



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
FACULDADE DE MEDICINA - FM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ARIANE NOGUEIRA DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS TRIPTOFILINAS COM
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E NEUROPROTETORAS**

BRASÍLIA-DF

2025

ARIANE NOGUEIRA DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS TRIPTOFILINAS COM
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E NEUROPROTETORAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

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

Co-orientadora: Dra. Alexandra Patrícia Plácido do Nascimento

BRASÍLIA-DF

2025

ARIANE NOGUEIRA DE OLIVEIRA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS TRIPTOFILINAS COM
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E NEUROPROTETORAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas
da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Doutora em
Ciências Médicas

Banca Examinadora

Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite
Universidade de Brasília - UnB
(Presidente)

Dra. Mariela Mirta Marani
Universidade de Buenos Aires
(IPEEC-CONICET)
(Membro externo)

Dra. Helena Cristina Correia de Oliveira
Universidade de Aveiro
(Membro externo)

Dra. Juliana Lott de Carvalho
Universidade de Brasília– UnB
(Membro interno)

Dr. Amílcar Damazo
Universidade de Brasília– UnB
(Suplente)

AGRADECIMENTOS

Tenho convicção de que, em todas as fases da nossa vida, existem pessoas chave que contribuem para o nosso crescimento, e nesta etapa não poderia ter sido diferente.

Primeiramente, agradeço a Deus, na certeza de que este ciclo foi de extrema importância para o meu autoconhecimento e crescimento, tanto pessoal quanto profissional. Acredito que nada é por acaso e que Ele guiou meus passos até Brasília.

Durante esta jornada, tive o privilégio de ter ao meu lado um dos pesquisadores mais renomados do Brasil, que me acolheu e não mediu esforços para proporcionar toda a estrutura necessária à realização deste trabalho. O Prof. José Roberto Leite é um homem de extrema inteligência. Agradeço-lhe por aceitar me orientar, bem como por todas as conversas que me nortearam em vários momentos da vida. *“In life, it’s not where you go. It’s who you travel with.”*

Agradeço também à minha coorientadora, Prof^a Dr^a Alexandra Plácido, por me receber na *Bioprospectum*, em Portugal, permitindo que juntas desenvolvêssemos experimentos e trocássemos ideias. Aproveito para estender meu muito obrigada a Peter Eaton, que também esteve presente.

Gostaria de agradecer a todos que fazem parte da família NuPMIA: Glorinha, Andreanne, Daniel Moreira, Wanessa, Felipe, Flávia, Raíssa, Giuliano e Jhones. Obrigada por todo o suporte e, principalmente, por todas as dicas que me ajudaram a modelar minha forma de enxergar o meu trabalho e a apreciar a pesquisa científica. E, claro, pelos momentos de descontração movidos por café e festejos. Os dias eram mais leves com vocês!

Agradeço também aos integrantes de outros laboratórios e departamentos, que, por incontáveis vezes, estiveram dispostos a me ajudar, esclarecendo dúvidas e pacientemente interrompendo suas atividades para me auxiliar, seja com as sínteses de peptídeos e clivagens, seja com experimentos com células: José Brango, Guilherme Dotto, João Bueno, Éder Barbosa, Carol Ciarlini e Vanessa.

Em especial, agradeço ao Daniel Moreira, um pesquisador fora de série, em quem me inspiro. Foi um ponto de apoio em meio às turbulências e um grande provedor de momentos de descontração e boas piadas. Nesse time, incluo nosso colaborador do Piauí, Daniel Arcanjo. Você faz jus ao nome e, de fato, foi peça fundamental para a elaboração do artigo e para os experimentos-chave que nortearam o trabalho.

Agradeço, sobretudo, ao Dr. José Brango. Você é um exemplo de humildade. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado, pela paciência, pelo entusiasmo e pelo suporte durante todo esse tempo, auxiliando-me nas correções, na escrita de artigos e nos experimentos.

À Andreanne Vasconcelos, que esteve presente nos momentos mais desafiadores do doutorado, auxiliando na análise dos resultados e sempre disposta a ajudar e ensinar, minha gratidão. Obrigada por todas as conversas e por todo o tempo investido em mim.

Com o coração transbordando de carinho, agradeço à família de amigos e professores da UFMS. Vocês são meu conforto e abrigo nos momentos em que pousa na Cidade Morena. Em especial, agradeço a Ana Paula Marques, por ser sempre esse porto seguro.

Sou grata também aos professores da UnB por contribuírem com ensinamentos valiosos e por sempre me incentivarem, tendo sempre uma palavra amiga e acolhedora. Em especial, agradeço a Rodrigo Gurgel e Tatiana Karla, e, claro, à técnica e amiga Patrícia Gomes, por todos os momentos compartilhados, pela amizade e pelo suporte de sempre.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos ao longo desses anos, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de longa data, minha imensa gratidão. Sem dúvida, essas amizades fazem toda a diferença na minha forma de ver o mundo e de me enxergar até hoje. Obrigada por todo carinho e companheirismo desde os tempos de graduação: Jaíza Motta, Ana Maria de Menezes, Helen Maranhão e Bárbara Butkenicius.

Isadora Barbosa, Luiz Mário e Leonardo Martinez, vocês são seres de luz, e tenho o privilégio de chamá-los de amigos. Obrigada por sempre terem as palavras certas no momento oportuno. Vocês têm o dom nato da empatia e do amor!

Agradeço também aos amigos que Brasília me trouxe ao longo desses anos e que tornaram minha jornada mais leve e prazerosa. Vocês foram peças indispensáveis para a minha adaptação no *quadrado*: Igor Saback e sua família, Amanda, Dani Martins, Marineide e família.

Aproveito para agradecer aos novos amigos que o Ministério da Saúde me proporcionou. Estar como Consultora Técnica tem sido uma experiência indescritível, que me permitiu conhecer pessoas extraordinárias e competentes de diferentes lugares do Brasil. Em especial, agradeço ao DESMP e ao DEDT, representando, *neste ato*, nosso pequeno grande grupo da Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente (SVSA).

Sou imensamente grata à grande família que a Gnosis me presenteou, tornando-se parte essencial da minha vida desde então. Minha gratidão por todos esses anos de aprendizado e por cada ensinamento valioso ligado à espiritualidade, fé, compreensão, amor e amizade. Vocês me fortalecem nesse caminho, tenham certeza disso. Obrigada!

E, por fim... Agradeço imensamente à minha família, por ser sempre minha base e por me proporcionar o melhor, sem medir esforços. Obrigada por todo amor, incentivo e força e, principalmente, por me ensinarem lições valiosas sobre amor, perdão e gratidão. A vocês, todo o meu amor e respeito.

Este trabalho é dedicado a cada um de vocês: Adelurci Nogueira, Antônio Augusto, Cida Fernandes, Arielle Nogueira, Aretusa Nogueira e à minha amada e querida avó Adélia Melo Nogueira (*in memoriam*).

.

Resumo

A pele dos anfíbios é uma fonte rica de moléculas bioativas, incluindo as triptofilinas, uma classe heterogênea de peptídeos inicialmente identificados nas secreções dérmicas desses animais. O uso das triptofilinas, também conhecidas como derivados do triptofano, são promissores na medicina para prevenir e tratar doenças causadas ou agravadas por processos de oxidação. Neste estudo, relatamos a caracterização estrutural e as propriedades antioxidantes de dois peptídeos da classe triptofilina: FPPEWISR (PcT-1) e FPWLLS-NH₂ (PpT-2), isolados da rã-anã-central *Physalaemus centralis* e da rã verde ibérica *Pelophylax perezi*, respectivamente. Os peptídeos foram identificados por meio de clonagem de cDNA e análise comparativa de sequências, além de serem isolados a partir da secreção cutânea dos anfíbios por RP-HPLC. A estrutura primária de PpT-2 foi confirmada por degradação de Edman, enquanto PcT-1 representa uma nova sequência dentro da classe das triptofilinas. A síntese química em fase sólida permitiu a avaliação de suas propriedades bioquímicas e bioativas. Ambos os peptídeos demonstraram atividade antioxidante nos ensaios de eliminação do radical ABTS (0,305 e 0,269 mg equivalentes de Trolox/mg para PcT-1 e PpT-2, respectivamente) e no teste ORAC (0,319 e 0,248 mg equivalentes de Trolox/mg). Além disso, protegeram hemácias humanas contra hemólise induzida por AAPH e restauraram parcialmente o vasorrelaxamento em preparações de aorta de rato após estresse oxidativo induzido por ácido pirogálico, com PpT-2 apresentando um efeito protetor mais pronunciado. A bioatividade de PpT-2 foi ainda investigada em células microgлияis BV-2 submetidas a estresse oxidativo induzido por PMA, onde o peptídeo suprimiu a geração de espécies reativas de oxigênio. Também foi avaliada sua ação sobre células de câncer de próstata e bactérias, demonstrando efeito antiproliferativo moderado, mas atividade antimicrobiana negligenciável. Ensaios de toxicidade *in vitro* e *in vivo* indicaram alta biocompatibilidade para ambos os peptídeos, sem toxicidade detectável em hemácias humanas ou em larvas de *Galleria mellonella* tratadas com até 40 mg/kg de PpT-2. Os resultados destacam PcT-1 e PpT-2 como candidatos promissores para aplicações terapêuticas e biotecnológicas, especialmente no combate ao estresse oxidativo e em potenciais estratégias de prevenção ou tratamento para distúrbios neurodegenerativos. Em geral, as triptofilinas ou seus derivados são promissores para tratar condições que envolvem desregulação dos neurotransmissores relacionados ao triptofano, mas o uso clínico precisa de mais pesquisas para comprovar sua eficácia e segurança em vários tratamentos.

Abstract

Amphibian skin is a rich source of bioactive molecules, including tryptophyllins, a heterogeneous class of peptides initially identified in amphibian skin secretions. The use of tryptophilins, also known as tryptophan derivatives, is promising in medicine for preventing and treating diseases caused or aggravated by oxidation processes. In this study, the structural characterization and antioxidant properties of two tryptophyllin-class peptides: FPPEWISR (PcT-1) and FPWLLS-NH₂ (PpT-2), isolated from the dwarf frog *Physalaemus centralis* and the Iberian green frog *Pelophylax perezi*, respectively. The peptides were identified through cDNA cloning and sequence comparison, as well as isolated from amphibian skin secretion by RP-HPLC. The primary structure of PpT-2 was confirmed by Edman degradation, while PcT-1 represents a novel sequence within the tryptophyllin class. Solid-phase chemical synthesis enabled the evaluation of their biochemical and bioactive properties. Both peptides demonstrated significant antioxidant activity in the ABTS radical scavenging assay (0.305 and 0.269 mg Trolox equivalents/mg for PcT-1 and PpT-2, respectively) and in the ORAC test (0.319 and 0.248 mg Trolox equivalents/mg). Additionally, they protected human red blood cells against AAPH-induced hemolysis and partially restored vasorelaxation in rat aorta preparations after oxidative stress induced by pyrogallol, with PpT-2 exhibiting a more pronounced protective effect. The bioactivity of PpT-2 was further investigated in BV-2 microglial cells exposed to oxidative stress induced by PMA, where the peptide suppressed the generation of reactive oxygen species. Its effects on prostate cancer cells and bacteria were also assessed, showing moderate antiproliferative activity but negligible antimicrobial properties. *In vitro* and *in vivo* toxicity assays indicated high biocompatibility for both peptides, with no detectable toxicity in human red blood cells or *Galleria mellonella* larvae treated with up to 40 mg/kg of PpT-2. These findings highlight PcT-1 and PpT-2 as promising candidates for therapeutic and biotechnological applications, particularly in combating oxidative stress and potential strategies for prevention or treatment of neurodegenerative disorders. In general, tryptophilins or their derivatives are promising for treating conditions involving neurotransmitter dysregulation related to tryptophan, but clinical use requires further research to confirm their efficacy and safety in various treatments.

SUMÁRIO

<i>LISTA DE FIGURAS</i>	12
<i>LISTA DE TABELAS</i>	15
<i>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</i>	16
<i>Tabela de aminoácidos naturais</i>	17
<i>INTRODUÇÃO</i>	18
<i>CAPÍTULO I: ANÁLISE BIBLIOMÉTRICA DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA SOBRE TRIPTOFILINAS: TENDÊNCIAS E CONTRIBUIÇÕES</i>	22
<i>RESUMO</i>	23
1. <i>INTRODUÇÃO</i>	24
2. <i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	25
2.1 Levantamento bibliográfico	25
2.2 Mapeamento científico	26
3. <i>RESULTADOS</i>	27
3.1 Análise quantitativa quanto ao número de publicações e citações	27
3.2 Desempenho das publicações por país.....	28
3.3 Desempenho das publicações por instituição de ensino	29
3.4 Desempenho de diferentes periódicos	30
3.5 Análise dos artigos mais citados	31
3.6 Análise de rede de autores	32
3.6.1 Relação co-autores e autores	32
3.6.2 Relação de citação e artigos.....	33
3.7 Análise de rede de palavras-chave	34
4. <i>DISCUSSÃO</i>	35
4.1 Estrutura e diversidade das triptofilinas.....	36
4.2 Funções biológicas das triptofilinas.....	36
4.3 Métodos Analíticos: Espectrometria de Massas e Sequenciamento de cDNA.....	37
4.5 Evolução das triptofilinas e Diversidade entre Espécies	38
4.6 A importância da bibliometria e o uso do VOSviewer	39
5. <i>CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	39
6. <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	43
<i>CAPÍTULO II: NOVOS PEPTÍDEOS TRIPTOFILINAS DE PHYSALAEMUS CENTRALIS INIBEM A DISFUNÇÃO ENDOTELIAL INDUZIDA POR ESTRESSE OXIDATIVO EM PREPARAÇÕES DE AORTA DE RATO</i>	49

RESUMO	50
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 Reagentes	54
2.2 Amostragem animal e Sequenciamento de cDNA.....	54
2.3 Síntese, Purificação e Sequenciamento de Peptídeos	55
2.4 Potencial Antioxidante <i>in silico</i>	57
2.5 Ensaio químicos de atividade antioxidante	57
2.5.1 Ensaio antioxidante ABTS	58
2.5.2 Ensaio antioxidante DPPH	58
2.5.3 Ensaio antioxidante ORAC	59
2.6 Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	60
2.6.1 Ensaio de atividade hemolítica	60
2.6.2 Anti-hemólise induzida por AAPH	61
2.7 Ensaio de toxicidade em <i>Galleria mellonella</i>	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1 Material biológico e caracterização morfológica da pele de <i>P. centralis</i>	62
3.2 Clonagem Molecular do cDNA Precursor da Pele de <i>P. centralis</i>	63
3.3 Síntese de peptídeos, purificação e caracterização estrutural de PcT-1 e PpT-2 67	
3.4 Estudos de antioxidantes <i>in silico</i>	68
3.5 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	70
3.6 Teste de hemólise e anti-hemólise induzida por AAPH	71
3.7 Toxicidade de PcT-1 e PpT-2 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	72
3.8 Teste de disfunção endotelial induzida por pirogalol	73
4. CONCLUSÃO.....	75
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
CAPÍTULO III: EFEITOS NEUROPROTETORES SOBRE MICROGLIA E INSIGHTS SOBRE A RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE UM PEPTÍDEO ANTIOXIDANTE ISOLADO DE PELOPHYLAX PEREZI	
RESUMO	83
1. INTRODUÇÃO.....	84
2. MATERIAL E MÉTODOS	85
2.1 Purificação, caracterização e análise de sequência	85
2.2 Estudos computacionais: Isomerização <i>cis-trans</i> e propriedades antioxidantes 87	

2.3	Síntese e quantificação do peptídeo.....	88
2.4	Ensaio antibacterianos e de captura de radicais livres <i>in vitro</i>	88
2.5	Análise intracelular de EROs e ERNs por Citometria de Fluxo.....	88
2.6	Ensaio de citotoxicidade em células humanas	89
2.6.1	Ensaio de hemólise em células sanguíneas humanas	89
2.6.2	Ensaio de viabilidade celular de uma linha celular microglial humana	89
2.6.3	Ensaio de viabilidade celular de uma linha celular de câncer de próstata humana	90
2.7	Toxicidade <i>in vivo</i> em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	91
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
3.1	Morfologia das glândulas e identificação de PpT-2	91
3.2	Análise estrutural teórica sobre a conformação de prolina em PpT-2.....	93
3.3	Ensaio antimicrobianos de PpT-2.....	95
3.4	Propriedades antioxidantes de PpT-2	96
3.5	Estudos de citotoxicidade e toxicidade <i>in vivo</i> de PpT-2	99
3.6	Atividade neuroprotetora do PpT-2	102
4.	CONCLUSÃO	104
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
	Anexos	112

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

	Pág.
Figura 1. O fluxo de trabalho para a análise bibliométrica sistemática de proteínas antioxidantes das classe triptofilinas (TC). A coleta de dados de publicações relacionadas à TC foi extraída da base de dados SciVerse Scopus, por meio de um conjunto de palavras-chave com sentido semelhante ou igual à classe tryptophilin e frog/frogs.....	27
Figura 2. Número publicações extraída da base de dados SciVerse Scopus no período de 1984 a 2025, relacionado com o número de citações por ano.....	29
Figura 3. Número de artigos publicados por país entre 1984 a 2025 com a temática de triptofilinas.....	30
Figura 4. Instituições atuantes em pesquisas sobre triptofilinas. Total de publicações de cada instituição entre 1984 e 2025.....	31
Figura 5. Periódicos mais produtivos dentre o total de artigos selecionados para a pesquisa.....	32
Figura 6. Rede de autores e conexões entre clusters. Cada nó na rede representa um autor, e as conexões entre os nós representam colaborações entre esses autores. A rede está dividida em três clusters principais, indicados por cores diferentes: verde, azul e vermelho.....	34
Figura 7. Rede de autores citados e conexões entre clusters. Cada nó na rede representa um autor, e as conexões entre os nós indicam as citações entre esses autores. A cor dos nós e das conexões indica diferentes clusters de citações, sugerindo grupos de autores que frequentemente citam uns aos outros.....	35
Figura 8. Rede de palavras-chave mais encontradas nos artigos. Cada nó na rede simboliza uma palavra-chave, e as conexões entre os nós indicam a frequência com que essas palavras-chave aparecem juntas em documentos. As cores diferentes correspondem a clusters de palavras-chave relacionadas tematicamente.....	36

CAPÍTULO II

	Pág.
Figura 9. Locais de coleta dos espécimes estudados. (A) Mapa do Brasil (TO), (B) Estado do Tocantins, onde os espécimes de <i>Physalaemus centralis</i> foram coletados. (C) Adulto de <i>P. centralis</i> (Foto: José S.A. Leite). (D) Fotomicrografias da pele de <i>P. centralis</i> mostrando a variedade de glândulas: serosas, seromucosas e mucosas (400×). (E) Ampliações maiores da porção apical das glândulas com glândulas granulares e seu ducto secretor (1000 ×). Em destaque os (gd) ductos glandulares e as (mc) glândulas mucosas. (e) epiderme. (sg) glândula serosa. Coloração de ácido periódico de Schiff (PAS).....	55
Figura 10. Sequências de cDNA dos precursores de peptídeos. (A) Esquema básico de uma sequência de precursor de peptídeo. (B) Sequência de cDNA e sequências de aminoácidos previstas de PcT-1. (C) Sequência de cDNA e sequências de aminoácidos previstas de PpT-2. Peptídeo sinal (verde), peça ácida (laranja) e peptídeo maduro (azul). Polimorfismos nucleotídicos estão destacados em vermelho. O ponto preto indica o códon de parada.....	64

Figura 11: Peptídeos sintéticos de triptofilina. **(A)** Espectros MS/MS de PcT-1, $[M+H]^+ = 1031,4983$ Da com a sequência de aminoácidos FPPEWISR. **(B)** Espectros MS/MS de PpT-2, $[M+H]^+ = 761,5078$ Da com a sequência de aminoácidos FPWLLS-NH₂..... 67

Figura. 12. Razão de doação / aceitação de elétrons de vários peptídeos derivados de anfíbios e outros antioxidantes de baixo peso molecular. **(A)** PcT-1 e PpT-2 foram comparados com antioxidina-I, salamandrina-I, glutatona, melatonina, vitamina C, vitamina E e trolox. **(B)** Representação molecular 3D de PcT-1, PpT-2, salamandrina-I protonado (S-I) e antioxidina-I. Esquema de cores dos átomos: cinza **(C)** vermelho (O) e branco (H). Representação em cores dos índices Fukui condensados para reações com nucleófilos (f^+), eletrófilos (f^-) e radicais livres (f^0). As cores vermelha e azul representam locais reativos e não reativos, respectivamente. Outras cores representam situações intermediárias, seguindo uma escala RGB. 69

Figura 13. Efeito citotóxico de PcT-1 **(A)** e PpT-2 **(B)** em eritrócitos humanos. Os valores são expressos como média $\pm$ SEM. Efeito de PcT-1 **(C)** e PpT-2 **(D)** na inibição da hemólise após exposição por 3 h com AAPH. Os valores são expressos como média $\pm$ SEM. **** $p < 0,0001$ versus grupo controle Trolox representado pela linha tracejada. Imagem comparativa de microscopia de luz (100X) entre eritrócitos humanos submetidos ao controle PBS **(E)**, PcT-1 **(F)** e PpT-2 **(G)**. As lâminas ilustram a ausência de alterações na morfologia das células vermelhas tratadas com 1,6 mg/mL de PcT-1 ou PpT-2. 71

Figura 14: Ensaio de toxicidade *in vivo*. **(A)** Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* avaliando a toxicidade de PcT-1 e PpT-2 a 10, 20 e 40 mg/kg durante 7 dias, com PBS usado como controle do ensaio de toxicidade. Seção longitudinal de *G. mellonella* em coloração Azan. **(B)** Larvas tratadas com PBS. **(C)** Larvas tratadas com PcT-1. **(D)** Larvas tratadas com PpT-2..... 73

Figura 15. Efeito de PcT-1 e PpT-2 na disfunção endotelial induzida por pirogálico na aorta torácica de rato. Curvas de resposta concentração versus ACh na presença de veículo, pirogálico (PYR, 3×10^{-5} M) e PcT-1 **(A)** ou PpT-2 **(B)**. Os pontos representam média $\pm$ SEM. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo veículo e o octothorpe (#) indica diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo Pyrogallol + Vehicle ($p < 0,05$). Veículo refere-se ao efeito da acetilcolina na solução de Krebs sem PcT-1 ou PpT-2, enquanto Pyrogallol + Vehicle indica o efeito da acetilcolina após pré-incubação com pirogálico na solução de Krebs, também sem PcT-1 ou PpT-2..... 74

CAPÍTULO III

Pág.

Figura 16. (A, B) Exemplares adultos de *Pelophylax perezi* (López-Seoane 1885) mostrando polimorfismo na pigmentação da pele com diferentes padrões de cores. (Fotos: Peter Eaton). **(C)** Habitat típico de *P. perezi* no arquipélago dos Açores é um pequeno corpo de água permanente (Ilha de Santa Maria, Açores, Portugal). (Foto: José Leite). **(D)** Mapa de distribuição das coletas de *P. perezi* neste trabalho no arquipélago dos Açores (ilhas de São Miguel e Santa Maria). **(E)** Detalhe de *P. perezi* mostrando a área da região dorsal do animal, com maior predominância de tecido glandular, onde a análise histológica foi realizada. **(F)** Fotomicrografias da pele de *P. perezi*, mostrando a epiderme superficial e a derme dividida em uma camada subepitelial frouxa e uma camada profunda densa. O tecido epitelial é do tipo pavimentoso estratificado [epitélio pavimentoso (EP)], formado por até quatro camadas de células (barra de escala: 200 μ m) (H&E: coloração de hematoxilina e eosina). **(G)** Na derme frouxa, há inúmeras glândulas alveolares simples, serosas (estrela verde) e mucosas (estrela amarela), e granulação densa de melanina dispersa (M) entre os alvéolos (F e G) (Figura 2C, barra: 200 μ m). Na derme profunda, os feixes de fibras de colágeno exibem disposição não modificada e os núcleos dos fibroblastos dispersos 86

na matriz extracelular. Glicoproteínas e mucopolissacarídeos foram marcados por reagente de Schiff (ácido periódico de Schiff, PAS). **(H)** Cromatograma de HPLC em fase reversa do extrato bruto da secreção da pele de *P. perezi*. A absorvância da amostra foi monitorada em 216 (linha preta) e 280 nm (linha vermelha) em unidades arbitrárias (a.u.). As frações contendo PpT-2 são indicadas pela seta azul. **(I)** Espectros MS/MS de PpT-2, $[M+H]^+ = 761,4$ Da, adquiridos em um MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme; sequência de aminoácidos FPWL/IL/IS-NH₂.....

Figura 17. Comparação entre PpT-2 com resíduos de prolina cis e trans. **(A)** Distribuição dos ângulos diédricos, **(B)** energias totais, **(C)** distribuições de energia total em função das distâncias cabeça-cauda, **(D)** estrutura dos conformers mais estáveis, **(E)** área da superfície molecular e **(F)** volume molecular.

