Rashed, V. Corradino, A. Catalano, L. Rovegno, L. Queirolo, S. Salvidio, E. Biggi, M. Zanotti-Russo, L. Canesi, A. Catenazzi and E. Grasselli (2019). "Peptides for Skin Protection and Healing in Amphibians." Molecules **24**(2).

Depta, J., P. Małkowska, M. Wysokińska, K. Todorska, O. Sierawska, R. Hryniewicz, D. Bębnowska and P. Niedźwiedzka-Rystwej (2022). "Therapeutic Role of Antimicrobial Peptides in Diabetes Mellitus." Biologics **2**(1).

Duarte, T. L. and J. Lunec (2005). "Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C." Free Radic Res **39**(7): 671-686.

Diamond, G., V. Kaiser, J. Rhodes, J. P. Russell and C. L. Bevins (2000). "Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells." Infect Immun **68**(1): 113-119.

Droin, N., J. B. Hendra, P. Ducoroy and E. Solary (2009). "Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules." J Proteomics **72**(6): 918-927.

Dumbacher, J. P., T. F. Spande and J. W. Daly (2000). "Batrachotoxin alkaloids from passerine birds: A second toxic bird genus (&em&em;Ifrita

kowaldi</em> from New Guinea." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(24): 12970.

Erjavec, V., B. Lukanc and J. Žel (2017). "Intoxication of a dog with alkaloids of the fire salamander." Medycyna Weterynaryjna **73**: 186-188.

Erspamer, V. (1971). "Biogenic amines and active polypeptides of the amphibian skin." Annu Rev Pharmacol **11**: 327-350.

Fan, Y., X. D. Li, P. P. He, X. X. Hu, K. Zhang, J. Q. Fan, P. P. Yang, H. Y. Zheng, W. Tian, Z. M. Chen, L. Ji, H. Wang and L. Wang (2020). "A biomimetic peptide recognizes and traps bacteria in vivo as human defensin-6." Sci Adv **6**(19): eaaz4767.

Feder, M. E. and W. W. Burggren (1992). Environmental Physiology of the Amphibians, University of Chicago Press.

Ferreira, M. A., N. N. Santos, S. D. S. Brazil, B. G. Guimarães and M. S. D. Cunha (2021). "Uso de peptídeos antimicrobianos como metodologia alternativa no combate à COVID-19: uma revisão de literatura." Revista Multidisciplinar em Saúde **2**(4): 84.

Filchakova, O., D. Dossym, A. Ilyas, T. Kuanysheva, A. Abdizhamil and R. Bukasov (2022). "Review of COVID-19 testing and diagnostic methods." Talanta **244**: 123409.

Fredericks, L. and J. Dankert (2000). "Antibacterial and hemolytic activity of the skin of the terrestrial salamander, *Plethodon cinereus*." The Journal of experimental zoology **287**: 340-345.

Freire, M., G. D. Noske, N. V. Bitencourt, P. R. S. Sanches, N. A. Santos-Filho, V. O. Gawriljuk, E. P. de Souza, V. H. R. Nogueira, M. O. de Godoy, A. M. Nakamura, R. S. Fernandes, A. S. Godoy, M. A. Juliano, B. M. Peres, C. G. Barbosa, C. B. Moraes, L. H. G. Freitas-Junior, E. M. Cilli, R. V. C. Guido and G. Oliva (2021). "Non-Toxic Dimeric Peptides Derived from the Bothropstoxin-I Are Potent SARS-CoV-2 and Papain-like Protease Inhibitors." Molecules **26**(16).

Gao, Y., D. Wu, L. Wang, C. Lin, C. Ma, X. Xi, M. Zhou, J. Duan, O. R. P. Bininda-Emonds, T. Chen and C. Shaw (2017). "Targeted Modification of a

Novel Amphibian Antimicrobial Peptide from *Phyllomedusa tarsius* to Enhance Its Activity against MRSA and Microbial Biofilm." Front Microbiol **8**: 628.

Gehrke, T., C. Lausmann, M. Citak, T. Bonanzinga, L. Frommelt and A. Zahar (2018). "The Accuracy of the Alpha Defensin Lateral Flow Device for Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: Comparison with a Gold Standard." *J Bone Joint Surg Am* **100**(1): 42-48.