95

Figura 18. **(A)** Relação de doação/aceitação de elétrons de PpT-2 e salamandrina-I protonada comparada aos valores da literatura. **(B)** Representação molecular 3D de PpT-2 e salamandrina-I protonada, esquema de cores dos átomos: cinza **(C)**, vermelho (O), azul (N) e branco (H). Representação em cores dos Índices de Fukui condensados para reações com nucleófilos (f^+), eletrofílicos (f^-) e radicais livres (f^0). As cores vermelha e azul representam locais reativos e não reativos, respectivamente. Outras cores representam situações intermediárias, seguindo uma escala RGB..

97

Figura 19. Estudo comparativo da suavidade química local da salamandrina-I protonada e do PpT-2 em relação ao H₂O₂, OH• e HOO•. Atividades antioxidantes: **(A)** Antioxidantes como eletrófilos (s^+). **(B)** Antioxidantes como nucleófilos (s^-). **(C)** Antioxidantes como sequestradores de radicais livres (s^0).

98

Figura 20. **(A)** Atividade hemolítica determinada para concentrações crescentes de PpT-2 contra hemácias humanas. A hemólise de 0% e 100% foi definida com base nos valores de absorvância obtidos para os controles negativo (tampão) e positivo (Triton X-100 0,1%), respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata. **(B)** Estudos de citotoxicidade do PpT-2 em células microgliais humanas, utilizando concentrações de 0,1 a 100 µM após 24 horas de incubação. **(C)** Efeito do peptídeo PpT-2 na viabilidade da linhagem celular de câncer de próstata PC3, com concentrações variando de 10 a 400 µM, após 48 e 72 horas de incubação. Os dados foram normalizados utilizando a viabilidade celular das células controle não tratadas, definida como 100% e representada pela linha cinza tracejada. O asterisco (*) denota uma diferença significativa em comparação com as células controle não tratadas ($p < 0,05$, ANOVA unidirecional seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett, usando células não tratadas como grupo de referência para cada tempo de incubação). IC50 refere-se à concentração inibitória média. **(D)** Curva de sobrevivência de *Galleria mellonella* usando o teste de Mantel-Cox (log-rank) na presença de diferentes doses de PpT-2, avaliadas ao longo de sete dias. Curvas de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* tratadas com 10, 20 e 40 mg/kg de PpT-2. Todas as larvas foram injetadas com 10 µl de diferentes doses de PpT-2. Dados provenientes de dois experimentos, $n = 16$ para todos os grupos. **(E)** Larvas representativas dos grupos, nos dias 0 e 7 após o tratamento; a ausência de mielinização demonstra boas condições fisiológicas.....

100

Figura 21. O PpT-2 exibe propriedades antioxidantes e neuroprotetoras em células de microglia de camundongo (BV-2). **(A)** Linha do tempo do ensaio. **(B e C)** A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) em células BV-2 de microglia de camundongo foi induzida por forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e tratada com peptídeos nas concentrações de 50 e 100 µM. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Primeiramente, as células tratadas com PMA foram comparadas com aquelas mantidas apenas com meio de cultura, utilizando um teste t não pareado (o símbolo "#" indica uma diferença significativa, $p < 0,05$). Em seguida, foi realizada uma ANOVA unidirecional seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett, usando células controle não tratadas (o símbolo "\$" indica uma diferença significativa, $p < 0,05$) ou células controle tratadas com PMA (o asterisco "*" indica uma diferença significativa, $p < 0,05$) como grupo de referência.....

104

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

	Pag.
Tabela 1. Lista dos dez artigos mais citados dentre as análises (1984 – 2025), mostrando a qual periódico pertence, autores, ano de publicação e o número de citações. Fonte: Retirado diretamente do Scopus.....	33
Tabela 2. Lista completa dos 39 artigos encontrados através de pesquisa pelo Scopus com as palavras-chave relacionadas a <i>tryptophyllins</i> e <i>fros/frogs</i> dentre os anos de 1984 a 2025.....	41

CAPÍTULO II

	Pág.
Tabela 3. Estruturas primárias e origem dos peptídeos triptofilinas de anfíbios.....	65
Tabela 4. Capacidade de captura de radicais livres de PcT-1 e PpT-2 avaliada com diferentes ensaios <i>in vitro</i> : o ensaio de captura do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), o ensaio de captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), o ensaio de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e o ensaio de captura de óxido nítrico (NO). Os resultados são expressos como mg de equivalente de Trolox por mg de peptídeo.....	70

CAPÍTULO III

	Pag.
Tabela 5. Estruturas primárias, origem e parâmetros físico-químicos das triptofilinas de anfíbios.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AAPH	2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) di-hidrocloreto
ANOVA	Análise de Variância (<i>Analysis of Variance</i>)
BV-2	Linha celular de micróglia murina BV-2
cDNA	DNA complementar (<i>Complementary DNA</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila (Diphenylpicrylhydrazyl)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DAM	Mapa doador-receptor (<i>Donor- Acceptor Map</i>)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
Fmoc	Fluorenilmetoxycarbonila
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
MALDI MS/MS	Espectrometria de Massas por Dessorção/Ionização a Laser Assistida por Matriz com Análise em Tandem (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry</i>)
NO	Óxido Nítrico
ORAC	Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>)
PBS	Solução Salina Tampão de Fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
RNA	Ácido Ribonucleico
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (<i>Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>)
SciVerse Scopus	Base de dados acadêmica SciVerse Scopus
SPPS	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>)
VOSViewer	Software de visualização de redes bibliométricas

Tabela de aminoácidos naturais

Aminoácido	Código de três letras	Código de uma letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

INTRODUÇÃO

A pele dos anfíbios desempenha um papel fisiológico fundamental para sua sobrevivência que inclui a troca gasosa, excreção, termorregulação e reprodução, além disso acredita-se que estes animais desenvolveram uma série de adaptações para tolerar condições de congelamento, como também para evitar a dessecação nas áreas de deserto (CLARKE, 1997; YANG, 2009; XU, 2015). É relatado que a pele possui mecanismos de defesa eficientes contra ataques predatórios e microrganismos, associados a substâncias produzidas em glândulas especializadas (ZASLOFF, 1987). Existem dois tipos de glândulas presentes na pele dos anfíbios, sendo elas classificadas em mucosas e granulares, a primeira se caracteriza por manter a pele úmida, escorregadia e prevenir danos, tendo potencial bactericida e antifúngico. Já a glândula granular é responsável por sintetizar compostos químicos que trazem proteção contra patógenos, microrganismos e ataque de predadores (YANG, 2009; XU, 2015). Dentre essas substâncias, foram identificados pequenos peptídeos responsáveis por exibir propriedades antimicrobianas, que ao mesmo tempo exibiram outras atividades como inibição de peptidases, atividade vasodilatadora, atividade antioxidante e anticâncer (MIGNOGNA et al., 2008; BARBOSA et al., 2018; CANCELARICH, 2019; PLÁCIDO, 2020).

Existem algumas categorias de compostos estudados encontrados nas glândulas granulares dos anfíbios, incluindo as aminas biogênicas, bufadienólidos, alcalóides, esteróides e peptídeos (CLARKE, 1997). Peptídeos contendo triptofano desempenham um papel na defesa do hospedeiro; e destes, as triptofilinas, foram relatadas como ativas em testes *in vitro* e *in vivo*, como efeito antimicrobiano (GE et al., 2014), atividade miotrópica (HUAN, 2020, GE et al., 2014), e atividade antiproliferativa contra células cancerosas (WANG et al., 2015).

As triptofilinas são um grupo de peptídeos geralmente com 4, 5, 7, 10 ou 13 resíduos de aminoácidos, que possuem triptofano, e alguns com modificações pós-tradução (grupo ácido C- terminal amidado e/ou N-terminal contendo uma glutamina cíclica similar a um resíduo de ácido piroglutâmico) (CHEN et al., 2004). Uma característica adicional é a presença de uma ou duas prolinas ligadas ao resíduo triptofano, geralmente localizadas na extremidade da parte N-terminal. Estes foram identificados a partir da pele de rãs do gênero *Phyllomedusa* sp., abundantemente nas espécies *Pithecopus rohdei* e *Pithecopus hypochondrialis*; bem como na *Litoria rubella*

(MONTECUCCHI, 1985; STEINBORNER, 1994; CHEN et al., 2004; WANG et al., 2015).

Embora algumas propriedades biológicas das triptofilinas tenham sido descritas, há dúvidas sobre o real papel dentro do complexo molecular que constitui a secreção da pele de anuros. No entanto, alguns pesquisadores atribuem à pele dos anfíbios um sistema eficiente com potencial antioxidante, uma vez que estes se caracterizam pela movimentação entre os ambientes aquático e terrestre, expondo-se assim a diferentes níveis de O₂ e radiação solar, o que certamente induz a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (YANG et al., 2009). Em geral, essas variações drásticas de níveis de O₂ e radiação UV estão associadas a uma maior produção de EROs (GUO et al., 2014; WANG et al., 2017; YANG et al., 2009).

EROs são constantemente produzidos por vias celulares incluindo a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e reações enzimáticas, e que a taxa de formação pode ser influenciada diretamente por ação de estímulos intra e extracelulares. Desta forma, alguns eventos podem vir a superar a capacidade de controle de EROs levando a um desequilíbrio redox e o acúmulo de biomoléculas resulta no stress oxidativo, no qual é o associado a várias doenças degenerativas em humanos como Alzheimer, Parkinson, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (BERGGREN et al., 2015; HARDAS et al., 2013; HOU et al., 2017).

A pele é um dos tecidos corporais mais expostos ao estresse e requer certos mecanismos para lidar com essa pressão (SHINDO et al., 1993; YANG et al., 2009). Como a secreção da pele dos anfíbios pode ser utilizada como fonte de peptídeos antioxidantes, esta tese teve por objetivo a prospecção de peptídeos bioativos com atividade antioxidante oriundos da pele do anfíbio *Physalaemus centralis*, uma espécie de rã da América do Sul e *Pelophylax perezi*, encontrada em toda a Península Ibérica alcançando o seu limite setentrional no Sul de França. Para isto, foram usadas técnicas de biologia molecular, cromatográficas, e de espectrometria de massa. Adicionalmente, foram realizados ensaios *in silico*, testes antioxidantes, avaliação do efeito tóxico sobre hemácias humanas e ensaios *in vivo* em *Galleria mellonella* para avaliar a citotoxicidade dos peptídeos isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, E. A.; IEMBO, T.; MARTINS, G. R.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; ANDRADE, A. C., et al., Skin secretion peptides: the molecular facet of the deimatic behavior of the four-eyed frog, *Physalaemus nattereri* (Anura, Leptodactylidae), **Rapid Communications in Mass Spectrom.** 29 (2015) 2061–2068.

BERGGREN, K.L.; CHEN, J.; FOX, J.; MILLER, J.; DODDS, L.; DUGAS, B., et al., Neonatal iron supplementation potentiates oxidative stress, energetic dysfunction and neurodegeneration in the R6/2 mouse model of Huntington's disease, **Redox Biology.** 4 (2015) 363–374.

CANCELARICH, N.L.; WILKE, N.; FANANI, M.L.; MOREIRA, D.C.; PÉREZ, L., et al. Somuncurins: Bioactive Peptides from the Skin of the Endangered Endemic Patagonian Frog *Pleurodema somuncurens*, **Journal of Natural Products** (2020) 83 (4), 972-984 DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00906

CHEN, T.; ORR, D.F.; O'ROURKE, M.; MCLYNN, C.; BJOURSON, A., et al. *Pachymedusa dactylophora* tryptophyllin-1: structural characterization, pharmacological activity and cloning of precursor cDNA, **Regulatory Peptides**, v. 117, Issue 1, (2004), pages 25-32, ISSN 0167-0115.

CLARKE, B.T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications, **Biological Reviews.** 72 (1997) 365–379.

GE, L.; LYU, P.; ZHOU, M.; ZHANG, H.; WAN, Y et al., "AcT-2: A Novel Myotropic and Antimicrobial Type 2 Tryptophyllin from the Skin Secretion of the Central American Red-Eyed Leaf Frog, *Agalychnis callidryas*", **The Scientific World Journal**, (2014) vol. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/158546>

GUO, C.; HU, Y.; LI, J.; LIU, Y.; LI, S.; YAN, K., et al., Identification of multiple peptides with antioxidant and antimicrobial activities from skin and its secretions of *Hylarana taipehensis*, *Amolops lifanensis*, and *Amolops granulatus*, **Biochimie** 105 (2014) 192–201.

HARDAS, S. S.; SULTANA, R.; CLARK, A. M.; BECKETT, T. L.; SZWEDA, L. I.; MURPHY, M. P., et al., Oxidative modification of lipoic acid by HNE in Alzheimer disease brain, **Redox Biology.** 1 (2013) 80–85.

HUAN, Y.; KONG Q.; MOU, H.; YI H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Front. Microbiol.** (2020) 11:582779. doi: 10.3389/fmicb.2020.582779

MIGNOGNA, G.; PASCARELLA, S.; AMICONI, G.; BARRA, D.; WECHSELBERGER, C.; HINTERLEITNER, C. et al., BSTI, a trypsin inhibitor from skin secretions of *Bombina bombina* related to protease inhibitors of nematodes, **Protein Science**. 5 (2008) 357–362.

MONTECUCCHI, P.C Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins, *Peptides*, (1985) 6 (SUPPL. 3), 187–195. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90373-0](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90373-0)

PLÁCIDO, A; BUENO, J; BARBOSA, E.A; MOREIRA, D.C; DIAS, J.N; CABRAL, W.F; et al., The Antioxidant Peptide Salamandrin-I: First Bioactive Peptide Identified from Skin Secretion of Salamandra Genus (*Salamandra salamandra*). **Biomolecules** (2020) 10,512. <https://doi.org/10.3390/biom10040512>

STEINBORNER, S.T.; GAO, C.W.; RAFTERY, M.J.; WAUGH, R.J.; BLUMENTHAL, T.; BOWIE, J.H.; WALLACE, J.C.; TYLER, M.J. (1994) The Structures of Four Tryptophyllin and Three Rubellidin Peptides from the Australian Red Tree Frog *Litoria rubella*. **Aust. J. Chem.** 47, 2099-2108.

WANG, X.; REN, S.; GUO, C.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; ZHANG, B., et al., Identification and functional analyses of novel antioxidant peptides and antimicrobial peptides from skin secretions of four East Asian frog species, **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**. 49 (2017) 550– 559.

XU, X.; LAI, R., The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions, **Chemical Reviews**. 115 (2015) 1760–1846.

YANG, H.; WANG, X.; LIU, X.; WU, J.; LIU, C. GONG, W., et al., Antioxidant peptidomics reveals novel skin antioxidant system, **Molecular & Cellular Proteomics**. 8 (2009) 571–583.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor, **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA 84 (1987) 5449–5453.

**CAPÍTULO I: ANÁLISE BIBLIOMÉTRICA DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA
SOBRE TRIPTOFILINAS: TENDÊNCIAS E CONTRIBUIÇÕES**

Review em preparação

RESUMO

O estudo aborda a importância das triptofilinas, peptídeos amplamente reconhecidos por suas diversas propriedades biológicas, especialmente em anfíbios. As triptofilinas possuem atividades miotrópicas, vasodilatadoras, antibacterianas e antioxidantes, destacando-se na biotecnologia, farmacologia e medicina. A análise bibliométrica, e o uso de ferramentas como VOSviewer, teve por objetivo mapear colaborações científicas e entender a estrutura da pesquisa sobre esses peptídeos, como também para analisar a produção acadêmica e identificar tendências de pesquisa. A pesquisa bibliográfica foi realizada na base de dados SciVerse Scopus, utilizando palavras-chave específicas e filtros que resultaram em 39 publicações estritamente relacionadas ao tema até fevereiro de 2025. Predominam artigos científicos (92,3%), com uma baixa porcentagem de acesso aberto (23%). Além das triptofilinas, o estudo identificou outras classes de peptídeos em anfíbios, como bradiginina e defensinas. Os resultados mostram que, apesar do declínio recente em publicações, o estudo das triptofilinas continua relevante, com potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos devido às suas propriedades antimicrobianas e mioativas. A diversidade geográfica e metodológica dos estudos contribui para uma compreensão ampla das defesas dos anfíbios e suas aplicações biotecnológicas e pode direcionar futuras pesquisas e valorizar o potencial biotecnológico das triptofilinas.

Palavras-chave: secreção de anfíbios, pele de rã, peptídeo antioxidante, peptídeo bioativo, triptofilina.

1. INTRODUÇÃO

As triptofilinas são peptídeos amplamente reconhecidos pela comunidade científica devido às suas diversas propriedades biológicas, especialmente aquelas associadas a anfíbios (TRAN et al., 2021). O crescente interesse por esses compostos se deve, em grande parte, à recente identificação de suas atividades miotrópicas, vasodilatadoras, antibacterianas e antioxidantes, o que reforça sua relevância para pesquisas nas áreas de biotecnologia, farmacologia e medicina (YANG et al., 2009; XU et al., 2015; BARBOSA et al., 2015). Além disso, essas biomoléculas desempenham um papel essencial na defesa contra o estresse oxidativo, tornando fundamental a compreensão dos seus mecanismos de ação. Considerando sua notável diversidade estrutural e funcional, a investigação das triptofilinas pode abrir novas perspectivas para aplicações terapêuticas e biotecnológicas (GE et al., 2014).

A análise bibliométrica é uma ferramenta fundamental para mapear a produção acadêmica, identificar tendências de pesquisa, redes de colaboração, autores de maior impacto e possíveis lacunas no conhecimento (VAN ECK & WALTMAN et al., 2010). Esse método permite quantificar e visualizar padrões na literatura científica, oferecendo uma visão abrangente da evolução e das principais contribuições no estudo das triptofilinas. Embora muitos artigos tenham sido publicados sobre os peptídeos da classe das triptofilinas, poucos estudos buscaram sintetizar o avanço das pesquisas nesse campo. Considerando a relevância das triptofilinas como peptídeos antioxidantes presentes em anuros e seu potencial terapêutico, torna-se essencial realizar uma revisão abrangente da literatura (MONTECUCCHI et al., 1985). Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo realizar uma análise bibliométrica da produção científica sobre triptofilinas, utilizando bases de dados especializadas para identificar tendências de publicação, principais países e instituições envolvidas, além das áreas de aplicação mais exploradas.

A compreensão desses aspectos pode contribuir para mapear e compreender o panorama científico sobre essas biomoléculas, contribuindo para a identificação de tendências, lacunas de conhecimento e direcionamento de futuras pesquisas. Dessa forma, o presente estudo visa valorizar o potencial biotecnológico desses peptídeos, impulsionando novas descobertas e aplicações. A análise bibliométrica é uma ferramenta fundamental para mapear a produção acadêmica, identificar tendências de pesquisa, redes

de colaboração, autores de maior impacto e possíveis lacunas no conhecimento (VAN ECK & WALTMAN et al., 2010). Esse método permite quantificar e visualizar padrões na literatura científica, oferecendo uma visão abrangente da evolução e das principais contribuições no estudo das triptofilinas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo adota uma abordagem integrada para avaliar as pesquisas existentes sobre peptídeos antioxidantes, com ênfase nas proteínas da classe das triptofilinas, conforme indexadas na base de dados Scopus®. O mapeamento científico da classe das triptofilinas abrange dados bibliométricos, análise dos principais autores e instituições da área, além de uma discussão sobre os principais tópicos de pesquisa em circulação.

2.1 Levantamento bibliográfico

A busca bibliométrica por publicações relacionadas às proteínas da classe das triptofilinas foi conduzida por meio da base de dados *SciVerse* Scopus, uma das principais ferramentas de busca para literatura acadêmica. Essa plataforma proporciona um alcance de dados mais abrangente em comparação com outras fontes digitais, como Science® e ScienceDirect®. A pesquisa bibliográfica foi iniciada a partir da inserção das seguintes palavras-chave no Scopus®:

TITLE-ABS-KEY ("ALL (tryptophyllin AND (frog OR frogs)) AND (LIMIT-TO (DOCTYPE , "re") OR LIMIT-TO (DOCTYPE , "ar")) AND (LIMIT-TO (LANGUAGE , "English"))").*

A estratégia de busca das publicações concentrou-se exclusivamente em artigos de divulgação e artigos de revisão, ambos publicados em inglês até fevereiro de 2025. Outros tipos de documentos, como trabalhos de conferências, foram descartados da análise devido ao seu valor informacional geralmente limitado em comparação com artigos de periódicos revisados por pares (BUTLER & VISSER, 2006). Nossa abordagem é apresentada na Figura 1.

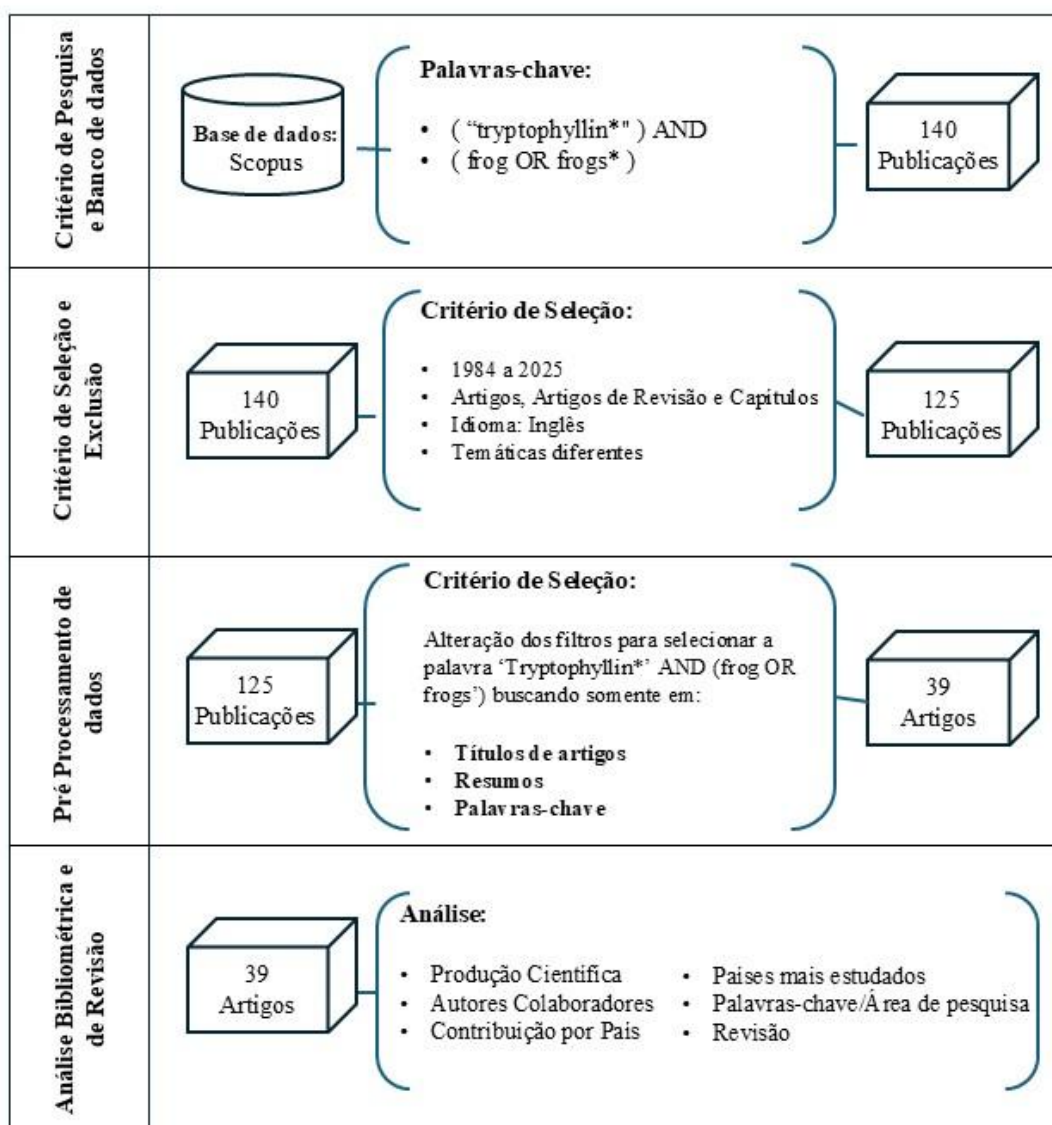


Figura 1. O fluxo de trabalho para a análise bibliométrica sistemática de proteínas antioxidantes das classe triptofilinas (TC). A coleta de dados de publicações relacionadas à TC foi extraída da base de dados SciVerse Scopus, por meio de um conjunto de palavras-chave com sentido semelhante ou igual à classe tryptophilin e frog/frogs.

2.2 Mapeamento científico

O mapeamento científico serve como uma ferramenta visual para analisar grandes volumes de dados, representando-os de várias formas, como conexões entre indivíduos ou grupos. Essa abordagem possibilita a identificação eficaz de dados fora do padrão, clusters e tendências emergentes. Ferramentas comumente usadas para gerar essas representações visuais incluem Pajek Gephi, UCINET, Citespace II, VOSviewer e SciMAT. Neste estudo, o VOSviewer, uma ferramenta de mineração de texto desenvolvida por VAN ECK & WALTMAN (2010) para criar visualizações baseadas em

distância de redes bibliométricas, foi usado para analisar e visualizar os dados coletados. A distância entre os nós na rede representa o nível de associação entre eles, com uma distância menor geralmente significando uma conexão mais forte. A ferramenta foi aplicada para alcançar os seguintes objetivos: 1) importar a amostra bibliográfica proveniente da base de dados Scopus; e 2) visualizar, calcular e avaliar o desempenho das revistas dentro deste campo de pesquisa.

3. RESULTADOS

Até 24 de fevereiro de 2025, um total de 140 documentos sobre o tema estavam disponíveis quando utilizados os filtros gerais da Base de dados da Scopus. Através de uma alteração nos filtros, selecionando a busca apenas nos títulos dos artigos, resumos e palavras-chaves nota-se uma análise mais rebuscada e precisa, contendo artigos estritamente relacionados com as palavras-chave escolhidas: “tryptophyllin” e “frog/frogs” somando um total de 39 publicações (Figura 1).

O tipo de publicação predominante é o formato de artigo com 36 publicações, representando 92,3 % do total, seguido por artigos de revisão (5,1%) e capítulos de livros (2,6%). Livros, revisões curtas, anais de revisão e outros tipos de documentos não tiveram nenhuma publicação referente a temática. A análise desses documentos revela que apenas 9 artigos (23%) das publicações na base de dados *SciVerse* Scopus são de acesso aberto.

Quanto à distribuição de idiomas, o inglês foi o idioma predominante, compreendendo 100% do total de publicações. Vale destacar que, durante as buscas por artigos relacionados à classe das triptofilinas, foram encontrados diversos estudos que descreviam a presença de outras classes de peptídeos: vasoativos (bradicinina, angiotensinas, endotinas), peptídeos antioxidantes (glutatona e carnosina), peptídeos miotrópicos (bombesina), e peptídeos antimicrobianos (defensinas e magaininas) em diferentes grupos de anfíbios, como cobras, salamandras e demais espécies.

3.1 Análise quantitativa quanto ao número de publicações e citações

Conforme mostrado na Figura 2, o primeiro documento sobre a descoberta de triptofilinas em anfíbios da classe de rãs foi publicado em 1984. O número de publicações anuais teve um crescimento significativo nos anos de 1985 e 2010. O total anual de

citações oscilou ao longo dos anos estudados, considerando que as maiores quantidades de citações ocorreram em 1985 (n=190) e 2004 (n=246), seguindo um declínio depois disso. Os declínios observados em relação ao número de artigos e citações pode ser associado ao grande volume de pesquisas publicadas nos últimos anos relacionadas a outras classes de peptídeos encontradas em outras classes de anfíbios que não foram o objeto do nosso estudo.

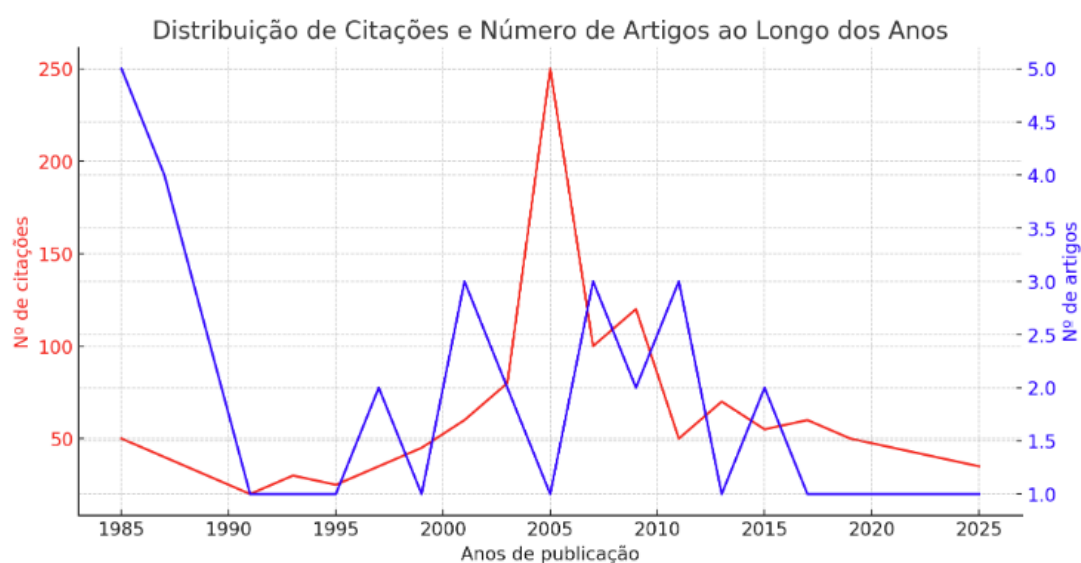


Figura 2. Número publicações extraída da base de dados SciVerse Scopus no período de 1984 a 2025, relacionado com o número de citações por ano.

3.2 Desempenho das publicações por país

O desempenho de publicações por países está listado na Figura 3, evidenciando a diversidade de países que contribuem para a produção científica nessa área de pesquisa (17 países). Analisando o maior número de artigos por país, contribuindo com 10 artigos relacionados à temática em questão está o Reino Unido (10), seguido da Austrália (9) e Itália (8).

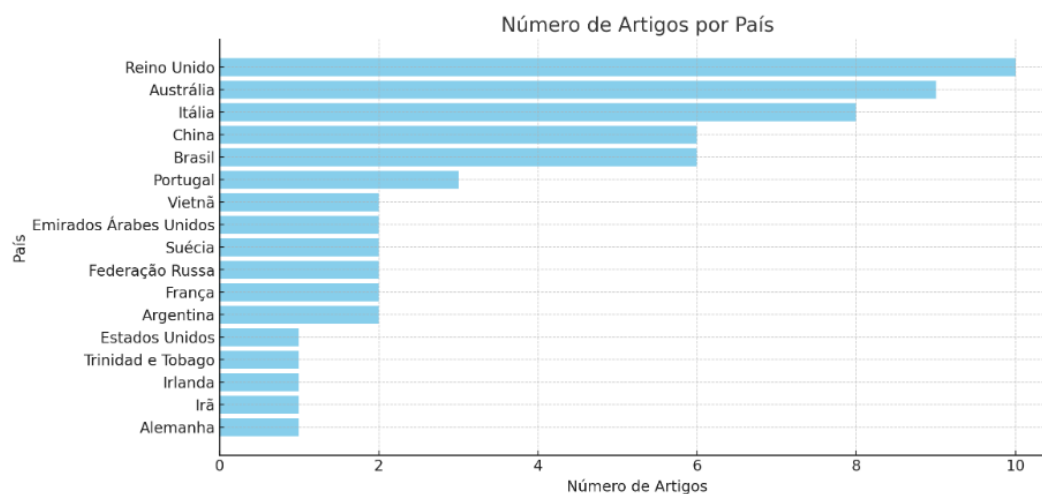


Figura 3. Número de artigos publicados por país entre 1984 a 2025 com a temática de triptofilinas.

3.3 Desempenho das publicações por instituição de ensino

As instituições brasileiras têm hegemonia neste estudo, com 4 das 15 instituições mais produtivas localizadas no Brasil. A Universidade de Adelaide (Austrália) lidera o desempenho de publicações quando considerado o maior número de artigos por instituição de ensino, contribuindo com 10 publicações relacionados à temática em questão. O desempenho das 15 instituições mais produtivas é apresentado na Figura 4, evidenciando quais são as instituições que contribuem para a produção científica nessa área de pesquisa.

Vale ressaltar que o número de artigos publicados por instituição não reflete o número total de artigos por país, justamente porque um artigo pode estar vinculado a diferentes instituições de ensino de um mesmo país.

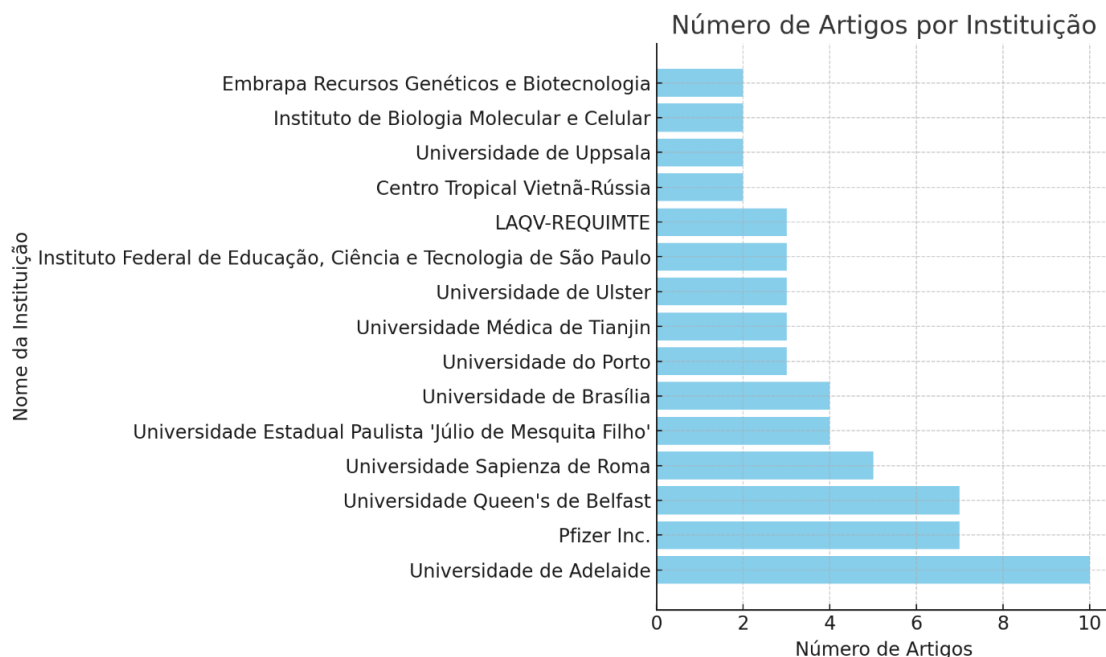


Figura 4. Instituições atuantes em pesquisas sobre triptofilinas. Total de publicações de cada instituição entre 1984 e 2025.

3.4 Desempenho de diferentes periódicos

Uma medida mais quantitativa da relevância dos periódicos é mostrada na Figura 5, em que são apresentados os dez periódicos mais produtivos, sendo classificados de acordo com o número de citações ao longo do período de 1984 a 2025. As publicações sobre triptofilinas estão claramente concentradas nos 4 primeiros periódicos mais produtivos, pois publicaram acima de 10% do número total de artigos (Figura 5). O periódico *Peptides* foi o periódico no qual mais publicou artigos (n=7) relacionados à temática até 2025, o que representam 17,95% do total de publicações.

Dentre as 39 publicações encontradas através de busca pela Scopus, a revista *Peptides* possui o maior número de publicações (7), seguidas das revistas *International Journal Of Peptide And Protein Research* (5), *Rapid Communications in Mass Spectrometry* e *Australian Journal of Chemistry* com o mesmo número de publicações (4).

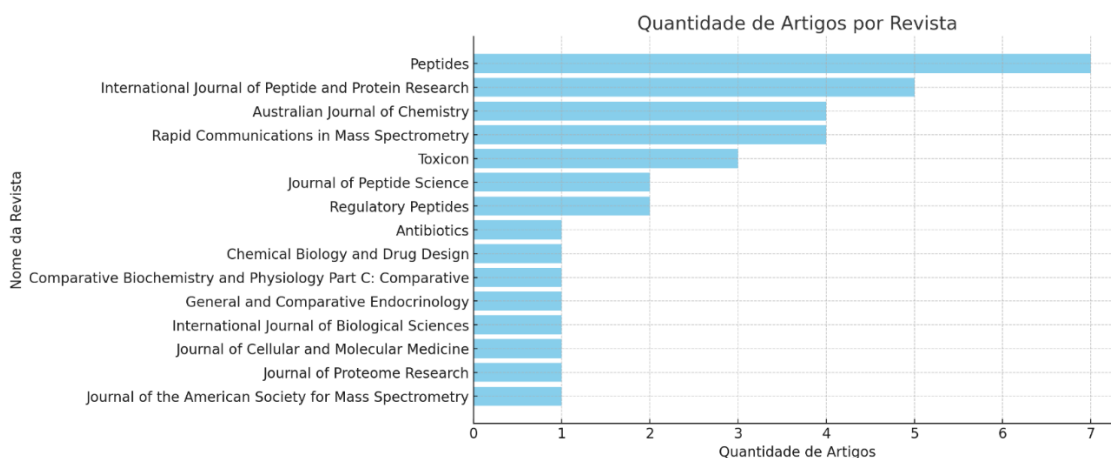


Figura 5. Periódicos mais produtivos dentre o total de artigos selecionados para a pesquisa

3.5 Análise dos artigos mais citados

Em relação ao número de artigos com maior impacto, dentre os 39 periódicos analisados, a revista *Peptides* apresentou o maior número de citações (205 citações) (Tabela 1). O segundo mais citado foi o *Comparative Biochemistry And Physiology Part C Comparative* com 96 citações, com 1 artigo, representando 2,56% do total de citações, constatando assim que nem sempre a revista com maior número de artigos estará no ranking dos mais citados, na sequência a revista *Regulatory Peptides* aparece como a terceira mais citada (41 citações). Dentre os periódicos mais produtivos 5 deles são da editora Elsevier: *Peptides*, *Toxicon*, *Regulatory Peptides*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative*, *General e Comparative Endocrinology*.

Nota-se que que artigos mais antigos possuem um número significativamente maior de citações (205 e 114, respectivamente). Isso pode ser atribuído ao fato de que esses artigos tiveram mais tempo para serem lidos, citados e incorporados em outras pesquisas justamente por serem pioneiros, logo artigos mais antigos que introduzem conceitos novos ou áreas de estudo tendem a ser amplamente citados porque são considerados fundamentais e referenciais em suas áreas. À medida que a comunidade científica reconhece a relevância e o impacto de certos estudos, esses artigos acabam sendo citados repetidamente ao longo dos anos (BOWIE et al.,2004).

Tabela 1. Lista dos artigos de maior impacto dentre as análises (1984 – 2025), mostrando a qual periódico pertence, autores, ano de publicação e o número de citações. Fonte: Retirado diretamente do Scopus.

Título do Artigo	Revista	Autores	Ano	Número de Citações
Host-defence peptides of Australian anurans: Structure, mechanism of action and evolutionary significance	<i>Peptides</i>	Apponyi, M.A., Pukala, T.L., Brinkworth, C.S., Doyle, J., Llewellyn, L.E.	2004	205
<i>Phyllomedusa</i> skin: A huge factory and store-house of a variety of active peptides	<i>Peptides</i>	Erspamer, V., Melchiorri, P., Falconieri Erspamer, G., Montecucchi, P.C., de Castiglione, R.	1985	114
Active peptides in the skins of two hundred and thirty American amphibian species	<i>Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative</i>	Erspamer, V., Erspamer, G.F., Cei, J.M.	1986	98
Host-defense peptides of Australian anurans. Part 2. Structure, activity, mechanism of action, and evolutionary significance	<i>Peptides</i>	Bowie, J.H., Separovic, F., Tyler, M.J.	2012	66
<i>Pachymedusa dactylorhiza</i> tryptophyllin-1: Structural characterization, pharmacological activity and cloning of precursor cDNA	<i>Regulatory Peptides</i>	Chen, T., Orr, D.F., O'Rourke, M., Rao, P., Shaw, C.	2004	41
N-Terminal Tagging Strategy for De Novo Sequencing of Short Peptides by ESI-MS/MS and MALDI-MS/MS	<i>Journal of the American Society for Mass Spectrometry</i>	Samgina, T.Yu., Kovalev, S.V., Gorshkov, V.A., Poljakov, N.B., Lebedev, A.T.	2010	38
Amphibian skin secretomics: Application of parallel quadrupole time-of-flight mass spectrometry and peptide precursor cDNA cloning to rapidly characterize the skin secretory peptidome of <i>Phyllomedusa hypochondrialis azurea</i> : Discovery of a novel peptide family, the hyposins	<i>Journal of Proteome Research</i>	Thompson, A.H., Bjourson, A.J., Orr, D.F., Shaw, C., McClean, S.	2007	37
Bradykinin-related peptides and tryptophyllins in the skin secretions of the most primitive extant frog, <i>Ascaphus truei</i>	<i>General and Comparative Endocrinology</i>	Conlon, J.M., Jouenne, T., Cosette, P., Taylor, C.K., Abel, P.W.	2005	37
Primary structure of tryptophan-containing peptides from skin extracts of <i>Phyllomedusa rhodei</i> (tryptophyllins)	<i>International Journal of Peptide and Protein Research</i>	Montecucchi, P.C., Gozzini, L., Erspamer, V., Melchiorri, P.	1984	31
Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins	<i>Peptides</i>	Montecucchi, P.C.	1985	27

3.6 Análise de rede de autores

3.6.1 Relação co-autores e autores

A figura 6 mostra uma rede de coautoria de autores obtida através do software VOSviewer. Cada nó na rede representa um autor, e as conexões entre os nós representam colaborações entre esses autores. A rede está dividida em três clusters principais,

indicados por cores diferentes: verde, azul e vermelho. As palavras-chave representam os principais conteúdos de estudos existentes e descrevem

os tópicos que foram focados em um determinado domínio. Os clusters gerados mostram as relações de colaboração entre diferentes autores, permitindo identificar grupos de pesquisa, e a intensidade das colaborações. Isso pode ser útil para entender a estrutura de uma comunidade científica e identificar autores centrais ou periféricos em uma rede de pesquisa. Nesta figura podemos observar que os maiores nós são identificados como autores mais relevantes dentre os artigos publicados.

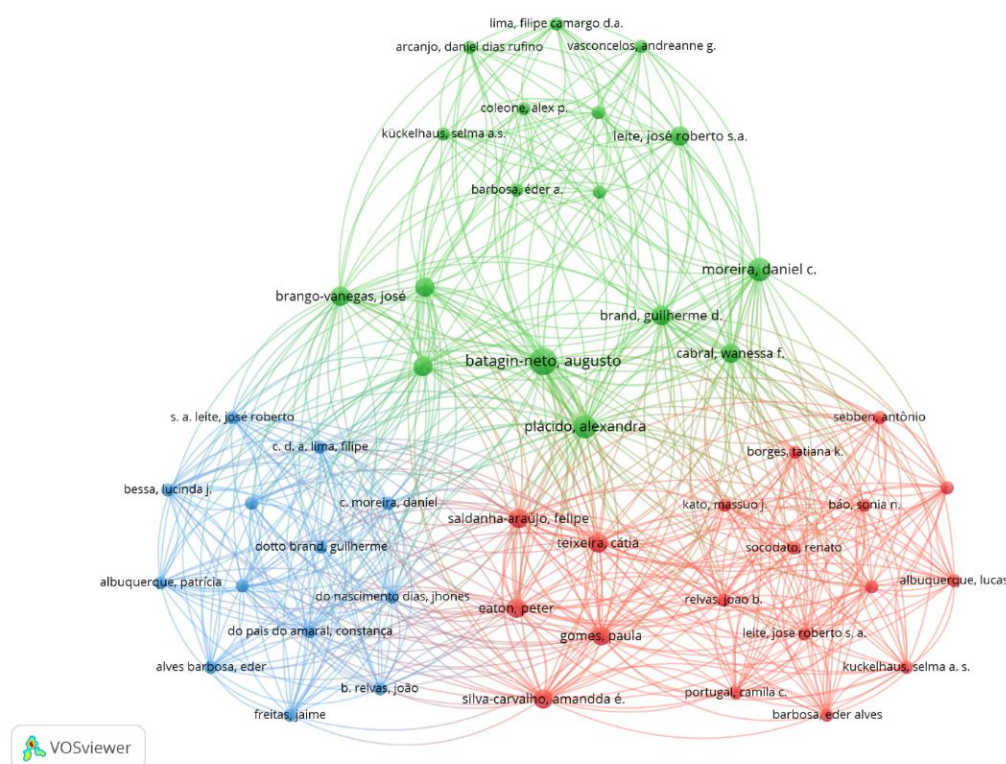


Figura 6. Rede de autores e conexões entre clusters. Cada nó na rede representa um autor, e as conexões entre os nós representam colaborações entre esses autores. A rede está dividida em três clusters principais, indicados por cores diferentes: verde, azul e vermelho

3.6.2 Relação de citação e artigos

A figura 7 mostra um mapa de citações de autores gerado pelo software VOSviewer. Cada nó na rede representa um autor, e as conexões entre os nós indicam as citações entre esses autores. A cor dos nós e das conexões indica diferentes clusters de citações, sugerindo grupos de autores que frequentemente citam uns aos outros. Os autores com maior quantidade de citações na rede são: Erspamer (1985), Erspamer

(1986), Apponyi (2004), Chen (2004) e Conlon (2005). Esses autores são centrais no mapa, com muitas conexões para outros autores, indicando que são frequentemente citados em trabalhos acadêmicos.

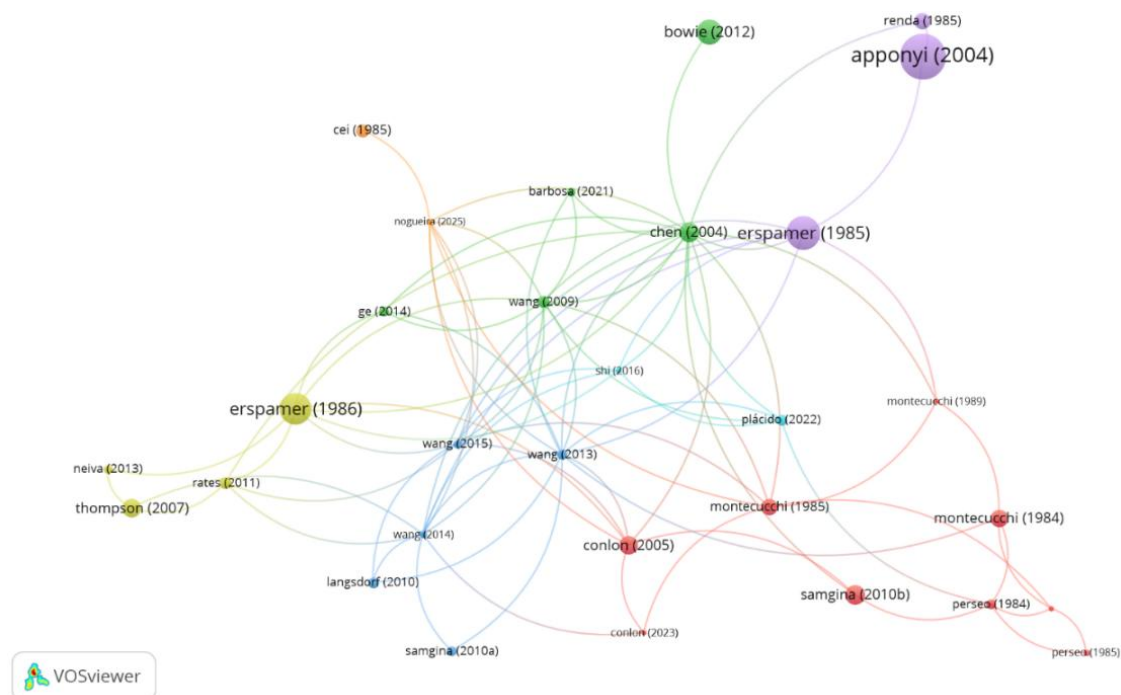


Figura 7. Rede de autores citados e conexões entre clusters. Cada nó na rede representa um autor, e as conexões entre os nós indicam as citações entre esses autores. A cor dos nós e das conexões indica diferentes clusters de citações, sugerindo grupos de autores que frequentemente citam uns aos outros

3.7 Análise de rede de palavras-chave

A figura 9 representa um mapa de rede de palavras-chave gerado pelo software VOSviewer. Essas palavras-chave foram extraídas de um conjunto de dados e agrupadas com base em suas relações de co-ocorrência, representando os principais conteúdos de estudos existentes e descrevem os tópicos que foram focados em um determinado domínio. Cada nó na rede simboliza uma palavra-chave, os tamanhos dos nós e as conexões entre os nós indicam a frequência com que essas palavras-chave aparecem juntas em documentos. As cores dos nós dividem essas palavras-chaves em diferentes grupos e correspondem a clusters de palavras-chave relacionadas tematicamente.

As palavras-chave com maior peso ou quantidade dentro de cada cluster são "tryptophyllins" no cluster amarelo (central), "amphibian skin peptides" no cluster vermelho, "bradykinin antagonist" no cluster roxo, "peptide" no cluster azul claro, e "oxidative stress" no cluster verde. Essas palavras-chave são centrais na rede e possuem

diversas conexões com outras palavras-chave, o que destaca sua importância e relevância no conjunto de dados analisado. Esse mapa de rede é útil para identificar os tópicos principais de pesquisa e subtemas relacionados dentro do campo de estudo.