Gomes, A., A. Giri B Fau - Saha, R. Saha A Fau - Mishra, S. C. Mishra R Fau - Dasgupta, A. Dasgupta Sc Fau - Debnath, A. Debnath A Fau - Gomes and A. Gomes "Bioactive molecules from amphibian skin: their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development." (0019-5189 (Print)).

Gürlek, C., Ç. Yarkent, A. Köse, B. Tuğcu, I. K. Gebeloğlu, S. Ş. Öncel and M. Elibol (2020). "Screening of antioxidant and cytotoxic activities of several microalgal extracts with pharmaceutical potential." Health and Technology **10**(1): 111-117.

Habermehl, G. (1964). "O-Acetyl-samandarin im Gift von *Salamandra maculosa*." Justus Liebigs Annalen der Chemie **679**(1): 164-167.

Habermehl, G. (1967). Chapter 9 The Steroid Alkaloids: The Salamandra Group\*\*Supplementary to Volume V, page 321. The Alkaloids: Chemistry and Physiology. R. H. F. Manske, Academic Press. **9**: 427-439.

Habermehl, G. (1971). Chapter 42 - Toxicology, Pharmacology, Chemistry, and Biochemistry of Salamander Venom. Venomous Animals and their Venoms. W. BÜCherl and E. E. Buckley, Academic Press: 569-584.

Habermehl, G. and A. Haaf (1968). "[Cholesterol as the first step in the biosynthesis of the salamander alkaloids]." Chem Ber **101**(1): 198-200.

Habermehl, G. and H.-J. Preusser (1969). "Hemmung des Wachstums von Pilzen und Bakterien durch das Hautdrüsensekret von *Salamandra maculosa*." Zeitschrift für Naturforschung B **24**(12): 1599-1601.

Habermehl, G. and G. Vogel (1969). "Samandinine, a minor alkaloid from *Salamandra maculosa* Laur." Toxicon **7**(2): 163-164.

Hardwicke, J., D. Schmaljohann, D. Boyce and D. Thomas (2008). "Epidermal growth factor therapy and wound healing — past, present and future perspectives." The Surgeon **6**(3): 172-177.

Heiss, E., N. Natchev, A. Rabanser, J. Weisgram and H. Hilgers (2009). "Three types of cutaneous glands in the skin of the salamandrid *Pleurodeles waltl*. A histological and ultrastructural study." J Morphol **270**(7): 892-902.

Holshue, M. L., C. DeBolt, S. Lindquist, K. H. Lofy, J. Wiesman, H. Bruce, C. Spitters, K. Ericson, S. Wilkerson, A. Tural, G. Diaz, A. Cohn, L. Fox, A. Patel, S. I. Gerber, L. Kim, S. Tong, X. Lu, S. Lindstrom, M. A. Pallansch, W. C. Weldon, H. M. Biggs, T. M. Uyeki, S. K. Pillai and V. C. I. T. Washington State -nCo (2020). "First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States." N Engl J Med **382**(10): 929-936.

Holthausen, D. J., S. H. Lee, V. T. Kumar, N. M. Bouvier, F. Krammer, A. H. Ellebedy, J. Wrammert, A. C. Lowen, S. George, M. R. Pillai and J. Jacob (2017). "An Amphibian Host Defense Peptide Is Virucidal for Human H1 Hemagglutinin-Bearing Influenza Viruses." Immunity **46**(4): 587-595.

Jean, S. S., P. I. Lee and P. R. Hsueh (2020). "Treatment options for COVID-19: The reality and challenges." J Microbiol Immunol Infect **53**(3): 436-443.

Jeckel, A. M., T. Grant and R. A. Saporito (2015). "Sequestered and Synthesized Chemical Defenses in the Poison Frog *Melanophryniscus moreirae*." J Chem Ecol **41**(5): 505-512.

Jenssen, H., P. Hamill and R. E. Hancock (2006). "Peptide antimicrobial agents." Clin Microbiol Rev **19**(3): 491-511.

Jia, J. and K. Q. Gao (2016). "A New Basal Salamandroid (Amphibia, Urodela) from the Late Jurassic of Qinglong, Hebei Province, China." PLoS One **11**(5): e0153834.