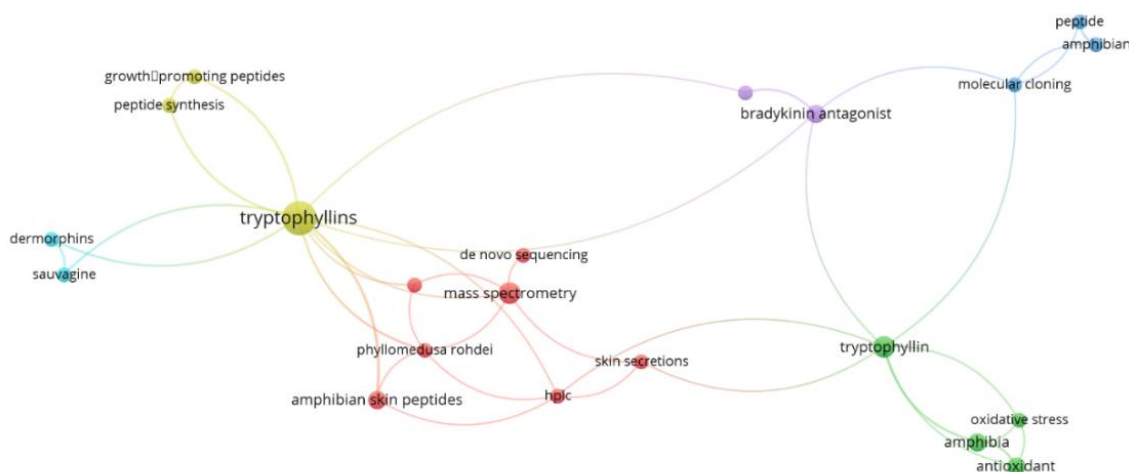


Figura 8. Rede de palavras-chave mais encontradas nos artigos. Cada nó na rede simboliza uma palavra-chave, e as conexões entre os nós indicam a frequência com que essas palavras-chave aparecem juntas em documentos. As cores diferentes correspondem a clusters de palavras-chave relacionadas tematicamente.

4. DISCUSSÃO

Após a análise bibliométrica, este estudo conduziu uma discussão aprofundada, principalmente sobre os 10 artigos mais citados durante o período de 1984 a 2025, para compreender quais as principais abordagens referentes as triptofilinas, uma família de peptídeos contendo triptofano, identificar suas similaridades e limitações, bem como propor direções para pesquisas futuras.

Todos os artigos analisados tratam de peptídeos de defesa presentes nas secreções da pele de anfíbios, com foco em várias famílias de peptídeos, principalmente as triptofilinas, encontradas em diversas espécies de rãs e sapos, com destaque para o gênero *Phyllomedusa*, sendo observados pela primeira vez na *Phyllomedusa rohdei* e em várias outras espécies, incluindo *Pachymedusa dacnicolor*, *Hyla arborea*, e *Ascaphus truei* que são conhecidos por sua rica diversidade de peptídeos bioativos. Artigos como os de Apponyi et al. (2004) e Bowie et al. (2012) fornecem uma revisão abrangente sobre as características e funções dos peptídeos de anfíbios, enquanto outros, como o de Chen et al. (2004), apresentam pesquisas originais sobre o isolamento e a caracterização de peptídeos específicos, como o Tryptophyllin-1 de *Pachymedusa dacnicolor*.

Os artigos frequentemente mencionam o uso de técnicas avançadas para a identificação e caracterização estrutural dos peptídeos. A espectrometria de massas (MS/MS) é amplamente utilizada para analisar a composição e estrutura dos peptídeos, e, em alguns casos, a degradação de Edman e a espectroscopia de RMN são aplicadas para entender as estruturas 3D desses compostos. A combinação de estudos sobre isolamento, estrutura, atividade biológica e mecanismos de ação demonstra a importância das secreções de pele como uma linha de defesa para os anfíbios, contendo uma ampla variedade de peptídeos com propriedades antimicrobianas, anticâncer, neuromoduladoras e mioativas, especialmente em relação à relaxação da musculatura arterial e contração da musculatura intestinal, indicando um papel na defesa fisiológica do organismo (CONLON, 2005).

4.1 Estrutura e diversidade das triptofilinas

As triptofilinas são peptídeos curtos, com a característica comum de conter triptofano em suas sequências. A diversidade estrutural desses peptídeos é notável, variando desde pequenos tetrapeptídeos até formas mais complexas, com diferentes combinações de prolina (Pro) e triptofano (Trp) na sequência. Montecucchi et al. (1985) e Montecucchi et al. (2009) foram pioneiros no estudo detalhado da estrutura primária desses peptídeos, destacando a presença do *motif* Pro-Trp em várias variantes de triptofilinas. Esses peptídeos são isolados de espécies de *Phyllomedusa*, como *Phyllomedusa rohdei* e *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*, que têm sido caracterizadas como fontes abundantes dessa classe de peptídeos.

A estrutura das triptofilinas tem implicações diretas em suas funções biológicas. A presença de prolina na sequência de algumas triptofilinas pode ser um fator chave para sua estabilidade e para a atividade biológica observada, como o relaxamento da musculatura arterial e a contração da musculatura intestinal, como no caso da Tryptophyllin-1 isolada de *Pachymedusa dactylocolor* (Chen et al., 2004). Essa atividade mioativa é um exemplo das diversas funções fisiológicas que as triptofilinas podem exercer nos animais que os produzem.

4.2 Funções biológicas das triptofilinas

As triptofilinas desempenham papéis importantes na defesa imunológica das rãs,

com atividades que vão desde antimicrobianos até mioativos. O estudo de Conlon et al. (2005) investiga a secreção cutânea de espécies mais primitivas, como a rã sobre *Ascaphus truei* e destaca a presença de peptídeos como bradykininas e triptofilinas na pele dessa espécie. Esses peptídeos têm funções fisiológicas, como a modulação da pressão sanguínea e o relaxamento da musculatura lisa. Em *Pachymedusa dactylos*, Chen et al. (2004) descreveram a Tryptophyllin-1 como um peptídeo mioativo, capaz de relaxar a musculatura arterial e contrair a musculatura intestinal, demonstrando um exemplo claro de como esses peptídeos podem ter um papel importante na defesa e na homeostase fisiológica dos anfíbios.

Embora as triptofilinas tenham sido inicialmente conhecidos por suas funções mioativas, estudos mais recentes, como os de Erspamer et al. (1985) e Thompson et al. (2007), sugerem que esses peptídeos podem também ter propriedades antimicrobianas e antitumorais, com algumas variantes mostrando potencial como agentes terapêuticos. Em particular, os peptídeos da família triptofilina isolados de *Phyllomedusa* sp. são considerados bioativos e têm aplicações potenciais em tratamentos farmacológicos devido às suas propriedades de interação com membranas celulares.

4.3 Métodos Analíticos: Espectrometria de Massas e Sequenciamento de cDNA

Uma das contribuições mais importantes desses artigos é o uso de técnicas avançadas para isolar, identificar e caracterizar esses peptídeos. Técnicas como espectrometria de massas (MS/MS) e sequenciamento de cDNA têm sido cruciais para entender a estrutura e a função das triptofilinas. Esses métodos permitem não apenas a isolamento de peptídeos em pequenas quantidades, como também a identificação de modificações pós-traducionais que podem ser essenciais para a atividade biológica dos peptídeos. Thompson et al. (2007) exemplificaram a eficácia do uso de QTOF MS/MS para a análise do peptidoma secretado pela pele de *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*, revelando novos peptídeos, incluindo as triptofilinas, e demonstrando a capacidade de obter informações proteômicas e genômicas sem a necessidade de sacrifício do animal.

Além disso, técnicas de sequenciamento de cDNA foram fundamentais para compreender como esses peptídeos são produzidos no organismo, identificando os precursores dos peptídeos e facilitando a compreensão de como a diversidade estrutural

desses peptídeos contribui para suas funções biológicas. Há uma variação nas metodologias empregadas. Alguns estudos, como os de Samgina et al. (2010), destacam as dificuldades de sequenciamento de peptídeos curtos devido à ciclagem de íons em espectrometria de massas, enquanto outros, como o de Montecucchi (1985), focam na purificação e determinação da estrutura primária dos peptídeos utilizando técnicas como cromatografia (HPLC).

4.5 Evolução das triptofilinas e Diversidade entre Espécies

A comparação das diferentes espécies de rãs, como *Phyllomedusa rohdei*, *Pachymedusa dacnicolor*, *Hyla arborea* e *Ascaphus truei*, revela a evolução das estruturas peptídicas e como esses peptídeos se adaptaram para desempenhar diferentes funções de defesa. A diversidade de triptofilinas observada em espécies de *Phyllomedusa* (Montecucchi et al., 1985) e *Hyla arborea* (Samgina et al., 2010) destaca a adaptação de diferentes famílias de peptídeos ao contexto ecológico específico de cada espécie. Em contraste, a pesquisa de Conlon et al. (2005) sobre *Ascaphus truei* revela como espécies mais primitivas utilizam esses peptídeos de maneira similar, mas com variações nas suas atividades biológicas, como a regulação da pressão sanguínea e das funções musculares.

A pesquisa de Bowie et al. (2012) se concentra na evolução dos peptídeos de defesa, examinando as relações evolutivas entre as diferentes famílias de peptídeos, incluindo as triptofilinas. Esse estudo utiliza sequenciamento de cDNA para investigar como as mudanças sazonais podem afetar os perfis de peptídeos e seu papel nas defesas dos anfíbios. Em contraste, outros artigos, como os de Montecucchi (1985) e Samgina et al. (2010), não abordam diretamente as implicações evolutivas das secreções de peptídeos, mas se concentram mais nas características estruturais e funcionais dos peptídeos de defesa. A conservação de certos peptídeos e precursores em espécies geograficamente distantes é observada, sugerindo uma origem evolutiva comum para esses compostos.

Um artigo, como o de Conlon et al. (2005), conecta as origens dos peptídeos à separação de Gondwana, sugerindo uma explicação evolutiva para a diversidade de peptídeos observada nas espécies estudadas, enquanto outros artigos não exploram tanto essa perspectiva evolutiva, focando mais nas características estruturais e biológicas dos peptídeos. Artigos como o de Bowie et al. (2012) observam mudanças sazonais nos perfis

de peptídeos de algumas espécies de sapos, indicando que a produção de peptídeos pode ser modulada por fatores ambientais. Outros estudos não abordam essa variação, mas se concentram em uma amostra mais constante da secreção de pele ao longo do ano.

4.6 A importância da bibliometria e o uso do VOSviewer

Os resultados dessa análise destacam um campo de pesquisa dinâmico sobre triptofilinas e outros peptídeos bioativos de anfíbios. Apesar do declínio em publicações recentes, a área continua relevante, com uma rede científica bem estabelecida e uma diversidade geográfica e institucional significativa. O uso de ferramentas como VOSviewer para mapear as colaborações científicas e palavras-chave tem sido crucial para entender a estrutura da pesquisa nesse campo. A identificação de um pequeno número de revistas de impacto, juntamente com o acesso restrito à maioria dos artigos, aponta para a necessidade de uma disseminação mais ampla dos achados para promover avanços mais rápidos na área.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, os estudos sobre as triptofilinas mostram a complexidade e a diversidade dos peptídeos de defesa encontrados nas secreções de pele de anfíbios, com especial ênfase nas triptofilinas. Embora compartilhem um tema comum, a diversidade geográfica, as metodologias empregadas e os focos específicos nas famílias de peptídeos resultam em contribuições únicas para o campo. A variedade de abordagens metodológicas e o foco tanto em pesquisas originais quanto em revisões proporcionam uma base sólida para a compreensão dos mecanismos de defesa dos anfíbios e suas implicações para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos. A combinação de técnicas analíticas avançadas e pesquisas evolutivas revela a importância desses peptídeos na defesa imunológica e na fisiologia dos anfíbios, destacando sua relevância tanto no contexto biológico quanto no potencial farmacológico. A diversidade estrutural e funcional das triptofilinas reflete a complexidade da evolução dos sistemas de defesa dos anfíbios, que continuam a ser uma rica fonte de novos agentes terapêuticos. O estudo contínuo desses peptídeos pode abrir novas possibilidades para o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos inovadores, aproveitando suas propriedades antimicrobianas, mioativas e outras funções biológicas.

Tabela 2. Lista completa dos 39 artigos encontrados através de pesquisa pelo Scopus com as palavras-chave relacionadas a *tryptophyllins* e *fros/frogs* dentre os anos de 1984 a 2025.

Artigo	Autor	Revista	Número de Citações	Ano
Novel tryptophyllin peptides from <i>Physalaemus centralis</i> inhibit oxidative stress-induced endothelial dysfunction in rat aorta preparation	Nogueira, A., et al	<i>Toxicon</i>	0	2025
Frog-derived peptides and neuroprotection	Moreira, D.C., et al	<i>Natural Molecules in Neuroprotection and Neurotoxicity</i>	1	2024
Purification, Conformational Analysis and Cytotoxic Activities of Host-Defense Peptides from the Giant Gladiator Treefrog <i>Boana boans</i>	Conlon, J.M., et al	<i>Antibiotics</i>	4	2023
Neuroprotective effects on microglia and insights into the structure–activity relationship of an antioxidant peptide isolated from <i>Pelophylax perezii</i>	Plácido, A., et al	<i>Journal of Cellular and Molecular Medicine</i>	12	2022
Virtual screening and rational design of antioxidant peptides based on tryptophyllin L structures isolated from the <i>Litoria rubella</i> frog	Tran, T.T.N., et al	<i>Journal of Peptide Science</i>	2	2022
Antioxidant activities of major tryptophyllin L peptides: A joint investigation of Gaussian-based 3D-QSAR and radical scavenging experiments	Tran, T.T.N., et al	<i>Journal of Peptide Science</i>	15	2021
The peptide secreted at the water to land transition in a model amphibian has antioxidant effects	Barbosa, E.A., et al	<i>Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences</i>	9	2021
Baltikinin: A new myotropic tryptophyllin-3 peptide isolated from the skin secretion of the purple-sided leaf frog, <i>Phyllomedusa baltea</i>	Shi, D., et al	<i>Toxins</i>	2	2016
Identification and functional analysis of a novel tryptophyllin peptide from the skin of the red-eye leaf frog, <i>Agalychnis callidryas</i>	Wang, R., et al	<i>International Journal of Biological Sciences</i>	9	2015
Molecular cloning of a novel tryptophyllin peptide from the skin of the orange-legged monkey frog, <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	Wang, R., et al	<i>Chemical Biology and Drug Design</i>	7	2014
AcT-2: A novel myotropic and antimicrobial type 2 tryptophyllin from the skin secretion of the Central American red-eyed leaf frog, <i>Agalychnis callidryas</i>	Ge, L., et al	<i>The Scientific World Journal</i>	11	2014
PsT-1: A new tryptophyllin peptide from the skin secretion of Waxy Monkey Leaf Frog, <i>Phyllomedusa sauvagei</i>	Wang, R., et al	<i>Regulatory Peptides</i>	10	2013

Gene expression analysis by ESTs sequencing of the Brazilian frog <i>Phyllomedusa nordestina</i> skin glands	Neiva, M., et al	<i>Toxicon</i>	9	2013
Host-defense peptides of Australian anurans. Part 2. Structure, activity, mechanism of action, and evolutionary significance	Bowie, J.H., et al	<i>Peptides</i>	66	2012
An unusual kynurenine-containing opioid tetrapeptide from the skin gland secretion of the Australian red tree frog <i>Litoria rubella</i>	Ellis-Steinborner, S.T., et al	<i>Rapid Communications in Mass Spectrometry</i>	11	2011
Peptidomic dissection of the skin secretion of <i>Phasmahyla jandaia</i>	Rates, B., et al	<i>Toxicon</i>	15	2011
Characterization of a peptide family from the skin secretion of the middle east tree frog <i>Hyla savignyi</i> by composition-based de novo sequencing	Langsdorf, M., et al	<i>Rapid Communications in Mass Spectrometry</i>	13	2010
Novel natural peptides from <i>Hyla arborea schelkownikowi</i> skin secretion	Samgina, T.Y., et al	<i>Rapid Communications in Mass Spectrometry</i>	11	2010
N-Terminal Tagging Strategy for De Novo Sequencing of Short Peptides by ESI-MS/MS and MALDI-MS/MS	Samgina, T.Yu., et al	<i>Journal of the American Society for Mass Spectrometry</i>	38	2010
PdT-2: A novel myotropic Type-2 tryptophyllin from the skin secretion of the Mexican giant leaf frog, <i>Pachymedusa dacnicolor</i>	Wang, L., et al	<i>Peptides</i>	15	2009
Amphibian skin secretomics: Application of parallel quadrupole time-of-flight mass spectrometry and peptide precursor cDNA cloning to rapidly characterize the skin secretory peptidome of <i>Phyllomedusa hypochondrialis azurea</i>	Thompson, A.H., et al	<i>Journal of Proteome Research</i>	37	2007
Bradykinin-related peptides and tryptophyllins in the skin secretions of the most primitive extant frog, <i>Ascaphus truei</i>	Conlon, J.M., et al	<i>General and Comparative Endocrinology</i>	37	2005
Host-defence peptides of Australian anurans: Structure, mechanism of action and evolutionary significance	Apponyi, M.A., et al	<i>Peptides</i>	205	2004
<i>Pachymedusa dacnicolor</i> tryptophyllin-1: Structural characterization, pharmacological activity and cloning of precursor cDNA	Chen, T., et al	<i>Regulatory Peptides</i>	41	2004
Peptides from the skin glands of the Australian buzzing tree frog <i>Litoria electrica</i>	Wabnitz, P.A., et al	<i>Australian Journal of Chemistry</i>	14	1999

An unusual combination of peptides from the skin glands of Ewing's tree frog, <i>Litoria ewingi</i>	Steinborner, S.T., et al	<i>Australian Journal of Chemistry</i>	22	1997
The application of mass spectrometry to the study of evolutionary trends in amphibians	Steinborner, S.T., et al	<i>Rapid Communications in Mass Spectrometry</i>	17	1996
The structures of new peptides from the Australian red tree frog ' <i>Litoria rubella</i> '	Steinborner, S.T., et al	<i>Australian Journal of Chemistry</i>	26	1996
Structures of four tryptophyllin and three rubellidin peptides from the Australian red tree frog <i>Litoria rubella</i>	Steinborner, Simon T., et al	<i>Australian Journal of Chemistry</i>	24	1994
Isolation, structure determination and synthesis of a novel tryptophan-containing heptapeptide (basic tryptophyllin) from the skin of <i>Phyllomedusa rohdei</i>	Montecucchi, P.C., et al	<i>International Journal of Peptide and Protein Research</i>	4	1989
Synthesis of TPH-13, a new tridecapeptide from <i>Phyllomedusa rohdei</i>	Perseo, G., et al	<i>International Journal of Peptide and Protein Research</i>	2	1987
Active peptides in the skins of two hundred and thirty American amphibian species	Erspamer, V., et al	<i>Comparative Biochemistry and Physiology</i>	98	1986
Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins	Montecucchi, P.C.	<i>Peptides</i>	27	1985
Tryptophyllin-like immunoreactivity in rat adenohypophysis	Renda, T., et al	<i>Peptides</i>	26	1985
Taxonomic and evolutionary significance of peptides in amphibian skin	Cei, J.M.	<i>Peptides</i>	18	1985
Phyllomedusa skin: A huge factory and store-house of a variety of active peptides	Erspamer, V., et al	<i>Peptides</i>	114	1985
Synthesis of tryptophyllin-7 and analogues	Perseo, G., et al	<i>International Journal of Peptide and Protein Research</i>	5	1985
Primary structure of tryptophan-containing peptides from skin extracts of <i>Phyllomedusa rhodei</i>	Montecucchi, P.C., et al	<i>International Journal of Peptide and Protein Research</i>	31	1984
Syntheses of tetra- and pentapeptides from skin extracts of <i>Phyllomedusa rhodei</i>	Perseo, G., et al	<i>International Journal of Peptide and Protein Research</i>	11	1984

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPONYO, M.A.; SHAW, C.; BOURNE, P.; et al. Host-defence peptides of Australian anurans: Structure, mechanism of action and evolutionary significance. **Peptides**, v. 205, p. 2004.

BARBOSA, E.A.; OLIVEIRA, L.P.; SANTOS, D.A.; et al. The peptide secreted at the water to land transition in a model amphibian has antioxidant effects. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 9, p. 2021.

BOWIE, J.H.; CRAWFORD, M.; EVANS, A.; et al. Host-defense peptides of Australian anurans. Part 2. Structure, activity, mechanism of action, and evolutionary significance. **Peptides**, v. 66, p. 2012.

BUTLER, L.; VISSER, M. Extending citation analysis to non-source items. **Scientometrics**, v. 66, p. 327–343, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11192-006-0024-1>.

CEI, J.M. Taxonomic and evolutionary significance of peptides in amphibian skin. **Peptides**, v. 18, p. 1985.

CHEN, T.; XIE, Z.; YANG, L.; et al. *Pachymedusa dactylocolor* tryptophyllin-1: Structural characterization, pharmacological activity and cloning of precursor cDNA.

Regulatory Peptides, v. 41, p. 2004.

CONLON, J.M.; MURRAY, C.K.; GALLEY, B.; et al. Bradykinin-related peptides and tryptophyllins in the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 37, p. 2005.

CONLON, J.M.; MURRAY, C.K.; GALLEY, B.; et al. Purification, Conformational Analysis and Cytotoxic Activities of Host-Defense Peptides from the Giant Gladiator Treefrog *Boana boans*. **Antibiotics**, v. 4, p. 2023.

ELLIS-STEINBORNER, S.T.; GRAHAM, H.; WONG, P.; et al. An unusual kynurenine-containing opioid tetrapeptide from the skin gland secretion of the Australian red tree frog *Litoria rubella*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 11, p. 2011.

ERSPAMER, V.; POLI, P.; D'AMBROSIO, G. Active peptides in the skins of two hundred and thirty American amphibian species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 1986.

ERSPAMER, V.; ZAMBONI, L.; TOSO, S. *Phyllomedusa* skin: A huge factory and store-house of a variety of active peptides. **Peptides**, v. 114, p. 1985.

GE, L.; ZHAO, X.; YU, T.; et al. AcT-2: A novel myotropic and antimicrobial type 2 tryptophyllin from the skin secretion of the Central American red-eyed leaf frog, *Agalychnis callidryas*. **The Scientific World Journal**, v. 11, p. 2014.

LANGSDORF, M.; SILVA, J.; PEREIRA, C.; et al. Characterization of a peptide family from the skin secretion of the middle east tree frog *Hyla savignyi* by composition-based de novo sequencing. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, p. 2010.

MONTECUCCHI, P.C. Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins. **Peptides**, v. 27, p. 1985.

MONTECUCCHI, P.C.; MASINI, E.; LANFRANCHI, F. Primary structure of tryptophan-containing peptides from skin extracts of *Phyllomedusa rhodei*. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 31, p. 1984.

MONTECUCCHI, P.C.; RIZZO, C.; LEONI, L. Isolation, structure determination and synthesis of a novel tryptophan-containing heptapeptide (basic tryptophyllin) from the skin of *Phyllomedusa rohdei*. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 4, p. 1989.

MOREIRA, D.C.; LIMA, M.C.; SILVA, F.R.; et al. Frog-derived peptides and neuroprotection. In: **Natural Molecules in Neuroprotection and Neurotoxicity**, 2024.

NEIVA, M.; SANTOS, R.; COSTA, D.; et al. Gene expression analysis by ESTs sequencing of the Brazilian frog *Phyllomedusa nordestina* skin glands. **Toxicon**, v. 9, p. 2013.

NOGUEIRA, A.; SILVA, R.; SOUZA, M. F.; et al. Novel tryptophyllin peptides from *Physalaemus centralis* inhibit oxidative stress-induced endothelial dysfunction in rat aorta preparation. **Toxicon**, v. 0, p. 2025.

PERSEO, G.; D'AURIA, M.; BELOTTI, M. Synthesis of TPH-13, a new tridecapeptide from *Phyllomedusa rohdei*. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 2, p. 1987.

PERSEO, G.; DELLE VIGNE, M.; PIOLI, A. Synthesis of tryptophyllin-7 and analogues. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 5, p. 1985.

PERSEO, G.; MURARO, G.; DAL MOLIN, M. Syntheses of tetra- and pentapeptides from skin extracts of *Phyllomedusa rhodei*. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 11, p. 1984.

PLÁCIDO, A.; RIBEIRO, P.; FERREIRA, J.; et al. Neuroprotective effects on microglia and insights into the structure–activity relationship of an antioxidant peptide isolated from *Pelophylax perezii*. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, p. 2022.

RATES, B.; MACHADO, S.; LIMA, J.; et al. Peptidomic dissection of the skin secretion of *Phasmahyla jandaia*. **Toxicon**, v. 15, p. 2011.

RENDA, T.; SANTORO, A.; FERRARO, A. Tryptophyllin-like immunoreactivity in rat adenohypophysis. *Peptides*, v. 26, p. 1985.

SAMGINA, T.Y.; IVANOVA, M.; KOVALEV, S.; et al. Novel natural peptides from *Hyla arborea* schelkownikowi skin secretion. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 11, p. 2010.

SAMGINA, T.Yu.; MIKHAILOVA, M.; KOVALEV, A.; et al. N-Terminal Tagging Strategy for De Novo Sequencing of Short Peptides by ESI-MS/MS and MALDI-MS/MS. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 38, p. 2010.