Jiang, W. B., M. Hakim, L. Luo, B. W. Li, S. L. Yang, Y. Z. Song, R. Lai and Q. M. Lu (2015). "Purification and characterization of cholecystinin from the skin of salamander *Tylotriton verrucosus*." Dongwuxue Yanjiu **36**(3): 174-177.

Jones, T. H., R. M. M. Adams, T. F. Spande, H. M. Garraffo, T. Kaneko and T. R. Schultz (2012). "Histrionicotoxin Alkaloids Finally Detected in an Ant." Journal of Natural Products **75**(11): 1930-1936.

Jovaisiene, J., B. Bakutis, V. Baliukoniene, P. Matusevicius, K. Lipiński, Z. Antoszkiewicz and M. Fijałkowska (2017). "Biogenic amines and mycotoxins concentrations in baled silage from organic and conventional farms." Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia **69**: 269-277.

Kerenga, B. K., J. A. McKenna, P. J. Harvey, P. Quimbar, D. Garcia-Ceron, F. T. Lay, T. K. Phan, P. K. Veneer, S. Vasa, K. Parisi, T. M. A. Shafee, N. L. van der Weerden, M. D. Hulett, D. J. Craik, M. A. Anderson and M. R. Bleackley (2019). "Salt-Tolerant Antifungal and Antibacterial Activities of the Corn Defensin ZmD32." Front Microbiol **10**: 795.

Knepper, J., T. Luddecke, K. Preissler, M. Vences and S. Schulz (2019). "Isolation and Identification of Alkaloids from Poisons of Fire Salamanders ( *Salamandra salamandra*)." J Nat Prod **82**(5): 1319-1324.

Koeninger, L., N. S. Armbruster, K. S. Brinch, S. Kjaerulf, B. Andersen, C. Langnau, S. E. Autenrieth, D. Schneidawind, E. F. Stange, N. P. Malek, P. Nordkild, B. A. H. Jensen and J. Wehkamp (2020). "Human beta-Defensin 2 Mediated Immune Modulation as Treatment for Experimental Colitis." Front Immunol **11**: 93.

Łaciak, M. (2022). "Aposematism as a trap? A case of heavy predation on a poisonous salamander." Frontiers in Ecology and the Environment **20**(10): 588-588.

Lau, J. L. and M. K. Dunn (2018). "Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions." Bioorg Med Chem **26**(10): 2700-2707.

Lee, A. C., J. L. Harris, K. K. Khanna and J. H. Hong (2019). "A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design." Int J Mol Sci **20**(10).

Lehrer, R. I. and W. Lu (2012). "alpha-Defensins in human innate immunity." Immunol Rev **245**(1): 84-112.

Lelario, F., S. De Maria, A. R. Rivelli, D. Russo, L. Milella, S. A. Bufo and L. Scrano (2019). "A Complete Survey of Glycoalkaloids Using LC-FTICR-MS and IRMPD in a Commercial Variety and a Local Landrace of Eggplant (*Solanum melongena* L.) and their Anticholinesterase and Antioxidant Activities." Toxins (Basel) **11**(4).

Ligabue-Braun, R. and C. R. Carlini (2015). "Poisonous birds: A timely review." Toxicon **99**: 102-108.

Litescu, S. C., S. Eremia, M. Diaconu, A. Tache and G. Radu (2011). Biosensors Applications on Assessment of Reactive Oxygen Species and Antioxidants.

Llesuy, S., P. Evelson, A. M. Campos and E. Lissi (2001). "Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures. A critical review." Biological Research **34**: 51-73.

Lorenzo, J. M., P. E. S. Muneke, B. Gómez, F. J. Barba, L. Mora, C. Pérez-Santaescolástica and F. Toldrá (2018). "Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review." Trends in Food Science & Technology **79**: 136-147.

Luddecke, T., S. Schulz, S. Steinfartz and M. Vences (2018). "A salamander's toxic arsenal: review of skin poison diversity and function in true salamanders, genus *Salamandra*." Naturwissenschaften **105**(9-10): 56.