SHI, D.; ZHANG, Y.; YU, Y.; et al. Baltikinin: A new myotropic tryptophyllin-3 peptide isolated from the skin secretion of the purple-sided leaf frog, *Phyllomedusa baltea*. **Toxins**, v. 2, p. 2016.

STEINBORNER, S.T.; FENTON, C.; ROGERS, P. The structures of new peptides from the Australian red tree frog *Litoria rubella*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 26, p. 1996.

STEINBORNER, S.T.; MURPHY, J.; MARTIN, L. The application of mass spectrometry to the study of evolutionary trends in amphibians. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, p. 1996.

STEINBORNER, S.T.; WILLIAMS, B.; DOYLE, M. Structures of four tryptophyllin and three rubellidin peptides from the Australian red tree frog *Litoria rubella*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 24, p. 1994.

STEINBORNER, S.T.; WILSON, A.; RICHARDS, K. An unusual combination of peptides from the skin glands of Ewing's tree frog, *Litoria ewingi*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 22, p. 1997.

THOMPSON, A.H.; BJORSON, A.J.; ORR, D.F.; et al. Amphibian skin secretomics: Application of parallel quadrupole time-of-flight mass spectrometry and peptide precursor cDNA cloning to rapidly characterize the skin secretory peptidome of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*. **Journal of Proteome Research**, v. 37, p. 2007.

TRAN, T.T.N.; HOANG, H.T.; NGUYEN, T.T.; et al. Virtual screening and rational design of antioxidant peptides based on tryptophyllin L structures isolated from the *Litoria rubella* frog. **Journal of Peptide Science**, v. 2, p. 2022.

TRAN, T.T.N.; NGUYEN, T.T.; PHAM, T.B.; et al. Antioxidant activities of major tryptophyllin L peptides: A joint investigation of Gaussian-based 3D-QSAR and radical scavenging experiments. **Journal of Peptide Science**, v. 15, p. 2021.

VAN ECK, N. J.; WALTMAN, L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. **Scientometrics**, v. 84, n. 2, p. 523-538, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11192-009-0146-3>.

WABNITZ, P.A.; GRAHAM, J.; HUNTER, R. Peptides from the skin glands of the Australian buzzing tree frog *Litoria electrica*. **Australian Journal of Chemistry**, v.

14, p. 1999.

WANG, L.; LIU, Z.; LI, T.; et al. PdT-2: A novel myotropic Type-2 tryptophyllin from the skin secretion of the Mexican giant leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. **Peptides**, v. 15, p. 2009.

WANG, R.; LIU, Z.; LI, Y.; et al. Identification and functional analysis of a novel tryptophyllin peptide from the skin of the red-eye leaf frog, *Agalychnis callidryas*. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, p. 2015.

WANG, R.; LIU, Z.; WANG, T.; et al. Molecular cloning of a novel tryptophyllin peptide from the skin of the orange-legged monkey frog, *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 7, p. 2014.

WANG, R.; LIU, Z.; WANG, Y.; et al. PsT-1: A new tryptophyllin peptide from the skin secretion of Waxy Monkey Leaf Frog, *Phyllomedusa sauvagei*. **Regulatory Peptides**, v. 10, p. 2013.

CONCLUSÕES GERAIS

Em conclusão, os estudos realizados sobre os peptídeos PcT-1 e PpT-2 provenientes das secreções cutâneas de anuros revelam seu potencial como agentes antioxidantes promissores e seguros, com implicações terapêuticas. Ambos os peptídeos demonstraram eficácia na neutralização de radicais livres e baixa citotoxicidade, destacando-se nas propriedades antioxidantes e na segurança em modelos *in vivo*. A similaridade estrutural do PpT-2 com outras triptofilinas, juntamente com suas atividades protetoras observadas, reforça a ideia de que peptídeos derivados de anfíbios podem representar alternativas eficazes a tratamentos sintéticos para o manejo do estresse oxidativo e patologias associadas, como doenças neurodegenerativas. Futuras investigações deverão explorar os mecanismos de ação desses peptídeos, além de potenciais aplicações em estratégias terapêuticas direcionadas. A relevância crescente dessas moléculas, em combinação com a exploração contínua de secreções de anfíbios como fontes de compostos terapêuticos, abre novas perspectivas para o desenvolvimento de soluções inovadoras na área da saúde.

**CAPÍTULO II: NOVOS PEPTÍDEOS TRIPTOFILINAS DE *PHYSALAEMUS*
CENTRALIS INIBEM A DISFUNÇÃO ENDOTELIAL INDUZIDA POR
ESTRESSE OXIDATIVO EM PREPARAÇÕES DE AORTA DE RATO**

Artigo publicado no periódico Toxicon – Elsevier em 2025

Fator de impacto:3,03

ISSN:0041-0101

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2025.108234>

RESUMO

A pele dos anfíbios é uma fonte rica de moléculas com potencial biotecnológico, incluindo a família de peptídeos triptofilinas. Aqui, relatamos a identificação e caracterização de dois peptídeos da classe das triptofilinas, FPPEWISR e FPWLLS-NH₂, provenientes da pele da rã-anã-central, *Physalaemus centralis*. Esses peptídeos foram identificados por meio de clonagem de cDNA e comparação de sequências. O peptídeo FPWLLS-NH₂ compartilha sua estrutura primária com um peptídeo previamente identificado na pele de *Pelophylax perezi*, denominado PpT-2. O outro peptídeo, FPPEWISR, é um novo peptídeo descoberto e foi nomeado PcT-1. Após síntese em fase sólida, ambos os peptídeos demonstraram atividade antioxidante significativa, com PcT-1 e PpT-2 apresentando capacidades de eliminação do radical ABTS de 0,305 e 0,269 mg equivalentes de Trolox/mg de peptídeo, respectivamente, e valores de ORAC de 0,319 e 0,248 mg equivalentes de Trolox/mg de peptídeo. Além disso, PcT-1 e PpT-2 inibiram a hemólise induzida por AAPH em glóbulos vermelhos humanos, atingindo um nível de proteção comparável ao Trolox a 0,2 mg/mL. Em preparações de aorta de rato, ambos os peptídeos restauraram parcialmente o vasorrelaxamento induzido por acetilcolina após estresse oxidativo induzido por pirogallol (ácido pirogálico), com um efeito protetor mais pronunciado do PpT-2. O ensaio de atividade hemolítica indicou ausência de citotoxicidade em glóbulos vermelhos humanos, e testes em larvas de *Galleria mellonella* confirmaram sua baixa toxicidade *in vivo*. Esses achados destacam o potencial biotecnológico do PcT-1 e do PpT-2 como agentes antioxidantes, abrindo caminho para novas aplicações terapêuticas no combate a doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: anfíbios, antioxidante, citotoxicidade, função endotelial, espécies reativas de oxigênio.

1. INTRODUÇÃO

Os anfíbios ocupam diversos ambientes e podem prosperar em uma ampla gama de habitats e condições ecológicas. Esses animais desenvolveram várias adaptações para tolerar condições extremas, desde temperaturas congelantes até climas desérticos (JARED et al., 2019; STOREY e STOREY, 2017). A pele dos anfíbios desempenha um papel fisiológico crucial em sua sobrevivência, facilitando a troca gasosa, a termorregulação, a excreção e a reprodução (CLARKE, 1997; RONG et al., 2019; XU e LAI, 2015; YANG et al., 2009). Além disso, fatores morfológicos, bioquímicos e comportamentais contribuem para sua adaptabilidade a diferentes ambientes. Também foi relatado que a pele dos anfíbios possui mecanismos de defesa eficientes contra predadores e microrganismos, em grande parte devido a substâncias produzidas em glândulas especializadas (CHEN et al., 2022; ZASLOFF, 1987). Entre essas substâncias, foram identificados pequenos peptídeos que exibem propriedades antimicrobianas, além de outras atividades, como inibição de peptidases, vasodilatação, efeitos antioxidantes e atividade anticancerígena (BARBOSA et al., 2018; CANCELARICH et al., 2020; CONLON, 1999; DESLOUCHES e DI, 2017; GASPAR et al., 2013; MIGNOGNA et al., 1996; PLÁCIDO et al., 2020; SOUZA et al., 2020).

Os peptídeos dos anfíbios são frequentemente classificados em famílias de acordo com sua estrutura primária (CHEN et al., 2022). As triptofilinas formam um grupo heterogêneo de peptídeos que geralmente contêm 4, 5, 7, 10 ou 13 resíduos de aminoácidos, frequentemente apresentando triptofano e modificações pós-traducionais, como amidação C-terminal e/ou ácido piroglutâmico derivado de glutamina N-terminal (MONTECUCCHI, 1985). Recentemente, essa família de peptídeos foi reclassificada em três grupos: T-1 (heptapeptídeos amidado e octapeptídeos não amidado com um N-terminal composto por Lys-Pro, Trp na posição 5 e Pro na posição 7), T-2 (peptídeos de quatro a sete aminoácidos com um *motif* comum Pro-Trp interno) e T-3 (tridecapeptídeos com cinco resíduos de Pro conservados e ausência de Trp) (WANG et al., 2015). Outra característica das triptofilinas é a presença de um ou dois resíduos de prolina adjacentes ao resíduo de triptofano, geralmente localizados perto do N-terminal do peptídeo.

As triptofilinas foram identificadas na pele de sapos do gênero *Pithecopus*, particularmente nas espécies *P. rohdei* e *P. hypochondrialis*, bem como em *Litoria rubella* (CHEN et al., 2004; ELLIS-STEINBORNER et al., 2011; MONTECUCCHI, 1985; WANG et al., 2014). Estudos demonstraram que as triptofilinas possuem atividade antimicrobiana (GE et al., 2014), atividade miotrópica (GE et al., 2014; WANG et al., 2009) e atividade antiproliferativa contra células cancerígenas (WANG et al., 2015). A função biológica principal das triptofilinas está relacionada à sua atividade miotrópica; no entanto, enquanto alguns testes indicam efeito vasorelaxante, outros sugerem vasoconstrição.

Algumas triptofilinas exibem propriedades vasorelaxantes ao promover a liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio, como o óxido nítrico (NO), ou ao modular canais de íons potássio e cálcio. Esse efeito vasorelaxante indica potenciais aplicações terapêuticas para o controle da hipertensão e de outras condições cardiovasculares, reduzindo a resistência vascular. Por outro lado, certas triptofilinas demonstraram efeitos vasoconstritores, possivelmente devido à ativação de vias contráteis da musculatura lisa, incluindo a sinalização por fosfolipase C (PLC) e proteína quinase C (PKC). A dupla capacidade das triptofilinas de induzir tanto o vasorelaxamento quanto vasoconstrição destaca seu papel complexo na regulação vascular e sugere que pequenas variações estruturais entre os peptídeos podem resultar em diferentes desfechos fisiológicos, possibilitando aplicações terapêuticas direcionadas no futuro (DEMIREL, 2024; WANG et al., 2009, 2013).

Embora algumas propriedades biológicas das triptofilinas tenham sido identificadas em condições laboratoriais, sua função natural dentro da composição molecular das secreções cutâneas dos sapos ainda não está completamente esclarecida. Um dos papéis fisiológicos atribuídos às triptofilinas e outros peptídeos das secreções cutâneas dos anfíbios é a defesa antioxidante (YANG et al., 2009). A justificativa para esse conceito é que a pele dos anfíbios está particularmente exposta a fatores ambientais que podem induzir estresse oxidativo, incluindo exposição a microrganismos (IVANOV ET AL., 2017), radiação ultravioleta (DE JAGER et al., 2017) e diferentes níveis de disponibilidade de oxigênio (HERMES-LIMA et al., 2015), como na transição da água para a terra durante a metamorfose (BARBOSA et al., 2021).

Além disso, a importância funcional dos peptídeos com atividade antioxidante é

sustentada por sua ampla distribuição e diversidade estrutural. Peptídeos antioxidantes estruturalmente diversos foram identificados em várias espécies de anfíbios, como *Amolops daiyunensis*, *Hylarana* spp., *Lithobates catesbeianus*, *Nidirana* spp., *Odorrana* spp., *Pelophylax* spp. e *Theloderma kwangsiensis* (FENG et al., 2021). No caso das triptofilinas, peptídeos com atividade antioxidante em ensaios *in vitro* e celulares incluem PaT-2 (FPPWL-NH₂, isolado da pele de *Pithecopus azureus*; BARBOSA et al., 2021) e PpT-2 (FPWLLS-NH₂, isolado da pele de *Pelophylax perezii*; PLÁCIDO et al., 2022).

Nesse contexto, nosso estudo se concentra na identificação e caracterização de novos peptídeos das secreções cutâneas de *Physalaemus centralis*, uma espécie de rã encontrada no Brasil, com particular interesse nas triptofilinas e sua atividade antioxidante. Conhecida como rã-anã-central, *P. centralis* é amplamente distribuída na América do Sul, ocupando diversos biomas como Cerrado, Caatinga e Pantanal (LOEBMANN et al., 2017).

Após a identificação de dois precursores de peptídeos em sequências de cDNA produzidas com RNA extraído da pele de *P. centralis*, previmos suas estruturas primárias e os sintetizamos. Em seguida, avaliamos seu potencial antioxidante por meio de ferramentas *in silico* antes de testar sua capacidade de eliminação de radicais livres *in vitro*. A toxicidade de ambos os peptídeos foi testada *in vitro* com glóbulos vermelhos humanos e *in vivo* em *Galleria mellonella*. Por fim, investigamos sua capacidade antioxidante em ensaios de hemólise induzida por oxidantes e em um modelo de disfunção endotelial induzida por estresse oxidativo.

Ao explorar a estrutura, atividade biológica e perfil de segurança desses peptídeos, buscamos analisar seu potencial como pontos de partida para o desenvolvimento de agentes terapêuticos no combate a doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Esperamos que esta pesquisa contribua para o desenvolvimento de novas terapias antioxidantes, capazes de mitigar os efeitos do estresse oxidativo e, por exemplo, melhorar o tratamento de doenças neurodegenerativas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e eram, no mínimo, de grau ACS.

2.2 Amostragem animal e Sequenciamento de cDNA

Espécimes de *Physalaemus centralis* foram capturados manualmente em Formoso do Araguaia, Tocantins, Brasil (Figura. 1), sob a licença do IBAMA, nº 31066-1. Amostras de tecido da pele dorsal foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido antes de serem armazenadas a -80°C para posterior isolamento de RNA.

Aproximadamente 10 mg do tecido pulverizado, preparado com nitrogênio líquido, foram utilizados para extrair RNA total com o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi então transcrito reversamente para cDNA e submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos específicos previamente relatados (BRAND et al., 2006). Os produtos de PCR resultantes foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% para avaliar os fragmentos amplificados. Fragmentos com pesos moleculares entre 250 e 400 bp foram isolados e purificados utilizando o sistema Wizard SV Gel e PCR Clean-Up (Promega).

As amostras de DNA purificado foram então submetidas à reação de ligação com o vetor *pGEM-T Easy* (Promega) e transfectadas em *Escherichia coli* (DH5 α) via eletroporação. Clones positivos (brancos) foram selecionados, e os plasmídeos foram isolados e submetidos ao sequenciamento automático de nucleotídeos pelo método de sequenciamento de Sanger.

A amidação C-terminal do PpT-2 foi inferida pela presença de uma glicina terminal em sua sequência de cDNA, a qual é tipicamente clivada durante o processo de amidação para gerar o peptídeo final amidado. Essa glicina atua como doadora de nitrogênio na formação do grupo amida, explicando sua ausência na estrutura primária do peptídeo. Em contraste, PcT-1 não apresenta glicina C-terminal em sua sequência de cDNA, indicando que não é amidado.

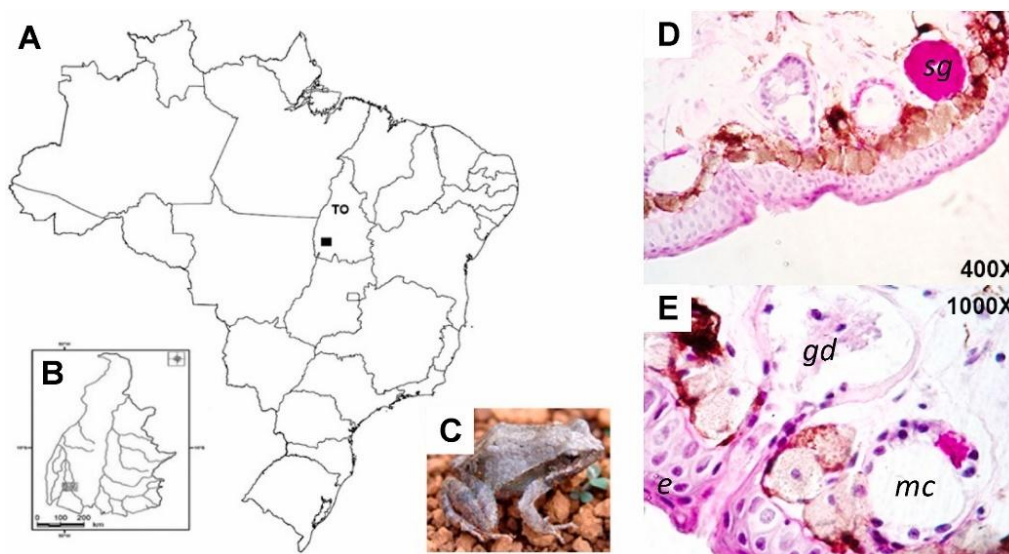


Figura 9. Locais de coleta dos espécimes estudados. **(A)** Mapa do Brasil (TO), **(B)** Estado do Tocantins, onde os espécimes de *Physalaemus centralis* foram coletados. **(C)** Adulto de *P. centralis* (Foto: José S.A. Leite). **(D)** Fotomicrografias da pele de *P. centralis* mostrando a variedade de glândulas: serosas, seromucosas e mucosas (400×). **(E)** Ampliações maiores da porção apical das glândulas com glândulas granulares e seu ducto secretor (1000 ×). Em destaque os **(gd)** ductos glandulares e as **(mc)** glândulas mucosas. **(e)** epiderme. **(sg)** glândula serosa. Coloração de ácido periódico de Schiff (PAS).

2.3 Síntese, Purificação e Sequenciamento de Peptídeos

Os peptídeos PcT-1 e PpT-2 foram sintetizados manualmente utilizando o modelo convencional de síntese de peptídeos em fase sólida (*solid phase peptide synthesis*, SPPS), seguindo especificamente a metodologia *Fmoc* (BRANGO-VANEGAS et al., 2019). Para a síntese de PcT-1, foi utilizada resina Wang (100–200 mesh), enquanto PpT-2 foi sintetizado utilizando resina Rink Amida (100–200 mesh); ambas as resinas foram adquiridas da Novabiochem® (EMD Millipore Corporation - Merck). Essas resinas fornecem, respectivamente, peptídeos com terminação carboxilada (-COOH) e amidada (-CONH₂). Aproximadamente 0,15 mmol de cada peptídeo foi sintetizado.

Os derivados de aminoácidos utilizados na síntese incluíram Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH e Fmoc-Trp(Boc)-OH, todos adquiridos da Novabiochem® (EMD Millipore Corporation, Merck).

Para PcT-1, o agente de acoplamento de aminoácidos utilizado foi N,N,N',N'-Tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il) urônio hexafluorofosfato (HBTU) da Fluka® (Sigma-Aldrich), com N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA) em N,N-dimetilformamida (DMF) como solvente. Para PpT-2, utilizaram-se N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) (Fluka®, Sigma-Aldrich) e Oxyma Pure (etil ciano-hidroxiiminoacetato) da Merck para

o acoplamento dos derivados de aminoácidos. Cada reação de acoplamento utilizou 4 equivalentes de derivados de aminoácidos, com tempo de reação de 1 hora (BRANGO-VANEGAS et al., 2019).

Os reagentes de clivagem consistiram em um coquetel de ácido trifluoroacético (TFA), tioanisol, água, fenol e etanoditiol (82,5:5:5:5:2,5, v/v/v/v/v). Após a síntese, a resina foi lavada e submetida à reação de clivagem por 1,5 hora. A resina foi então separada do sobrenadante por filtração a vácuo, e o sobrenadante foi concentrado até metade de seu volume utilizando um fluxo de gás argônio. Em seguida, foram adicionados 30 mL de éter isopropílico ao sobrenadante, causando a precipitação do peptídeo. A mistura foi centrifugada, o solvente descartado e o peptídeo resultante foram liofilizados.

PcT-1 e PpT-2 foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) em modo semipreparativo, utilizando um aparelho Shimadzu equipado com duas bombas independentes LC-20AR e um detector de matriz de diodos (SPD-M20A) ajustado para 216 nm. O solvente A, consistia em 0,1% (v/v) de TFA em água, e o solvente B era 0,1% de TFA em acetonitrila. A coluna utilizada foi uma Shim-Pack-Prep-ODS C77 No. 2025 (250 × 20 mm). O programa de eluição iniciou-se com 5% do solvente B, por 5 minutos, seguido por um gradiente que aumentou o solvente B para 100% ao longo de 20 minutos, manteve-se em 100% por 7 minutos e retornou a 5% do solvente B em 3 minutos. A taxa de fluxo foi de 10 mL/minuto. Os picos principais foram coletados manualmente em tubos de 50 mL, concentrados em um evaporador rotativo para remoção da acetonitrila, congelados e liofilizados.

Essas frações foram analisadas por espectrometria de massas por dessorção/ionização a laser assistida por matriz com tempo de voo (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*, MALDI-TOF), utilizando um equipamento MALDI-TOF-AutoFlex (Bruker Daltonics), conforme descrito anteriormente (MARANI et al., 2015). Após a purificação, ambos os peptídeos foram quantificados com base na absorbância UV do resíduo de triptofano a 280 nm, utilizando a constante de absorção molar incorporada na ferramenta ProtParam do site Expasy (<https://www.expasy.org/resources/protparam>).

2.4 Potencial Antioxidante *in silico*

O potencial antioxidante dos peptídeos foi avaliado por meio de cálculos baseados na teoria do funcional da densidade (DFT). As sequências foram projetadas com o auxílio do pacote computacional Avogadro em sua forma zwitteriônica (HANWELL et al., 2012). Uma otimização preliminar da geometria foi realizada utilizando a abordagem de Hartree–Fock (HF) com o hamiltoniano semiempírico PM6, conforme implementado no pacote computacional MOPAC2016 (STEWART, 1990, 2007). Os efeitos do solvente (água) foram modelados por meio do modelo de triagem tipo condutor (COSMO) (KLAMT; CHÜRMANN, 1993). A geometria resultante foi então reotimizada dentro do framework da teoria do funcional da densidade de *Kohn–Sham* (KS-DFT), empregando o funcional híbrido de troca de três parâmetros de Becke combinado com o funcional de correlação de Lee–Yang–Parr (B3LYP) (BECKE, 1993; STEPHENS et al., 1994; VOSKO et al., 1980) e um conjunto de bases 6-31G(d) para todos os átomos. A presença do solvente nas análises KS-DFT foi simulada por meio do modelo de contorno polarizável (PCM) (CANCÈS et al., 1997).

Os índices de Fukui condensados para átomos (CAFI) (YANG; MORTIER, 1986), os parâmetros de suavidade local (s_k^+ , s_k^- e s_k^0) (ALVES et al., 2020; MAIA et al., 2019) e as propriedades antioxidantes (MARTÍNEZ et al., 2008; PLÁCIDO et al., 2020) foram avaliados seguindo abordagens previamente relatadas (ALVES et al., 2020; MAIA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2024). As propriedades antioxidantes de PcT-1 e PpT-2 foram comparadas às de vários peptídeos, incluindo salamandrina-I (PLÁCIDO et al., 2020) (tanto com o N-terminal protonado quanto não protonado) e antioxidina-I (BARBOSA et al., 2018), além de outros compostos antioxidantes. Essas comparações foram realizadas utilizando os índices de aceitação de elétrons (R_a) e doação de elétrons (R_d) dentro do framework do mapa doador-aceptor (DAM) (MARTÍNEZ et al., 2008). Os cálculos baseados em KS-DFT foram realizados utilizando o pacote computacional Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009).

2.5 Ensaios químicos de atividade antioxidante

Para avaliar a atividade antioxidante dos peptídeos PcT-1 e PpT-2 foram realizados quatro métodos de ensaio colorimétricos. Os ensaios ABTS, DPPH, NO e ORAC. Para todos os ensaios, concentrações de PcT-1 e PpT-2 entre (2,0–0,25 mg/mL), e Trolox (0,2–0,003 mg/mL) em tampão fosfato salino (PBS).