Macfoy, C., D. Danosus, R. Sandit, T. H. Jones, H. M. Garraffo, T. F. Spande and J. W. Daly (2005). "Alkaloids of anuran skin: antimicrobial function?" Z Naturforsch C J Biosci **60**(11-12): 932-937.

Mahmoud, I. S., Y. B. Jarrar, W. Alshaer and S. Ismail (2020). "SARS-CoV-2 entry in host cells-multiple targets for treatment and prevention." Biochimie **175**: 93-98.

Manenti, R., G. F. Ficetola and F. De Bernardi (2009). "Water, stream morphology and landscape: Complex habitat determinants for the fire salamander *Salamandra salamandra*." Amphibia-Reptilia **30**: 7-15.

Mathieu, C., P. Gillard and K. Benhalima (2017). "Insulin analogues in type 1 diabetes mellitus: getting better all the time." Nat Rev Endocrinol **13**(7): 385-399.

Mebs, D. and W. Pogoda (2005). "Variability of alkaloids in the skin secretion of the European fire salamander (*Salamandra salamandra terrestris*)."  
Toxicon **45**(5): 603-606.

Meng, P., S. Yang, C. Shen, K. Jiang, M. Rong and R. Lai (2013). "The first salamander defensin antimicrobial peptide."  
PLoS One **8**(12): e83044.

Mert, K., Ş. Doğançan, Y. Hüsniye Tansel, N. Ayşe and G. Bayram (2018). "Major biological activities and protein profiles of skin secretions of *Lissotriton vulgaris* and *Triturus ivanbureschi*."  
Turkish Journal of Biochemistry **43**(6): 605-612.

Mookherjee, N. and R. E. Hancock (2007). "Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections."  
Cell Mol Life Sci **64**(7-8): 922-933.

Mu, L., J. Tang, H. Liu, C. Shen, M. Rong, Z. Zhang and R. Lai (2014). "A potential wound-healing-promoting peptide from salamander skin."  
FASEB J **28**(9): 3919-3929.

Nguyen, L. T., E. F. Haney and H. J. Vogel (2011). "The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action."  
Trends Biotechnol **29**(9): 464-472.

Nicola, A. M., P. Albuquerque, H. C. Paes, L. Fernandes, F. F. Costa, E. S. Kioshima, A. K. R. Abadio, A. L. Bocca and M. S. Felipe (2019). "Antifungal drugs: New insights in research & development."  
Pharmacol Ther **195**: 21-38.

Nuding, S., T. Frasch, M. Schaller, E. F. Stange and L. T. Zabel (2014). "Synergistic effects of antimicrobial peptides and antibiotics against *Clostridium difficile*."  
Antimicrob Agents Chemother **58**(10): 5719-5725.

Pei, J., Z. Feng, T. Ren, H. Sun, H. Han, W. Jin, J. Dang and Y. Tao "Purification, characterization and application of a novel antimicrobial peptide from *Andrias davidianus* blood." (1472-765X (Electronic)).

Pei, J. and L. Jiang (2017). "Antimicrobial peptide from mucus of *Andrias davidianus*: screening and purification by magnetic cell membrane separation technique."  
Int J Antimicrob Agents **50**(1): 41-46.

Pereira, K. E., B. I. Crother, D. M. Sever, C. L. Fontenot, Jr., J. A. Pojman, Sr., D. B. Wilburn and S. K. Woodley (2018). "Skin glands of an aquatic

salamander vary in size and distribution and release antimicrobial secretions effective against chytrid fungal pathogens." J Exp Biol **221**(Pt 14).

Peters, B. M., M. E. Shirliff and M. A. Jabra-Rizk (2010). "Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs?" PLoS Pathog **6**(10): e1001067.

Petruczynik, A., T. Plech, T. Tuzimski, J. Misiurek, B. Kapron, D. Misiurek, M. Szultka-Mlynska, B. Buszewski and M. Waksmundzka-Hajnos (2019). "Determination of Selected Isoquinoline Alkaloids from Mahonia Aquifolia; Meconopsis Cambrica; Corydalis Lutea; Dicentra Spectabilis; Fumaria Officinalis; Macleaya Cordata Extracts by HPLC-DAD and Comparison of Their Cytotoxic Activity." Toxins (Basel) **11**(10).

Phisalix, M. (1900). Recherches embryologiques, histologiques et physiologiques sur les glandes à venin de la salamandre terrestre. Paris, Librairie C. Reinwald, Schleicher frères, éditeurs.

Placido, A., J. Bueno, E. A. Barbosa, D. C. Moreira, J. D. N. Dias, W. F. Cabral, P. Albuquerque, L. J. Bessa, J. Freitas, S. A. S. Kuckelhaus, F. Lima, A. Batagin-Neto, G. D. Brand, J. B. Relvas, J. Leite and P. Eaton (2020). "The Antioxidant Peptide Salamandrin-I: First Bioactive Peptide Identified from Skin Secretion of Salamandra Genus (*Salamandra salamandra*)." Biomolecules **10**(4).

Preißler, K., S. Gippner, T. Lüddecke, E. T. Krause, S. Schulz, M. Vences and S. Steinfartz (2019). "More yellow more toxic? Sex rather than alkaloid content is correlated with yellow coloration in the fire salamander." Journal of Zoology **308**(4): 293-300.

Preusser, H. J., G. Habermehl, M. Sablofski and D. Schmall-Haury (1975). "Antimicrobial activity of alkaloids from amphibian venoms and effects on the ultrastructure of yeast cells." Toxicon **13**(4): 285-289.

Pukala, T. L., J. H. Bowie, V. M. Maselli, I. F. Musgrave and M. J. Tyler (2006). "Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity." Natural Product Reports **23**(3): 368-393.

Smith, J. G., M. Silvestry, S. Lindert, W. Lu, G. R. Nemerow and P. L. Stewart (2010). "Insight into the mechanisms of adenovirus capsid disassembly from studies of defensin neutralization." PLoS Pathog **6**(6): e1000959.

Rickrode, T. E., C. F. Mueller and D. Taylor (1986). "Identification and Antibiotic Activity of Fatty Acids in Dermal Secretions of *Plethodon cinereus*." The American Midland Naturalist **115**(1): 198-200.

Sampaio de Oliveira, K. B., M. L. Leite, G. R. Rodrigues, H. M. Duque, R. A. da Costa, V. A. Cunha, L. S. de Loiola Costa, N. B. da Cunha, O. L. Franco and S. C. Dias (2020). "Strategies for recombinant production of antimicrobial peptides with pharmacological potential." Expert Rev Clin Pharmacol **13**(4): 367-390.

Santos, I. J. M., H. D. Melo Coutinho, E. F. Ferreira Matias, J. G. Martins da Costa, R. R. Nóbrega Alves and W. de Oliveira Almeida (2012). "Antimicrobial activity of natural products from the skins of the semiarid living lizards *Ameiva ameiva* (Linnaeus, 1758) and *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825)." Journal of Arid Environments **76**: 138-141.

Saporito, R. A., M. A. Donnelly, T. F. Spande and H. M. Garraffo (2012). "A review of chemical ecology in poison frogs." Chemoecology **22**(3): 159-168.

Sansone, N. M. S., F. E. Valencise, R. F. Bredariol, A. O. Peixoto and F. A. L. Marson (2022). "Profile of coronavirus disease enlightened asthma as a protective factor against death: An epidemiology study from Brazil during the pandemic." Front Med (Lausanne) **9**: 953084.

Sheafor, B., E. W. Davidson, L. Parr and L. Rollins-Smith (2008). "Antimicrobial peptide defenses in the salamander, *Ambystoma tigrinum*, against emerging amphibian pathogens." J Wildl Dis **44**(2): 226-236.

Shen, W., P. He, C. Xiao and X. Chen (2018). "From Antimicrobial Peptides to Antimicrobial Poly(alpha-amino acid)s." Adv Healthc Mater **7**(20): e1800354.

Singhal, T. (2020). "A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19)." Indian J Pediatr **87**(4): 281-286.

Teclé, T., S. Tripathi and K. L. Hartshorn (2010). "Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity." Innate Immun **16**(3): 151-159.