2.5.1 Ensaio antioxidante ABTS

A atividade de captura de radicais livres foi determinada pelo método 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), avaliando a capacidade de absorção dos peptídeos em comparação a uma curva padrão (GIÃO et al., 2007). Para este teste, soluções estoque de ABTS (7 mM) e persulfato de amônio (APS) (245 mM) foram preparadas separadamente em água ultrapura. A solução de APS foi diluída para 2,45 mM com a solução estoque de ABTS para gerar o cátion radical ABTS azul-esverdeado, mantido no escuro por 12–16h à temperatura ambiente. A solução de ABTS foi então diluída em água até uma absorbância de 0,70 a 734 nm (espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu 1240). Em placas de multi-poços, alíquotas de 10 µL das diferentes concentrações dos peptídeos (PcT-1 e PpT-2) foram misturadas com 190 µL da solução de ABTS, mantidas no escuro por 5 minutos e lidas a 734 nm. O procedimento foi realizado também para Trolox (padrão) e glutathiona. Os experimentos foram conduzidos em triplicata para cada concentração. A redução da absorbância a 734 nm, proporcional à diminuição da concentração de ABTS ao ser tratado com PcT-1, PpT-2 e glutathiona, foi comparada com a curva padrão construída com diferentes concentrações de Trolox. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de Trolox por mg de peptídeo (GIÃO et al., 2007).

2.5.2 Ensaio antioxidante DPPH

No ensaio com 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), uma solução estoque de DPPH foi preparada em etanol a 60 µM. A solução de DPPH foi ajustada com etanol para atingir uma absorbância de 0,7 a 515 nm. Em placas de multi-poços, alíquotas de 20 µL de diferentes concentrações dos peptídeos (PcT-1 e PpT-2), glutathiona e Trolox foram misturadas com 180 µL da solução etanólica de DPPH, e a absorbância a 515 nm foi medida a 25 °C após 30 minutos. A redução da absorbância a 515 nm, que corresponde à concentração de DPPH reduzido por PcT-1, PpT-2 e glutathiona, foi comparada com a

curva padrão construída com diferentes concentrações de Trolox. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de Trolox por mg de peptídeo (BONDET et al., 1997). Os ensaios de ABTS e DPPH têm sido amplamente utilizados para avaliar a capacidade de captura de radicais de diversos peptídeos de origem animal (SHENG et al., 2023; WANG et al., 2022).

2.5.3 Ensaio antioxidante ORAC

O ensaio de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) mede a diminuição da fluorescência devido à ação de radicais sobre um substrato fluorescente (OU et al., 2001). Diferentes diluições de Trolox (0,1–0,003 mg/mL) e amostras de PcT-1 e PpT-2 em diferentes concentrações (2,00–0,25 mg/mL) foram preparadas em tampão fosfato (75 mM, pH 7,4). A reação foi realizada a 40 °C em placas de 96 poços com paredes pretas, com um volume final de 200 µL por poço. Todos os poços receberam fluoresceína de sódio (70 nM). A microplaca foi colocada em um leitor de microplacas multidetecção com filtro de excitação a 485 nm e filtro de emissão a 535 nm, incubada por 15 minutos a 40 °C. O composto 2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) di-hidrocloreto (AAPH) (14 mM) foi adicionado manualmente a cada poço para iniciar a reação, e leituras foram feitas a cada minuto por 130 minutos até atingir uma perda de 95% da fluorescência. A capacidade de inibição dos peptídeos foi avaliada comparando as áreas sob a curva de decaimento da fluoresceína de sódio (AUC) entre o branco e as amostras.

2.5.4 Ensaio antioxidante Óxido Nítrico

O ensaio de captura do radical óxido nítrico (NO) utiliza o reagente de Griess para quantificar os produtos estáveis nitrato e nitrito formados após a reação do NO com oxigênio sob condições aeróbicas (MARCOCCI et al., 1994). O reagente nitroprussiato de sódio (SNP) foi preparado a 10 mM em tampão fosfato salino (pH 7,4) e misturado com as soluções peptídicas. A mistura foi incubada a 25 °C por 150 minutos, seguida da adição do reagente de Griess e incubação adicional a 25 °C por 30 minutos. A absorbância foi medida a 546 nm. A atividade antioxidante foi expressa em mg de equivalentes de Trolox por mg de peptídeo.

2.6 Ensaios biológicos *in vitro*

2.6.1 Ensaio de atividade hemolítica

A atividade hemolítica dos peptídeos PcT-1 e PpT-2 foi avaliada utilizando hemácias humanas (RBCs) do tipo sanguíneo O⁺, coletadas em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) de um doador voluntário, conforme descrito anteriormente, com algumas modificações. Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Humanos da Universidade de Brasília (número do protocolo 47/2019). As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 292×*g*, e os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 37 °C. Os *pellets* foram então ressuspenso e diluídos em PBS para criar uma solução de eritrócitos a 5%.

Para o ensaio de hemólise, foram adicionados 80 µL da solução de eritrócitos a 5% a 20 µL das amostras de peptídeos em diferentes concentrações (1,6–0,25 mg/mL) de PcT-1 e PpT-2. As amostras foram incubadas por 1 h a 37 °C, seguidas pela adição de 100 µL de PBS e centrifugação por 5 minutos a 1000×*g*. A absorbância do sobrenadante foi lida a 550 nm utilizando um leitor de microplacas SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, EUA). O experimento foi realizado em triplicata. Para o controle negativo (sem hemólise), foi utilizado PBS (pH 7,4), e para o controle positivo (100% de hemólise), foi utilizado Triton X-100 a 0,1% (v/v). O percentual de hemólise foi calculado utilizando a fórmula:

$$[(\text{Abs}_{\text{peptídeo}} - \text{Abs}_{\text{PBS}})/(\text{Abs}_{\text{TritonX}} - \text{Abs}_{\text{PBS}})] \times 100.$$

Após a realização do teste de hemólise, as soluções de hemácias foram fixadas em solução fixadora de Karnovsky na proporção de 1:50 por 60 minutos sob agitação suave. Para fixar as hemácias, 10 µL de RBCs do grupo controle (PBS) e os respectivos peptídeos PcT-1 e PpT-2 nas concentrações mais altas foram misturados com 490 µL da solução fixadora em um microtubo. Para a preparação das lâminas, 100 µL da solução de RBCs fixadas foi espalhada sobre lâminas e deixada para secar durante a noite (12–16 h) sob leve agitação. As lâminas foram então coradas pelo método panótico: cada lâmina foi imersa por 5 segundos em cada corante, começando pelo panótico n° 1 (solução verde clara), seguido pelo panótico n° 2 (solução vermelha), e panótico n° 3 (solução azul escura). Após a coloração, a solução fixadora permitiu a visualização de todos os

elementos sanguíneos. Finalmente, as lâminas foram cobertas com lamínulas usando um meio de gelatina para análise microscópica.

2.6.2 Anti-hemólise induzida por AAPH

Para o ensaio de anti-hemólise induzida por AAPH, foi preparada uma solução de AAPH a 120 mM em PBS. Uma solução de eritrócitos humanos foi ajustada para 3% de células para o ensaio. Em microplacas, 80 µL da solução de células vermelhas foi misturado com 20 µL das soluções de peptídeos (1,6–0,25 mg/mL) e controles (positivo: AAPH para 100% de hemólise; negativo: PBS). A placa foi incubada com agitação suave a 37 °C por 20 minutos, seguida pela adição de 100 µL de AAPH para uma concentração final de 60 mM. A placa foi incubada novamente por 3 h a 37 °C com agitação. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 4700 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante (100 µL) foi transferido para uma nova placa para leitura a 550 nm para quantificar a atividade hemolítica. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade hemolítica e concentração média hemolítica (CH50), considerando o controle positivo como 100% de hemólise (LÖFGREN et al., 2008).

$$\text{Atividade hemolítica (\%)} = [(Abs_{\text{Amostra}} - Abs_{\text{Salina}}) / (Abs_{\text{AAPH}} - Abs_{\text{Salina}})] \times 100$$

2.7 Ensaio de toxicidade em *Galleria mellonella*

A toxicidade de PcT-1 e PpT-2 foi avaliada utilizando o modelo *in vivo* de *G. mellonella* (traça da cera), seguindo métodos previamente descritos (CUTULI et al., 2019). Para o ensaio, as larvas de *G. mellonella* foram selecionadas aleatoriamente e divididas em grupos de 16 larvas cada. As larvas foram injetadas com diferentes doses (40, 20 e 10 mg/kg) de PcT-1 ou PpT-2, enquanto o grupo controle foi injetado apenas com PBS. As injeções foram administradas na última *proleg* esquerda das larvas. Após a injeção, as larvas foram incubadas a 37 °C por 7 dias. A sobrevivência das larvas foi monitorada diariamente, sendo a morte definida pela ausência de movimento em resposta ao toque. O experimento foi realizado duas vezes, e as curvas de sobrevivência foram geradas usando o *software* GraphPad Prism 6. O PBS foi usado como controle.

Para a análise histológica, os espécimes de larvas de *G. mellonella* foram fixados em solução de formaldeído a 10% e processados de acordo com a técnica padrão de

histologia. Posteriormente, os espécimes foram embebidos em parafina, cortados com espessura de 6 µm, desparafinizados e corados com hematoxilina e eosina para avaliar a morfologia e com ácido periódico de Schiff para diferenciar os polissacarídeos (MESA-ARANGO et al., 2013).

2.8 Ensaio de disfunção endotelial induzida por pirogalol

Ratos machos *Wistar*, pesando entre 180 e 250 g e com idades de 8 a 12 semanas, foram obtidos na Instalação de Animais da Universidade Federal do Piauí (UFPI, Teresina, PI, Brasil). O protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPI (#457/18). Os ratos foram alojados com acesso irrestrito a alimentos e água, mantidos em um ciclo de luz/escuro de 12 h e em temperatura constante de 23 ± 2 °C durante todo o período experimental. A metodologia para preparar os anéis aórticos seguiu os procedimentos descritos por Arcanjo et al. (2015). Para avaliar os efeitos vasculares antioxidantes de PcT-1 e PpT-2, anéis aórticos com endotélio intacto foram incubados com o gerador de superóxido pirogalo (30 µM) por 30 minutos. Isso foi feito após a pré-incubação com PcT-1 ou PpT-2, por 30 minutos. Subsequentemente, foi adicionada fenilefrina (3×10^{-7} M) e, ao atingir a fase tônica de contração, a acetilcolina (ACh, 10^{-9} – 10^{-5} M) foi adicionada progressivamente para gerar uma curva de concentração-resposta (BANGSHAAB et al., 2019; MENDES FURTADO et al., 2022). Os dados foram analisados usando regressão não linear e a significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni, utilizando o *software* GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Material biológico e caracterização morfológica da pele de *P. centralis*

As triptofilinas constituem uma família de peptídeos originalmente isolados de rãs da América do Sul denominada *Pithecopus rohdei* (MERTENS, 1926). Normalmente, os peptídeos desta família contêm peptídeos tetra-, penta-, hepta-, e decapeptídeos. O gênero *Pithecopus* junto com outro gênero como *Pachymedusa* sp. (sapo mexicano) e *Litoria* sp. (Sapo australiano) e *Ascaphus* sp. (rãs com cauda), também possui peptídeos relacionados aos triptofilinos (CEI, 1985; CONLON et al., 2005; ELLIS-STEINBORNER et al., 2011; MONTECUCCHI, 1985; WANG et al., 2009). Neste estudo, realizamos a triagem de

peptídeos a partir do cDNA produzido a partir do RNA extraído da pele de *P. centralis* coletada em Formoso do Araguaia, Tocantins, Brasil (Figura. 1A e B). Esta espécie, conhecida por seus hábitos terrestres, prospera em ambientes como áreas alagadas e brejos temporários e é comumente encontrada em áreas abertas (LOEBMANN et al., 2017).

O estudo histológico de tecidos excisados de *P. centralis* (Figura. 1C) mostra a epiderme superficial e a derme, destacando diferentes tipos de glândulas (400 ×), coradas com hematoxilina e eosina (Figura. 1D). A pele exibe glândulas granulares com ductos secretórios (Figura. 1D, 1000 ×). A epiderme, corada com hematoxilina-eosina, revela um epitélio mucoso estratificado (não queratinizado), composto por várias camadas de queratinócitos. Sob a epiderme, dentro da derme, podem ser observadas dois tipos de glândulas alveolares simples: glândulas mucosas e glândulas serosas ou granulares.

3.2 Clonagem Molecular do cDNA Precursor da Pele de *P. centralis*

Dois peptídeos da classe das triptofilinas foram identificados utilizando ferramentas de biologia molecular. O RNA total foi extraído da pele dorsal de *P. centralis* e transcrito para cDNA usando primers específicos, que foram então clonados e sequenciados. Os peptídeos foram inicialmente nomeados como *P. centralis* triptofilina-1 (PcT-1) e *P. centralis* triptofilina-2 (PcT-2), de acordo com a nomenclatura previamente sugerida. A estrutura de leitura aberta do cDNA consistiu em 72 resíduos de aminoácidos para o PcT-1 e 59 resíduos de aminoácidos para o PcT-2, com o tamanho médio dos inseridos de DNA sendo aproximadamente 280–320 bp de comprimento (Figura. 2). O alinhamento do cDNA das sequências de aminoácidos de PcT-1 e PpT-2 revelou que ambas apresentam estruturas primárias semelhantes, exibindo o peptídeo sinal tipicamente seguido por um domínio rico em resíduos ácidos com locais de processamento (-R-R-/-K-R-) (WANG et al., 2015). O maior grau de similaridade foi encontrado no peptídeo sinal putativo, enquanto diferenças foram observadas na região ácida, nos polimorfismos nucleotídicos e nos domínios de códons de parada do peptídeo.

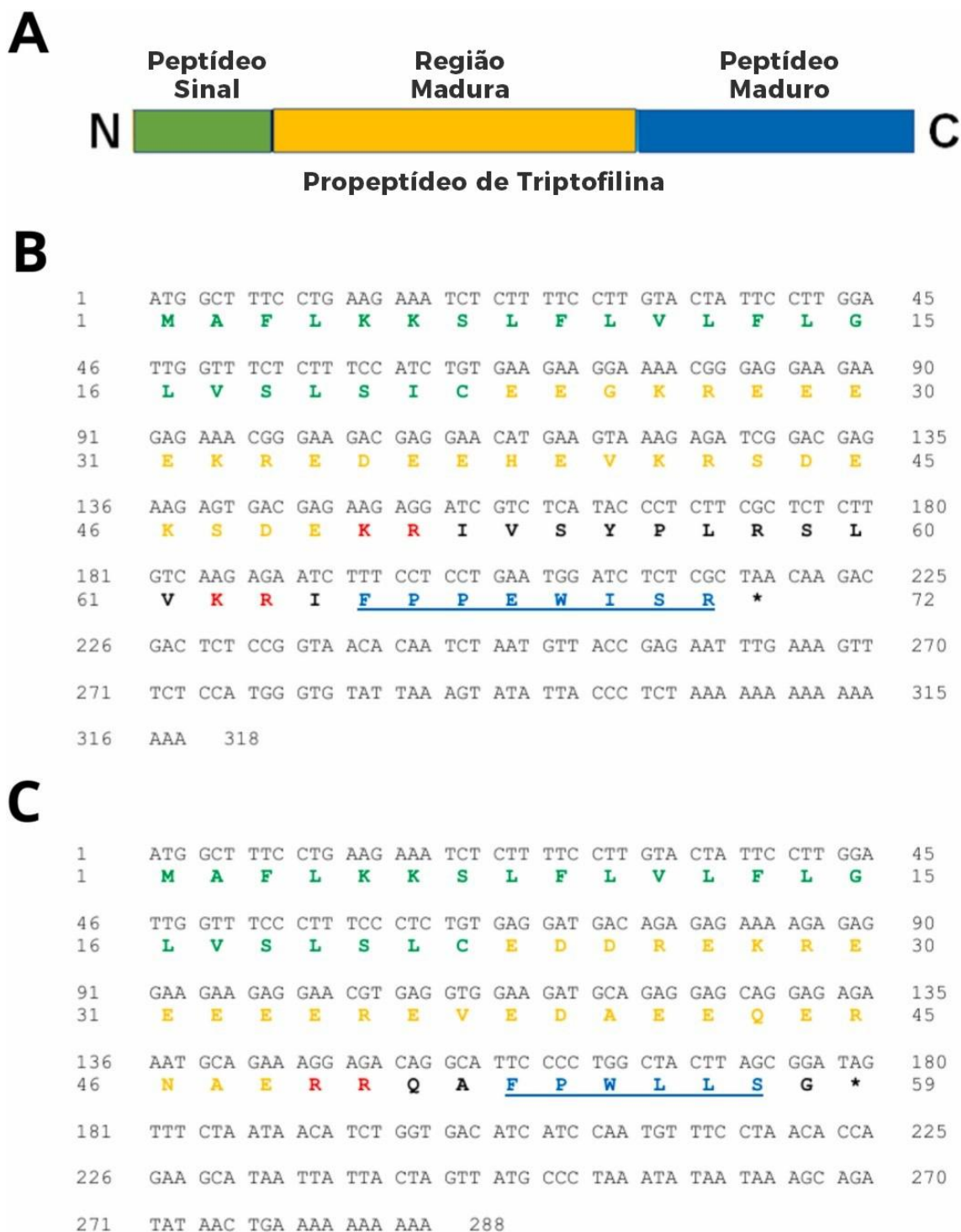


Figura 10. Sequências de cDNA dos precursores de peptídeos. **(A)** Esquema básico de uma sequência de precursor de peptídeo. **(B)** Sequência de cDNA e sequências de aminoácidos previstas de PcT-1. **(C)** Sequência de cDNA e sequências de aminoácidos previstas de PpT-2. Peptídeo sinal (verde), peça ácida (laranja) e peptídeo maduro (azul). Polimorfismos nucleotídicos estão destacados em vermelho. O ponto preto indica o códon de parada.

Com base em sua sequência, os peptídeos foram classificados como membros da família de triptofilinas, contendo o motivo sequencial conservado comum -PW ou -PP,

típico desse tipo. A presença de uma glicina C-terminal na sequência de cDNA do PpT-2 sugere que ele sofre amidação C-terminal, um processo no qual a glicina atua como doadora de nitrogênio, resultando na forma amidada do peptídeo e na ausência de glicina em sua sequência final. Em contraste, o PcT-1 não possui uma glicina C-terminal, indicando que não é amidado. Outras triptofilinas foram estudadas em trabalhos diferentes, e foi possível comparar esses peptídeos em relação à sua estrutura primária (Tabela 1). Vale destacar que o PcT-2 é idêntico a um peptídeo previamente identificado da pele de *Pelophylax perezi*, nomeado PpT-2, que também possui um C-terminal amidado (PLÁCIDO et al., 2022). Portanto, o nome PpT-2 será usado para se referir a esse peptídeo a partir deste ponto. A maioria das triptofilinas estudadas até o momento possui a ligação -PW em sua sequência, e o Brasil é a região endêmica da espécie *P. rohdei*, que possui o maior número de peptídeos descobertos nesse grupo (MONTECUCCHI, 1985).

Além disso, a presença de resíduos de prolina (em ambos os peptídeos) indica a possibilidade de adoção de diferentes rotâmeros cis/trans (WANG et al., 2013). Identificar tais semelhanças entre diferentes peptídeos de anfíbios pode melhorar nosso entendimento e ser útil para prever e projetar novos peptídeos com aplicações potenciais na prevenção ou tratamento de condições associadas ao estresse oxidativo, como inflamação e neurodegeneração (TRAN et al., 2021).

Tabela 3. Estruturas primárias e origem dos peptídeos triptofilinas de anfíbios.

Estrutura	Nome	Espécie	Peso Molecular (g/mol)	Referência
FPPEWISR	PcT-1	<i>Physalaemus centralis</i>	1031.16	Este trabalho.
FPWLLSa	PpT-2	<i>Pelophylax perezi</i>	760.92	PLÁCIDO et al., 2022
		<i>Physalaemus centralis</i>	760.92	Este trabalho.
FPPWLa	PaT-2	<i>Pithecopus azureus</i>	657.8	BARBOSA et al., 2021
PWL _a	s/n	<i>Litoria rubella</i>	413.51	TRAN et al., 2021
PWL	s/n	<i>Litoria rubella</i>	414.5	TRAN et al., 2021
FPWL _a	s/n	<i>Litoria rubella</i>	560.69	TRAN et al., 2021
FPWL	s/n	<i>Litoria rubella</i>	561.67	TRAN et al., 2021
ZPWLa	s/n	<i>Litoria rubella</i>	652.74	TRAN et al., 2021

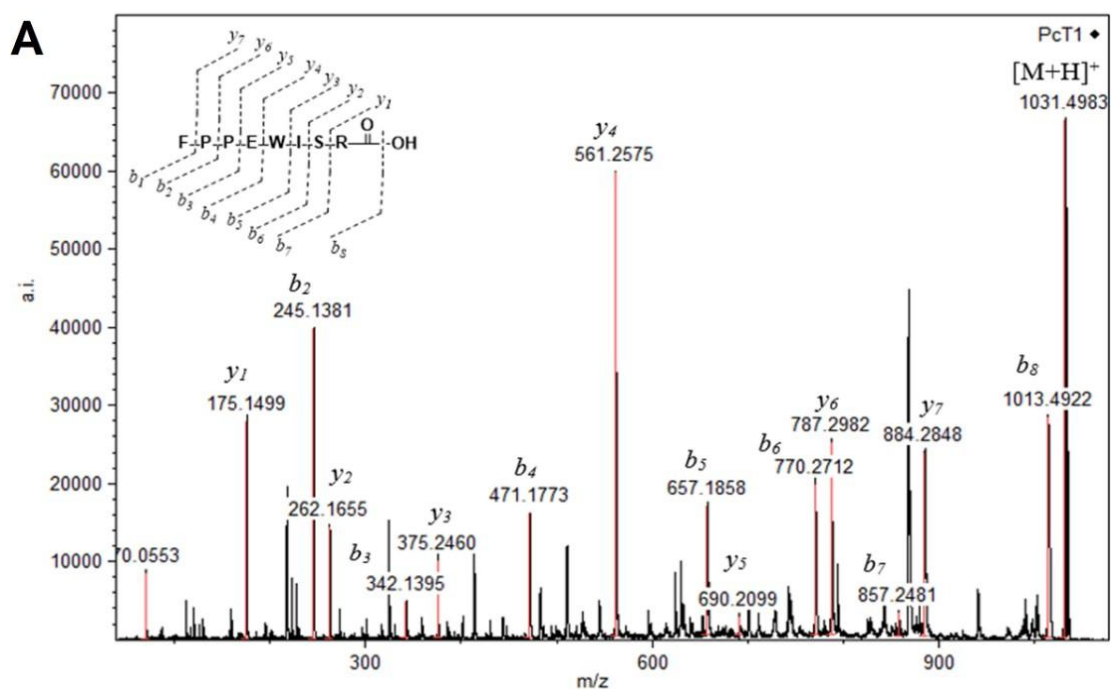
Estrutura	Nome	Espécie	Peso Molecular (g/mol)	Referência
FPFWLa	s/n	<i>Litoria rubella</i>	707.86	TRAN et al., 2021
SPWL	s/n	<i>Litoria rubella</i>	501.57	TRAN et al., 2021
IPWLa	s/n	<i>Litoria rubella</i>	526.67	TRAN et al., 2021
FWPPa	s/n	<i>Litoria rubella</i>	544.64	TRAN et al., 2021
FWPP	s/n	<i>Litoria rubella</i>	545.63	TRAN et al., 2021
ZPWPFa	s/n	<i>Litoria rubella</i>	783.87	TRAN et al., 2021
LPWYa	s/n	<i>Litoria rubella</i>	576.69	TRAN et al., 2021
FLPWYa	s/n	<i>Litoria rubella</i>	723.86	TRAN et al., 2021
ZIPWFHRa	s/n	<i>Litoria rubella</i>	1093.24	TRAN et al., 2021
ZGKPYWPPFLPE	AcT-3	<i>Agalychnis callidryas</i>	1666.87	WANG et al., 2015
GMRPPWFa	AcT-2	<i>Agalychnis callidryas</i>	889.08	GE et al., 2014
KPPPWVPV	PsT-1	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	919.12	WANG et al., 2013
DMSPPWHa	PdT-2	<i>Pachymedusa dacinicolor</i>	867.97	WANG et al., 2009
GPIPWQR	s/n	<i>Ascaphus truei</i>	852.98	CONLON et al., 2005
GPIPWQRRI	s/n	<i>Ascaphus truei</i>	1122.32	CONLON et al., 2005
DPWDWV	s/n	<i>Ascaphus truei</i>	816.86	CONLON et al., 2005
EP RTPWDWV	s/n	<i>Ascaphus truei</i>	1185.29	CONLON et al., 2005
KP(HyP)AWPa	PdT-1	<i>Pachymedusa dacinicolor</i>	709.84	CHEN et al. (2004)
ZFPWL	L1	<i>Litoria rubella</i>	800.9	STEINBORNER et al., 1994
FPWL	L2	<i>Litoria rubella</i>	561.67	STEINBORNER et al., 1994
FLPWY	L3	<i>Litoria rubella</i>	724.84	STEINBORNER et al., 1994
ZIPWFHR	L4	<i>Litoria rubella</i>	1094.22	STEINBORNER et al., 1994
FPPWV	T-2a	<i>Phyllomedusa rhodei</i>	644.76	MONTECUCCHI.,1985
FPPWLa	T-2b	<i>Phyllomedusa rhodei</i>	657.8	MONTECUCCHI.,1985
PPWMa	T-2c	<i>Phyllomedusa rhodei</i>	675.84	MONTECUCCHI.,1985

Estrutura	Nome	Espécie	Peso Molecular (g/mol)	Referência
ZPWVa	T-2d	<i>Phyllomedusa rhodei</i>	638.71	MONTECUCCHI.,1985
ZPWMa	T-2e	<i>Phyllomedusa rhodei</i>	670.78	MONTECUCCHI.,1985

R-a (amidação C-terminal); Z, ácido piroglutâmico; s/n: sem nome

3.3 Síntese de peptídeos, purificação e caracterização estrutural de PcT-1 e PpT-2

PcT-1 e PpT-2 foram sintetizados por síntese de peptídeos em fase sólida Fmoc/tBu, utilizando resina Wang para PcT-1 e resina Rink amida para PpT-2. Os espectros MALDI-TOF-MS/MS de PcT-1 mostraram um $[M+H]^+ = 1031,4983$ Da ($[M+H]^+$ calculado para $C_{50}H_{71}N_{12}O_{12}^+$ é 1031,5309) e um padrão de fragmentação que coincidiu com a sequência de aminoácidos FPPEWISR. Por outro lado, os espectros MS/MS para PpT-2 mostraram um $[M+H]^+ = 761,5078$ Da ($[M+H]^+$ calculado para $C_{40}H_{57}N_8O_7^+$ é 761,4345) e a sequência de aminoácidos determinada a partir do espectro MS/MS foi FPWLLS-NH₂ (Figura. 3).



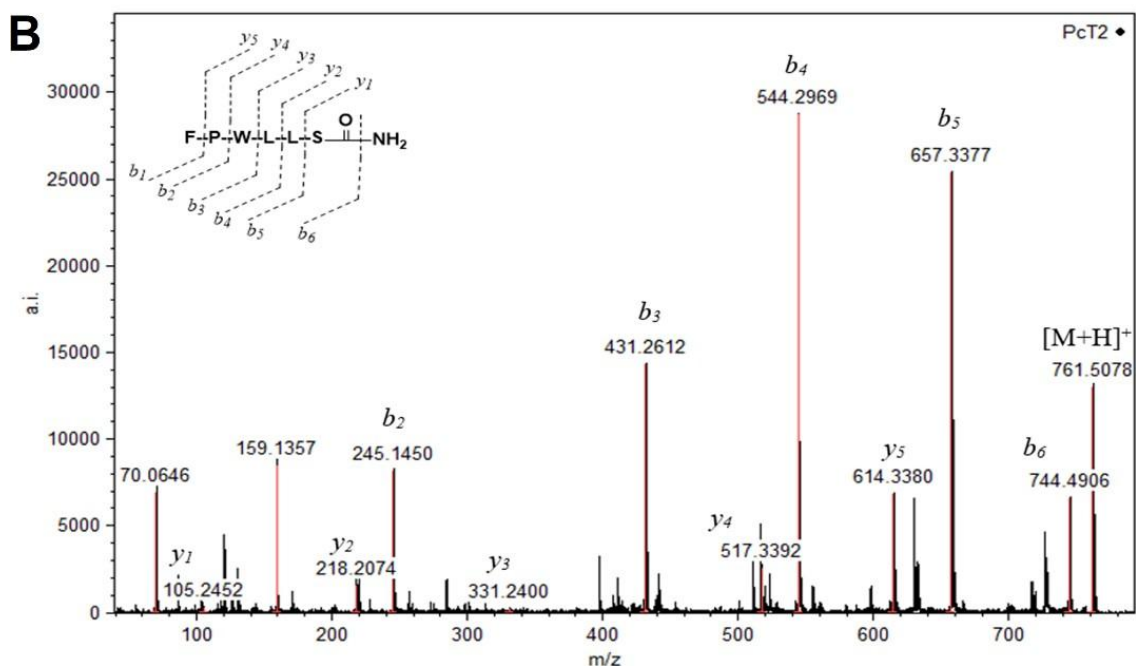


Figura 11: Peptídeos sintéticos de triptofilina. **(A)** Espectros MS/MS de PcT-1, $[M+H]^+ = 1031,4983$ Da com a sequência de aminoácidos FPPEWISR. **(B)** Espectros MS/MS de PpT-2, $[M+H]^+ = 761,5078$ Da com a sequência de aminoácidos FPWLLS-NH₂.

3.4 Estudos de antioxidantes *in silico*

Foi realizado um estudo baseado na Teoria do Funcional da Densidade (DFT)) para investigar as propriedades eletrônicas e compreender a relação atividade-antioxidante-estrutura nos peptídeos PcT-1 e PpT-2, bem como em outros peptídeos (antioxidina-I, Barbosa et al., 2018; salamandrina-I, Plácido et al., 2020; e glutathione) e moléculas antioxidantes (melatonina, vitamina C, vitamina E e trolox). A Figura. 4A mostra o mapa doador-aceptor (DAM) desses compostos, evidenciando que o PpT-2 age como um bom aceitador de elétrons (e um mau doador). O PcT-1 apresenta propriedades de aceitador/doador semelhantes às de outros peptídeos antioxidantes descritos anteriormente, antioxidina-I e salamandrina-I, indicando que esses compostos podem apresentar mecanismos análogos. A Figura. 4B ilustra os índices Fukui condensados para os átomos (CAFI) de peptídeos selecionados. As cores vermelha e azul representam os locais reativos e não reativos, respectivamente, em relação a nucleófilos (f^+), eletrófilos (f^-) e radicais livres (f^0). As outras cores definem locais com reatividade intermediária, de acordo com a escala RGB. Esses resultados evidenciam a relevância dos resíduos de Trp (f^+ e f^-), Pro e Phe (f^+) na reatividade local do PpT-2 (como no S-I). A reatividade local do PcT-1 é dominada por Phe (f^+), Trp e Glu (f^-) (semelhante ao antioxidina-I).

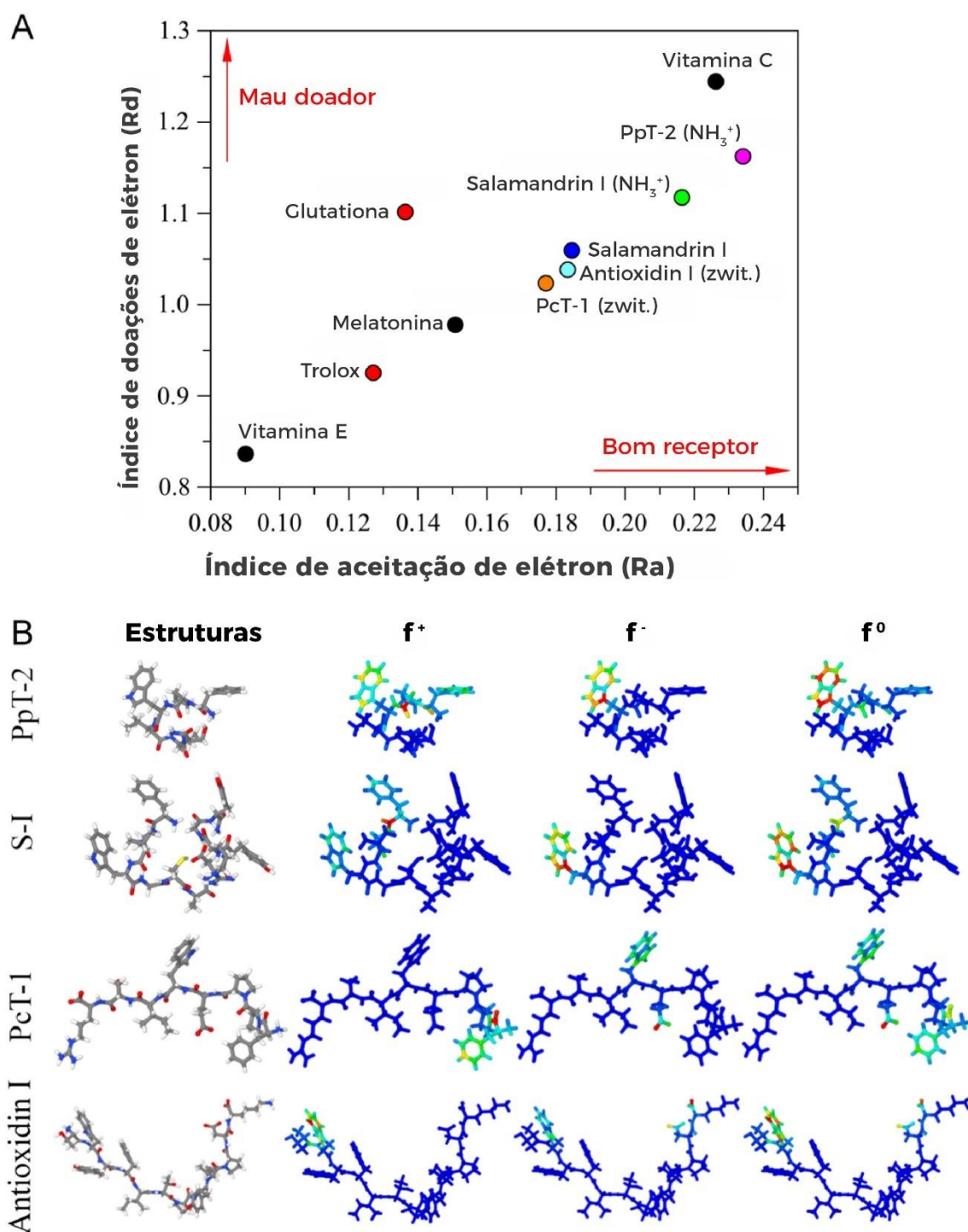


Figura 12. Razão de doação / aceitação de elétrons de vários peptídeos derivados de anfíbios e outros antioxidantes de baixo peso molecular. **(A)** PcT-1 e PpT-2 foram comparados com antioxidina-I, salamandrina-I, glutathiona, melatonina, vitamina C, vitamina E e trolox. **(B)** Representação molecular 3D de PcT-1, PpT-2, salamandrina-I protonado (S-I) e antioxidina-I. Esquema de cores dos átomos: cinza (C) vermelho (O) e branco (H). Representação em cores dos índices Fukui condensados para reações com nucleófilos (f^+), eletrófilos (f^-) e radicais livres (f^0). As cores vermelha e azul representam locais reativos e não reativos, respectivamente. Outras cores representam situações intermediárias, seguindo uma escala RGB.

3.5 Atividade antioxidante *in vitro*

A capacidade de PcT-1 e PpT-2 de capturar radicais livres foi avaliada *in vitro* usando diferentes tipos de ensaios. Apesar da falta de correlação entre o desempenho das moléculas antioxidantes em ensaios *in vitro* e sua ação antioxidante real *in vivo* (FORMAN et al., 2014), esses ensaios são úteis para uma triagem inicial da capacidade antioxidante (GRANATO et al., 2018; SHENG et al., 2023. WANG et al., 2022). Dadas as limitações e os pontos fortes de diferentes ensaios (PRIOR et al., 2005), utilizamos um conjunto de quatro ensaios de captura de radicais. Os peptídeos apresentaram uma considerável atividade de captura de radicais livres nos ensaios ABTS, ORAC e NO, enquanto nenhuma atividade foi detectada no ensaio DPPH (Tabela 2). Apesar das diferenças em suas estruturas primárias e propriedades de doação/aceitação de elétrons, PcT-1 e PpT-2 tiveram desempenhos semelhantes nos ensaios de captura de radicais, com PcT-1 apresentando um desempenho ligeiramente melhor (Tabela 2).

A falta de atividade no ensaio DPPH, apesar da considerável capacidade de captura observada nos ensaios ABTS, ORAC e NO, pode ser atribuída às diferenças nas condições dos ensaios e à natureza dos radicais envolvidos. O ensaio DPPH utilizou etanol como solvente, onde peptídeos como PcT-1 e PpT-2 podem ter solubilidade limitada, reduzindo sua interação com o radical DPPH. Além disso, o DPPH é um radical maior e hidrofóbico, com um considerável obstáculo estérico, favorecendo interações com antioxidantes menores e lipofílicos (PRIOR et al., 2005). Em contraste, os ensaios ABTS, ORAC e NO utilizaram água como solvente, o que é compatível com a natureza hidrofílica dos peptídeos, permitindo uma captura de radicais mais eficaz. Essas diferenças nos ambientes de solvente e nas estruturas dos radicais destacam como as condições do ensaio podem influenciar a atividade antioxidante observada *in vitro*.

Tabela 4. Capacidade de captura de radicais livres de PcT-1 e PpT-2 avaliada com diferentes ensaios *in vitro*: o ensaio de captura do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), o ensaio de captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), o ensaio de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e o ensaio de captura de óxido nítrico (NO). Os resultados são expressos como mg de equivalente de Trolox por mg de peptídeo.

Peptídeo	Ensaio antioxidante <i>in vitro</i>			
	ABTS	DPPH	ORAC	NO
PcT-1	0.30	n.d.	0.319	0.031
PpT-2	0.269	n.d.	0.248	0.039

n.d., não detectado.

3.6 Teste de hemólise e anti-hemólise induzida por AAPH

Em seguida, as propriedades antioxidantes de ambos os peptídeos foram avaliadas no ensaio de hemólise induzida por AAPH, utilizando glóbulos vermelhos humanos. Semelhante aos experimentos anteriores, PcT-1 e PpT-2 foram capazes de inibir a hemólise induzida por oxidação (Figura. 5C e D), com PcT-1 apresentando um efeito ligeiramente mais pronunciado (Figura. 5C). De fato, a 0,2 mg/mL, PcT-1 teve um efeito antioxidante comparável ao de trolox, um potente antioxidante e molécula modelo para ensaios antioxidantes.

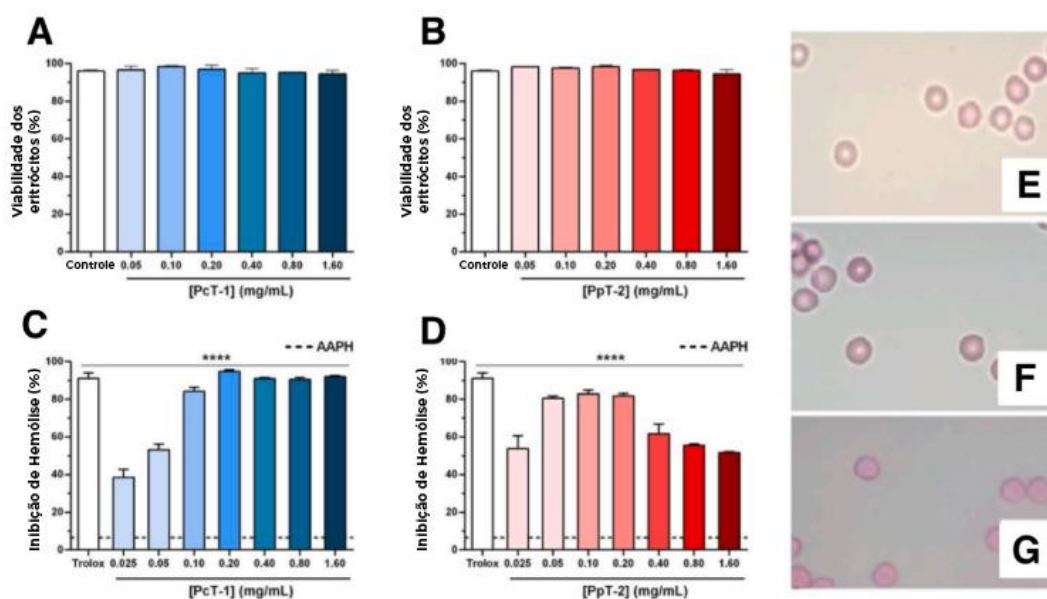


Figura. 13. Efeito citotóxico de PcT-1 (A) e PpT-2 (B) em eritrócitos humanos. Os valores são expressos como média $\pm$ SEM. Efeito de PcT-1 (C) e PpT-2 (D) na inibição da hemólise após exposição por 3 h com AAPH. Os valores são expressos como média $\pm$ SEM. **** $p < 0,0001$ versus grupo controle Trolox representado pela linha tracejada. Imagem comparativa de microscopia de luz (100X) entre eritrócitos humanos submetidos ao controle PBS (E), PcT-1 (F) e PpT-2 (G). As lâminas ilustram a ausência de alterações na morfologia das células vermelhas tratadas com 1,6 mg/mL de PcT-1 ou PpT-2.

A atividade antioxidante de peptídeos de diferentes fontes tem sido investigada, como aqueles obtidos por hidrólise química de produtos alimentícios, fermentação microbiana de substratos e secreções animais. A atividade antioxidante de peptídeos têm sido associada a resíduos contendo enxofre, como Cys (YANG et al., 2016) e Met (SAMARANAYAKA e LI-CHAN, 2011). A presença e o número de resíduos aromáticos, como Phe, Trp e Tyr, também têm sido atribuídos à atividade de varredura de radicais dos peptídeos (RAJAPAKSE et al., 2005; SAMARANAYAKA e Li-Chan, 2011). No caso de peptídeos derivados de anfíbios, a presença e a posição de Pro têm sido

associadas à atividade antioxidante (YANG et al., 2009). Em uma triagem extensa de peptídeos de *R. pleuraden*, todas as moléculas com propriedades antioxidantes continham pelo menos um resíduo de Pro (YANG et al., 2009). De fato, Pro é comum em peptídeos antioxidantes de anfíbios (YANG et al., 2016) e fontes alimentícias (ZOU et al., 2016). Vale ressaltar que Pro e Trp, como aminoácidos isolados, têm potentes propriedades antioxidantes, modulando o equilíbrio redox e protegendo células mamárias contra a morte celular induzida por estresse oxidativo (KRISHNAN et al., 2008). Ao criar variantes de peptídeos com Gly em vez dos resíduos originais de aminoácidos e avaliar a função antioxidante, Pro, Met, Cys e Tyr foram identificados como aminoácidos com grande impacto na capacidade antioxidante, enquanto Trp tem um impacto, mas menor (YANG et al., 2009). As duas triptofilinas identificadas aqui possuem Phe, Pro e Trp, cujas presenças provavelmente conferem propriedades de varredura de radicais (como de fato confirmado pelas análises *in silico*). Diferenças chave entre PcT-1 e PpT-2 são o número de resíduos de Pro e a posição do resíduo de Trp, o que poderia ser responsável pela ligeiramente melhor performance do PcT-1, com dois Pro, nos ensaios de varredura de radicais. Apesar das indicações de papéis chave de aminoácidos específicos na ação antioxidante *in vitro*, a simples presença desses resíduos não garante atividade antioxidante. Isso é ilustrado pela falta de atividade antioxidante em alguns peptídeos contendo Pro, Met, Cys, Tyr e Trp, o que indica que a função antioxidante depende da sequência (YANG et al., 2009).

3.7 Toxicidade de PcT-1 e PpT-2 *in vitro* e *in vivo*.

Avançando para o uso futuro de PcT-1 e PpT-2 (triptofilinas) em estudos *in vivo*, avaliamos sua toxicidade; primeiro *in vitro* e depois *in vivo*. Alguns peptídeos são capazes de destruir as membranas celulares (LIN et al., 2021), um mecanismo pelo qual eles exercem atividade antimicrobiana (BENFIELD; HENRIQUES, 2020). Em alguns casos, essa capacidade de destruição da membrana é seletiva para membranas bacterianas, mas, às vezes, também induz a destruição de membranas de células não-alvo. Dado que muitos peptídeos derivados de rãs apresentam tanto atividades antioxidantes quanto antimicrobianas (YANG et al., 2009), testamos o possível efeito hemolítico de PcT-1 e PpT-2 sobre os glóbulos vermelhos humanos. Ambos os peptídeos não exerceram atividade lítica contra os eritrócitos humanos (Figura. 5A e B). Além da hemólise

quantificada pela liberação de hemoglobina, os glóbulos vermelhos não apresentaram morfologia anormal após o tratamento com PcT-1 ou PpT-2 (Figura. 5E, F e 5G). Isso sugere que ambos os peptídeos não são tóxicos para os eritrócitos, de maneira semelhante a outros peptídeos testados anteriormente (MARANI et al., 2015).

Em seguida, usamos larvas de *G. mellonella* como um sistema de organismo inteiro para avaliar preliminarmente sua toxicidade *in vivo*. Nenhuma das concentrações testadas de PcT-1 e PpT-2 induziu morte das larvas de *G. mellonella* durante os 7 dias de tratamento (Figura. 6A), corroborando sua baixa/ausente toxicidade. Esse resultado contrasta com os efeitos observados com outros peptídeos e com produtos químicos tanto tóxicos quanto não tóxicos estudados previamente (ALLEGRA et al., 2018; CUTULI et al., 2019; KAVANAGH e SHEEHAN, 2018). Ao comparar as seções longitudinais das larvas tratadas com os peptídeos e PBS (controle negativo) ao microscópio, nenhuma alteração morfológica foi identificada nas larvas tratadas com os peptídeos (Figura. 6B, C e 6D). No geral, ambos os peptídeos apresentam perfis de segurança favoráveis e podem ser investigados em estudos *in vivo*.

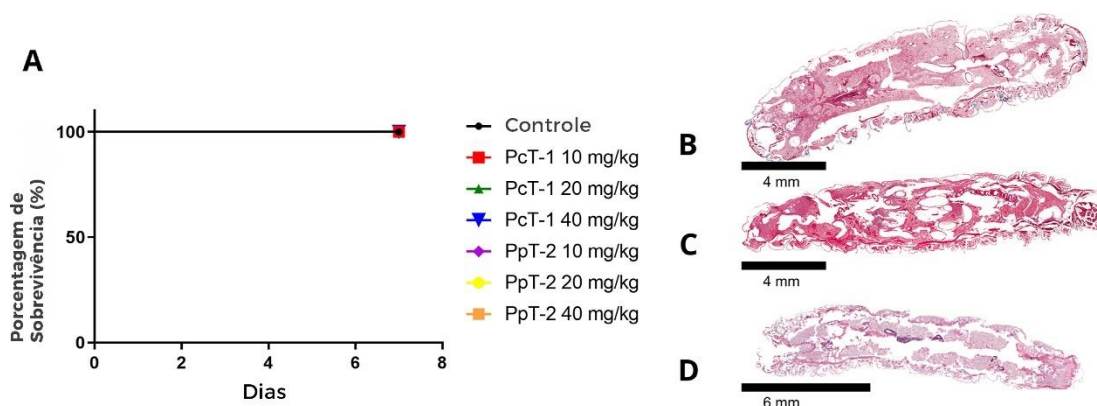


Figura 14: Ensaio de toxicidade *in vivo*. **(A)** Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* avaliando a toxicidade de PcT-1 e PpT-2 a 10, 20 e 40 mg/kg durante 7 dias, com PBS usado como controle do ensaio de toxicidade. Seção longitudinal de *G. mellonella* em coloração Azan. **(B)** Larvas tratadas com PBS. **(C)** Larvas tratadas com PcT-1. **(D)** Larvas tratadas com PpT-2.

3.8 Teste de disfunção endotelial induzida por pirogalol

Os peptídeos PcT-1 e PpT-2 demonstraram efeitos protetores discretos, mas significativos, contra a disfunção endotelial induzida por pirogalol (Figura. 7). O pirogalol ou ácido gálico, um conhecido gerador de radicais superóxidos, prejudica severamente a vasorrelaxamento induzida por acetilcolina (ACh), refletindo danos oxidativos à camada endotelial. A pré-incubação com PcT-1 e PpT-2 restaurou

parcialmente as respostas vasorrelaxantes, indicando seu potencial para mitigar o estresse oxidativo. PpT-2 demonstrou um efeito protetor mais forte, provavelmente devido à sua composição estrutural, que aprimora a atividade antioxidante por meio de resíduos como prolina e triptofano (Figura. 7B).

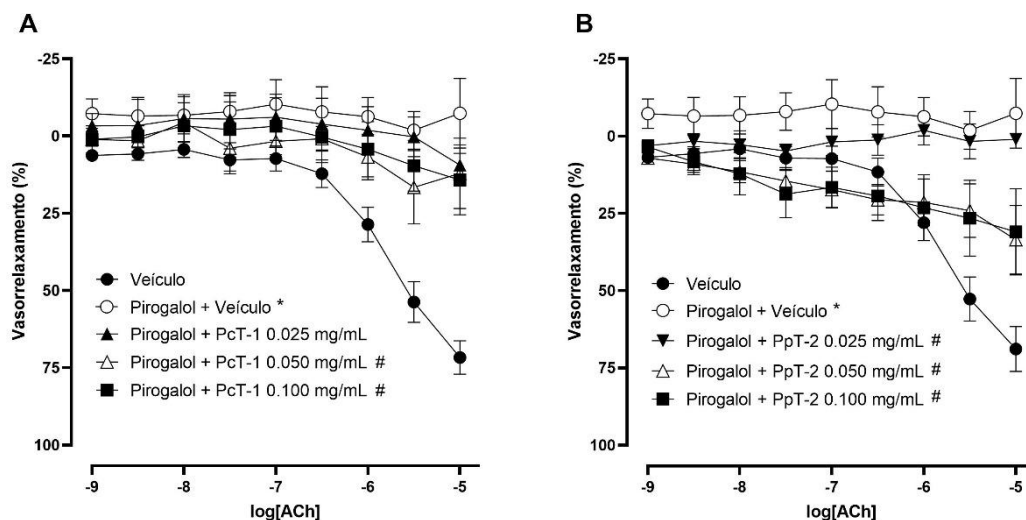


Figura. 15. Efeito de PcT-1 e PpT-2 na disfunção endotelial induzida por pirogálico na aorta torácica de rato. Curvas de resposta concentração versus ACh na presença de veículo, pirogálico (PYR, 3×10^{-5} M) e PcT-1 (A) ou PpT-2 (B). Os pontos representam média $\pm$ SEM. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo veículo e o octothorpe (#) indica diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo Pyrogallol + Vehicle ($p < 0,05$). Veículo refere-se ao efeito da acetilcolina na solução de Krebs sem PcT-1 ou PpT-2, enquanto Pyrogallol + Vehicle indica o efeito da acetilcolina após pré-incubação com pirogálico na solução de Krebs, também sem PcT-1 ou PpT-2.