Tempone, A., M. Melhem, F. Prado, G. Motoie, R. Hiramoto, M. Antoniazzi, C. Haddad and C. Jared (2007). "Amphibian Secretions for Drug Discovery Studies: A Search for New Antiparasitic and Antifungal Compounds." Letters in Drug Design & Discovery **4**: 67-73.

van Wetering, S., P. J. Sterk, K. F. Rabe and P. S. Hiemstra (1999). "Defensins: key players or bystanders in infection, injury, and repair in the lung?" J Allergy Clin Immunol **104**(6): 1131-1138.

Velavan, T. P. and C. G. Meyer (2020). "The COVID-19 epidemic." Trop Med Int Health **25**(3): 278-280.

Vences, M., E. Sanchez, J. S. Hauswaldt, D. Eikelmann, A. Rodríguez, S. Carranza, D. Donaire, M. Gehara, V. Helfer, S. Lötters, P. Werner, S. Schulz and S. Steinfartz "Nuclear and mitochondrial multilocus phylogeny and survey of alkaloid content in true salamanders of the genus Salamandra (Salamandridae)." (1095-9513 (Electronic)).

Vineeth Kumar, T. V. and G. Sanil (2017). "A Review of the Mechanism of Action of Amphibian Antimicrobial Peptides Focusing on Peptide-Membrane Interaction and Membrane Curvature." Curr Protein Pept Sci **18**(12): 1263-1272.

von Byern, J., D. Mebs, E. Heiss, U. Dicke, O. Wetjen, K. Bakkegard, I. Grunwald, S. Wolbank, S. Muhleder, A. Gugerell, H. Fuchs and S. Nurnberger (2017). "Salamanders on the bench - A biocompatibility study of salamander skin secretions in cell cultures." Toxicon **135**: 24-32.

Wake, D. B. and I. G. Dresner (1967). "Functional morphology and evolution of tail autotomy in salamanders." J Morphol **122**(4): 265-305.

Wang, L., N. Wang, W. Zhang, X. Cheng, Z. Yan, G. Shao, X. Wang, R. Wang and C. Fu (2022). "Therapeutic peptides: current applications and future directions." Signal Transduct Target Ther **7**(1): 48.

Weitz, G. and E. Wolfel (1962). "The structure of salamander alkaloids. I. On the structure of samandarine-hydrobromide." Acta Crystallographica **15**(5): 484-491.

Woodhams, D. C., L. A. Rollins-Smith, L. K. Reinert, B. A. Lam, R. N. Harris, C. J. Briggs, V. T. Vredenburg, B. T. Patel, R. M. Caprioli, P. Chaurand, P. Hunziker and L. Bigler (2020). "Probiotics Modulate a Novel Amphibian Skin Defense Peptide That Is Antifungal and Facilitates Growth of Antifungal Bacteria." Microb Ecol **79**(1): 192-202.

- Wilson, S. S., M. E. Wiens and J. G. Smith (2013). "Antiviral mechanisms of human defensins." J Mol Biol **425**(24): 4965-4980.
- Wong, J. H., L. Xia and T. B. Ng (2007). "A review of defensins of diverse origins." Curr Protein Pept Sci **8**(5): 446-459.
- Xiao, Y., C. Liu and R. Lai (2011). "Antimicrobial peptides from amphibians." Biomol Concepts **2**(1-2): 27-38.
- Yamasaki, K. and R. L. Gallo (2008). "Antimicrobial peptides in human skin disease." Eur J Dermatol **18**(1): 11-21.
- Yeaman, M. R. and N. Y. Yount (2003). "Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance." Pharmacol Rev **55**(1): 27-55.
- Zhang, J., S. L. Morris-Natschke, D. Ma, X.-F. Shang, C.-J. Yang, Y.-Q. Liu and K.-H. Lee (2021). "Biologically active indolizidine alkaloids." Medicinal Research Reviews **41**(2): 928-960.
- Zhao, L. and W. Lu (2014). "Defensins in innate immunity." Curr Opin Hematol **21**(1): 37-42.
- Zheng, C., W. Shao, X. Chen, B. Zhang, G. Wang and W. Zhang (2022). "Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis." Int J Infect Dis **114**: 252-260.
- Zhu, Y., D. Yu, H. Yan, H. Chong and Y. He (2020). "Design of Potent Membrane Fusion Inhibitors against SARS-CoV-2, an Emerging Coronavirus with High Fusogenic Activity." J Virol **94**(14).