Essa proteção contra danos oxidativos é crucial no contexto da aterosclerose, onde o estresse oxidativo, um evento inicial chave na doença, desempenha um papel central na disfunção endotelial. Células endoteliais sob estresse oxidativo perdem sua capacidade de produzir NO, essencial para a homeostase vascular, levando à inflamação, adesão de leucócitos e eventual formação de placas (MEDINA-LEYTE et al., 2021). Ao inibir os processos oxidativos que reduzem a biodisponibilidade do NO, os peptídeos PcT-1 e PpT-2 poderiam contribuir para preservar a função endotelial, que é vital para prevenir ou retardar a progressão da aterosclerose.

Peptídeos como o PcT-1 e o PpT-2, que exibem efeitos antioxidantes e vasoprotetores, têm mostrado prevenir a degradação oxidativa do NO e melhorar o relaxamento dependente do endotélio nos tecidos vasculares. Isso sugere que esses peptídeos poderiam interromper o ciclo de estresse oxidativo e inflamação que

fundamenta a aterosclerose. No caso da atividade vasoprotetora, o PpT-2 apresentou um efeito mais pronunciado do que o PcT-1, sendo um candidato mais promissor para investigações futuras. Ao sequestrar radicais livres e proteger as células endoteliais, PcT-1 e PpT-2 poderiam oferecer potencial terapêutico não apenas para manter a integridade vascular, mas também para reduzir a formação de placas, abordando assim as causas principais do desenvolvimento aterosclerótico (SCIOLI et al., 2020).

Além disso, sua baixa citotoxicidade, evidenciada pela ausência de efeitos hemolíticos em células vermelhas humanas e baixa toxicidade em larvas de *G. mellonella*, apoia sua viabilidade para uso a longo prazo em intervenções terapêuticas. Sua capacidade de mitigar a disfunção endotelial sob condições de estresse oxidativo posiciona os peptídeos PcT-1 e PpT-2 como candidatos promissores para o tratamento de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose. Isso se alinha com o crescente interesse em peptídeos antioxidantes como agentes farmacêuticos voltados ao combate da inflamação vascular e danos oxidativos (SEN e CHAKRABORTY, 2011).

No geral, esses achados destacam o potencial terapêutico do PcT-1 e do PpT-2 na prevenção da disfunção endotelial, um fator crítico no início da aterosclerose. A capacidade de restaurar o relaxamento vascular (Figura. 7) sugere que esses peptídeos poderiam desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento de novos tratamentos voltados a doenças relacionadas ao estresse oxidativo, particularmente a aterosclerose.

4. CONCLUSÃO

Neste estudo, conseguimos identificar e caracterizar dois peptídeos de triptofilina, PcT-1 e PpT-2, provenientes das secreções cutâneas da rã-anã central (*P. centralis*), explorando suas propriedades antioxidantes com implicações promissoras para uso terapêutico. Ambos os peptídeos exibiram atividade significativa de varredura de radicais nos ensaios ABTS, ORAC e NO, com o PcT-1 apresentando uma ligeira vantagem devido às suas características estruturais únicas, e o PpT-2 demonstrando superioridade na atividade antioxidante vascular. Importante, ambos os peptídeos não foram citotóxicos para os eritrócitos humanos e mostraram segurança em *G. mellonella in vivo*, destacando seu potencial como agentes terapêuticos seguros.

Nosso estudo posiciona os peptídeos PcT-1 e PpT-2 como alternativas naturais com propriedades antioxidantes que podem complementar ou melhorar terapias

existentes. Ao contrário dos antioxidantes sintéticos, peptídeos como PcT-1 e PpT-2 oferecem uma abordagem biocompatível que se alinha mais estreitamente aos processos fisiológicos, potencialmente reduzindo o estresse oxidativo e a inflamação sem efeitos adversos significativos. Peptídeos têm, de fato, ganhado mais atenção recentemente. Por exemplo, peptídeos derivados de sapos têm sido investigados como alternativas terapêuticas possíveis para prevenir ou tratar diversas condições fisiopatológicas associadas à inflamação e ao estresse oxidativo, incluindo cicatrização de feridas na pele (LI et al., 2023; LI et al., 2024), danos por radiação ultravioleta (WANG et al., 2022; XIE et al., 2021), diabetes (CONLON et al., 2024) e doenças neurodegenerativas (MOREIRA et al., 2024).

Esses peptídeos podem oferecer um benefício duplo: combater o estresse oxidativo enquanto minimizam os riscos associados ao uso prolongado de tratamentos sintéticos. A pesquisa futura deve se concentrar em investigar os mecanismos moleculares pelos quais PcT-1 e PpT-2 exercem seus efeitos antioxidantes, com ênfase particular em modelos de aterosclerose e outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como os distúrbios neurodegenerativos. Além disso, esses peptídeos têm potencial para um maior desenvolvimento em estratégias terapêuticas direcionadas. Por exemplo, nanopartículas projetadas poderiam ser usadas para entregar esses peptídeos especificamente aos locais de patologia associada ao estresse oxidativo, aumentando sua eficácia enquanto limitam a exposição sistêmica (LI et al., 2023). Expandindo esses achados, estudos abrangentes in vivo são necessários para avaliar ainda mais o potencial terapêutico de PcT-1 e PpT-2 e para comparar sua eficácia com as opções de tratamento existentes. Em resumo, nosso estudo destaca o potencial dos peptídeos derivados de anfíbios como recursos valiosos para o desenvolvimento de terapias inovadoras para combater o estresse oxidativo e patologias relacionadas. Ao avançar nossa compreensão sobre esses peptídeos, esta pesquisa estabelece as bases para futuras estratégias de tratamento que possam fornecer soluções mais seguras e potencialmente mais eficazes para o manejo de condições como aterosclerose e doenças neurodegenerativas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, E. A.; IEMBO, T.; MARTINS, G. R.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; ANDRADE, A. C., et al., Skin secretion peptides: the molecular facet of the deimatic behavior of the four-eyed frog, *Physalaemus nattereri* (Anura, Leptodactylidae), Rapid Communications in **Mass Spectrom.** 29 (2015) 2061–2068.

BECKE, A.D. Density functional thermochemistry. III. -functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. The role of exact exchange. **J. Chem. Phys.** (1993) 98 (7), 5648–5652, <https://doi.org/10.1063/1.464913>

BERGGREN, K.L.; CHEN, J.; FOX, J.; MILLER, J.; DODDS, L.; DUGAS, B., et al., Neonatal iron supplementation potentiates oxidative stress, energetic dysfunction and neurodegeneration in the R6/2 mouse model of Huntington's disease, **Redox Biology.** 4 (2015) 363–374.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH. Free Radical Method, LWT - **Food Science and Technology**, vol. 30, Issue 6, (1997), pages 609-615, ISSN 0023-6438.

CANCELARICH, N.L.; WILKE, N.; FANANI, M.L.; MOREIRA, D.C.; PÉREZ, L., et al. Somuncurins: Bioactive Peptides from the Skin of the Endangered Endemic Patagonian Frog *Pleurodema somuncurens*, **Journal of Natural Products** (2020) 83 (4), 972-984 DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00906.

CHEN, T.; ORR, D.F.; O'ROURKE, M.; MCLYNN, C.; BJORSON, A., et al. *Pachymedusa dactylophora* tryptophyllin-1: structural characterization, pharmacological activity and cloning of precursor cDNA, **Regulatory Peptides**, v. 117, Issue 1, (2004), pages 25-32, ISSN 0167-0115.

CLARKE, B.T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications, **Biological Reviews.** 72 (1997) 365–379.

CONTRERAS-CALDERÓN J, CALDERÓN-JAÍMES L, GUERRA-HERNÁNDEZ E, GARCÍA-VILLANOVA B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International** (Ottawa, Ont.). (2011) 44(7):2047-2053. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.11.003.

CUTULI, M.A.; PETRONIO, G.P.; VERGALITO, F.; MAGNIFICO, I.; PIETRANGELO, L.; NOEMI VENDITTI, N.; DI MARCO, R. *Galleria mellonella* as a

consolidated *in vivo* model host: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. **Virulence** (2019) 10(1), 527-541, DOI: 10.1080/21505594.2019.1621649.

DOS SANTOS, R. C. et al. Lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays cytotoxic effect against human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 via an apoptotic-like pathway. **Food Research International**, v. 105, p. 184–196, mar. 2018.

DU, R., LIU, K., ZHAO, S., & CHEN, F. (2020). Changes in Antioxidant Activity of Peptides Identified from Brown Rice Hydrolysates under Different Conditions and Their Protective Effects against AAPH-Induced Oxidative Stress in Human Erythrocytes. **ACS omega**, 5(22), 12751–12759. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00349>

FIELDS G.B.; NOBLE R.L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **Int J Pept Protein Res.** 1990 Mar;35(3):161-214. doi:10.1111/j.1399-3011.1990.tb00939.x. PMID: 2191922.

GE, L.; LYU, P; ZHOU, M.; ZHANG, H.; WAN, Y et al., "AcT-2: A Novel Myotropic and Antimicrobial Type 2 Tryptophyllin from the Skin Secretion of the Central American Red-Eyed Leaf Frog, *Agalychnis callidryas*", **The Scientific World Journal**, (2014) vol. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/158546>

GIÃO, M.S.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M.L.; RIVERO-PÉREZ, M.D.; PEREIRA, C.I.; PINTADO, M.E; MALCATA, F.X. Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features, **J. Sci. Food and Agric.** (2007) 87(14), 2638–2647. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3023>

GORR, S-U.; FLORY, C.M.; SCHUMACHER, R.J. (2019). *In vivo* activity and low toxicity of the second-generation antimicrobial peptide DGL13K. **PLoS ONE** 14(5): e0216669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216669>

GUO, C.; HU, Y.; LI, J.; LIU, Y.; LI, S.; YAN, K., et al., Identification of multiple peptides with antioxidant and antimicrobial activities from skin and its secretions of *Hylarana taipehensis*, *Amolops lifanensis*, and *Amolops granulosis*, **Biochimie** 105 (2014) 192– 201.

HANWELL, M.D.; CURTIS, D.E.; LONIE, D.C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G.R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J. Cheminformatics** (2012) 4(1). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>

HARDAS, S. S.; SULTANA, R.; CLARK, A. M.; BECKETT, T. L.; SZWEDA, L. I.; MURPHY, M. P., et al., Oxidative modification of lipoic acid by HNE in Alzheimer disease brain, **Redox Biology**. 1 (2013) 80–85.

HOU, L.; ZHOU, X.; ZHANG, C.; WANG, K.; LIU, X.; CHE, Y., et al., NADPH oxidase- derived H₂O₂ mediates the regulatory effects of microglia on astrogliosis in experimental models of Parkinson's disease, **Redox Biology**. 12 (2017) 162–170.

HUAN, Y.; KONG Q.; MOU, H.; YI H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Front. Microbiol.** (2020) 11:582779. doi: 10.3389/fmicb.2020.582779.

LÖFGREN, S.E.; MILETTI, L.C.; STEINDEL, M.; BACHÈRE, E.; BARRACCO, M.A. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental Parasitology**, (2008) 118(2), 197-202, ISSN 0014-4894. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.07.011>.

MAIA, R. A.; VENTORIM, G.; BATAGIN-NETO, A. Reactivity of lignin subunits: the influence of dehydrogenation and formation of dimeric structures. **J. Mol. Model.** (2019) 25(8), 228. <https://doi.org/10.1007/s00894-019-4130-4>

MARCOCCI L, MAGUIRE JJ, DROY-LEFAIX MT, PACKER L. The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. **Biochem Biophys Res Commun.** (1994) Jun 15;201(2):748-55. doi: 10.1006/bbrc.1994.1764. PMID: 8003011.

MENDIS, ERESHA & RAJAPAKSE, NIRANJAN & BYUN, HEE-GUK & KIM, SE-KWON. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their *in vitro* antioxidant effects. **Life sciences**. 77. 2166-78. [10.1016/j.lfs.2005.03.016](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.03.016).

MIGNOGNA, G.; PASCARELLA, S.; AMICONI, G.; BARRA, D.; WECHSELBERGER, C.; HINTERLEITNER, C. et al., BSTI, a trypsin inhibitor from skin secretions of *Bombina bombina* related to protease inhibitors of nematodes, **Protein Science**. 5 (2008) 357–362.

MONTECUCCHI, P.C Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins, **Peptides**, (1985) 6 (SUPPL. 3), 187–195. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90373-0](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90373-0)

OU, B; HAMPSCH-WOODILL, B; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the

fluorescent probe. **J Agric Food Chem.** 2001 Oct; 49(10):4619-26. doi: 10.1021/jf010586o.

PLÁCIDO, A; BUENO, J; BARBOSA, E.A; MOREIRA, D.C; DIAS, J.N; CABRAL, W.F; et al., The Antioxidant Peptide Salamandrin-I: First Bioactive Peptide Identified from Skin Secretion of Salamandra Genus (*Salamandra salamandra*). **Biomolecules** (2020) 10,512. <https://doi.org/10.3390/biom10040512>

PRIOR, R.L.; W.U.; X, SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J Agric Food Chem.** (2005) 53(10):4290–4302.

RAJAPAKSE, R.; MENDIS, E.; JUNG, W.K.; JE, J.Y; KIM, S.K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties, **Food Research International**, 38,2, (2005), 175-182, ISSN09639969.

SHINDO, E.; WITT, L. Packer Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light **Journal of Investigative Dermatology**, 100 (1993), pp. 260-265.

STEINBORNER, S.T.; GAO, C.W.; RAFTERY, M.J.; WAUGH, R.J.; BLUMENTHAL, T.; BOWIE, J.H.; WALLACE, J.C.; TYLER, M.J. (1994) The Structures of Four Tryptophyllin and Three Rubellidin Peptides from the Australian Red Tree Frog *Litoria rubella*. **Aust. J. Chem.** 47, 2099-2108.

STEPHENS, P. J.; DEVLIN, F. J.; CHABALOWSKI, C.F.; FRISCH, M.J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. **J. Phys. Chem.** (1994) 98(45), 11623–11627. DOI: 10.1021/j100096a001.

TRAN, TTN, TRAN, DP, NGUYEN, VC, TRAN, TDT, BUI, TTT, BOWIE, JH. Antioxidant activities of major tryptophyllin L peptides: A joint investigation of Gaussian-based 3D-QSAR and radical scavenging experiments. **JPep Sci.** (2021); 27: e3295. <https://doi.org/10.1002/psc.3295>

WANG, M. ZHOU, T. CHEN, B. WALKER, C. SHAW, PdT-2: A novel myotropic Type-2 tryptophyllin from the skin secretion of the Mexican giant leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*, **Peptides**, (2009) 30(8), 1557–1561.

WANG, R.; ZHOU, Y.; CHEN, T.; ZHOU, M.; WANG, L.; SHAW, C. Identification and Functional Analysis of a Novel Tryptophyllin Peptide from the Skin of

the Red-eye Leaf Frog, *Agalychnis callidryas*. **Int J Biol Sci** (2015); 11(2):209-219. doi:10.7150/ijbs.10143.

WANG, T. CHEN, M. ZHOU, L. WANG, C. SHAW, PsT-1: A new tryptophyllin peptide from the skin secretion of Waxy Monkey Leaf Frog, *Phyllomedusa sauvagei*, **Regul. Pept.** (2013) 184, 14-21, ISSN 0167-0115. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2013.03.017>

WANG, X.; REN, S.; GUO, C.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; ZHANG, B., et al., Identification and functional analyses of novel antioxidant peptides and antimicrobial peptides from skin secretions of four East Asian frog species, **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**. 49 (2017) 550– 559.

XU, X.; LAI, R., The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions, **Chemical Reviews**. 115 (2015) 1760–1846.

YAMAMOTO, H., FUKUNAGA, K., GOTO, S., TANAKA, E. AND MIYAMOTO, E. (1985), Ca^{2+} , Calmodulin-Dependent Regulation of Microtubule Formation via Phosphorylation of Microtubule-Associated Protein 2, τ Factor, and Tubulin, and Comparison with the Cyclic AMP-Dependent Phosphorylation. **Journal of Neurochemistry**, 44: 759- 768. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1985.tb12880.x>

YANG, H.; WANG, X.; LIU, X.; WU, J.; LIU, C. GONG, W., et al., Antioxidant peptidomics reveals novel skin antioxidant system, **Molecular & Cellular Proteomics**. 8 (2009) 571–583.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor, **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA 84 (1987) 5449–5453.

ZHANG Z, VAN DER DONK WA. Nonribosomal Peptide Extension by a Peptide Amino- Acyl tRNA Ligase. **J Am Chem Soc**. 2019 Dec 18;141(50):19625-19633. doi: 10.1021/jacs.9b07111. Epub 2019 Dec 9. PMID: 31751505; PMCID: PMC6927032.

ZHENG, P., ZENG, B., ZHOU, C. *et al*. Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. **Mol Psychiatry** 21, 786–796(2016). <https://doi.org/10.1038/mp.2016.44>.

**CAPÍTULO III: EFEITOS NEUROPROTETORES SOBRE MICROGLIA E
INSIGHTS SOBRE A RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE UM
PEPTÍDEO ANTIOXIDANTE ISOLADO DE *PELOPHYLAX PEREZI***

Artigo publicado no periódico *J Cell Mol Med* – Wiley em 2022

Fator de impacto: 5,31

DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.17292>

RESUMO

Triptofilinas constituem um grupo heterogêneo de peptídeos que são uma das primeiras classes de peptídeos identificados nas secreções da pele de anfíbios. Neste estudo, relatamos a caracterização estrutural e as propriedades antioxidantes de um novo peptídeo tipo tryptophyllin, denominado PpT-2, isolado da rã verde ibérica *Pelophylax perezi*. A secreção da pele de *P. perezi* foi obtida por estimulação elétrica e fracionada por RP-HPLC. O sequenciamento de peptídeos de novo foi realizado utilizando MALDI MS/MS. A estrutura primária de PpT-2 (FPWLLS-NH₂) foi confirmada por degradação de Edman e subsequentemente investigada por ferramentas *in silico*. PpT-2 compartilha propriedades físico-químicas com outros antioxidantes bem conhecidos. Para testar a atividade antioxidante de PpT-2 *in vitro*, o peptídeo foi sintetizado por fase sólida e avaliado nos ensaios de varredura de radicais baseados em ABTS e DPPH. Em seguida, foi realizado um experimento de citometria de fluxo para avaliar a atividade antioxidante de PpT-2 em células microgliais murinas desafiadas com estresse oxidativo. Como predito pelas análises *in silico*, PpT-2 eliminou radicais livres *in vitro* e suprimiu a 1^a geração de espécies reativas em células BV-2 de microglia estimuladas por PMA. Investigamos ainda possíveis bioatividades de PpT-2 contra células de câncer de próstata e bactérias, contra as quais o peptídeo exerceu um efeito antiproliferativo moderado e atividade antimicrobiana negligenciável. A biocompatibilidade de PpT-2 foi avaliada em ensaios de citotoxicidade e em toxicidade *in vivo* com *Galleria mellonella*. Nenhuma toxicidade foi detectada em células tratadas com até 512 µg/ml e em *G. mellonella* tratadas com até 40 mg/kg de PpT-2. Este novo peptídeo, PpT-2, se apresenta como um peptídeo promissor com potencial para aplicações terapêuticas e biotecnológicas, principalmente para o tratamento/prevenção de distúrbios neurodegenerativos.

Palavras-chave: anfíbios, antioxidante, peptídeo bioativo, neuroproteção, *Pelophylax perezi*, triptofilina.

1. INTRODUÇÃO

A pele é um dos tecidos corporais mais expostos ao estresse e requer certos mecanismos para lidar com essa pressão (SHI et al., 2016; YANG et al., 2009). A pele dos anfíbios apresenta um arsenal de compostos bioativos originais que permitem a adaptação a ambientes com características extremas, como altos níveis de oxigênio, baixa temperatura e alta radiação ultravioleta (UV) (TABOADA et al., 2017; YANG et al., 2016). Além disso, a secreção da pele da maioria dos anfíbios é composta por moléculas que atuam em uma variedade de mecanismos de defesa contra agressores externos, como microorganismos, parasitas ou predadores (LEITE et al., 2005; ARCANJO et al., 2015). As triptofilinas são uma das primeiras classes de peptídeos identificadas nas secreções da pele de anfíbios, e estão frequentemente associadas a atividades que afetam a musculatura, incluindo propriedades de dilatação e constrição dos vasos sanguíneos (PERSEO et al., 1984; CHEN et al., 2004; WANG et al., 2009; WANG et al., 2013). Atividades biológicas relevantes como ações antimicrobianas e antiproliferativas foram descobertas relacionadas a essa classe de peptídeos (ELLIS-STEINBORNER et al., 2011; GE et al., 2014).

Assim, o papel da triptofilinas como parte do arsenal de peptídeos das secreções da pele de anfíbios ainda são incertos, uma vez que todas as atividades biológicas descritas acima são modestas, gerando dúvidas sobre sua relevância fisiológica. Expor a pele dos anfíbios à radiação UV durante o dia, juntamente com uma alta disponibilidade de O₂ na transição dos habitats aquáticos para os terrestres, pode levar à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Recentemente, peptídeos com propriedades antioxidantes foram caracterizados na secreção cutânea de anfíbios, sugerindo um papel fisiológico de alguns peptídeos no combate ao estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2018; FENG et al., 2021). De fato, o primeiro peptídeo expresso na secreção cutânea de *Pithecopus azureus* ao longo de sua metamorfose, durante a transição da água para a terra, demonstrou atividade antioxidante (BARBOSA et al., 2021).

Peptídeos antioxidantes de anfíbios (AOPs) exibiram propriedades de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo identificados em uma variedade de gêneros. A maioria deles é encontrada em gêneros da família Ranidae, como *Hylarana*,

Amolops, *Rana* e *Odorrana*, mas também ocorrem em gêneros de outras famílias, como *Nanorana* (Dicroglossidae) e *Physalaemus* (Leptodactylidae), apresentando alta variabilidade estrutural (GUO et al., 2014; WANG et al., 2017; YANG et al., 2009, YANG et al., 2016; BARBOSA et al., 2018).

Neste estudo, um novo peptídeo amidado, denominado PpT-2, foi identificado na secreção cutânea da rã-verde-ibérica (*Pelophylax perezi*), proveniente da Ilha de São Miguel, no arquipélago dos Açores, Portugal. Detalhes morfológicos e histológicos da pele foram analisados para identificar as glândulas acessórias e granulares. A possível relação entre o PpT-2 e a proteção contra a oxidação foi investigada por meio de estudos *in silico* e ensaios *in vitro* de eliminação de radicais livres. Até onde sabemos, identificamos pela primeira vez um peptídeo semelhante as triptofilinas com potencial antioxidante.

Além disso, estudos *in silico* foram realizados para avaliar a transição da prolina e sua relação com as propriedades físico-químicas, bem como as propriedades antioxidantes e reatividades locais do PpT-2 em comparação com outros compostos. Foram conduzidos estudos de citotoxicidade em modelos mamíferos, incluindo testes contra células humanas de câncer de próstata (linha celular PC3) e testes de toxicidade *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella*. Por fim, ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) foram quantificadas com sondas fluorescentes intracelulares em células microgliais BV-2, a fim de avaliar o potencial neuroprotetor do PpT-2.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Purificação, caracterização e análise de sequência

A secreção seca (1 mg) foi dissolvida em água Milli-Q (500 µl) e submetida à separação em um sistema HPLC (LC-20 CE; Shimadzu), utilizando uma coluna de fase reversa Vydac C18 (2018 TP). As frações foram eluídas com um gradiente linear de ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) em acetonitrila, variando de 5% a 60% ao longo de 60 minutos, e de 75% a 95% em 5 minutos, com uma taxa de fluxo de 1 ml/minuto.

As frações foram monitoradas nos comprimentos de onda de 216 e 280 nm, coletadas em tubos e secas por centrifugação a vácuo. Detalhes sobre a coleta do material biológico e o processamento das amostras para os estudos morfológicos da pele estão

disponíveis no Material Suplementar. Além disso, alíquotas foram preparadas para espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF) e degradação de Edman, conforme descrito detalhadamente no Material Suplementar (SOUSA et al., 2020).

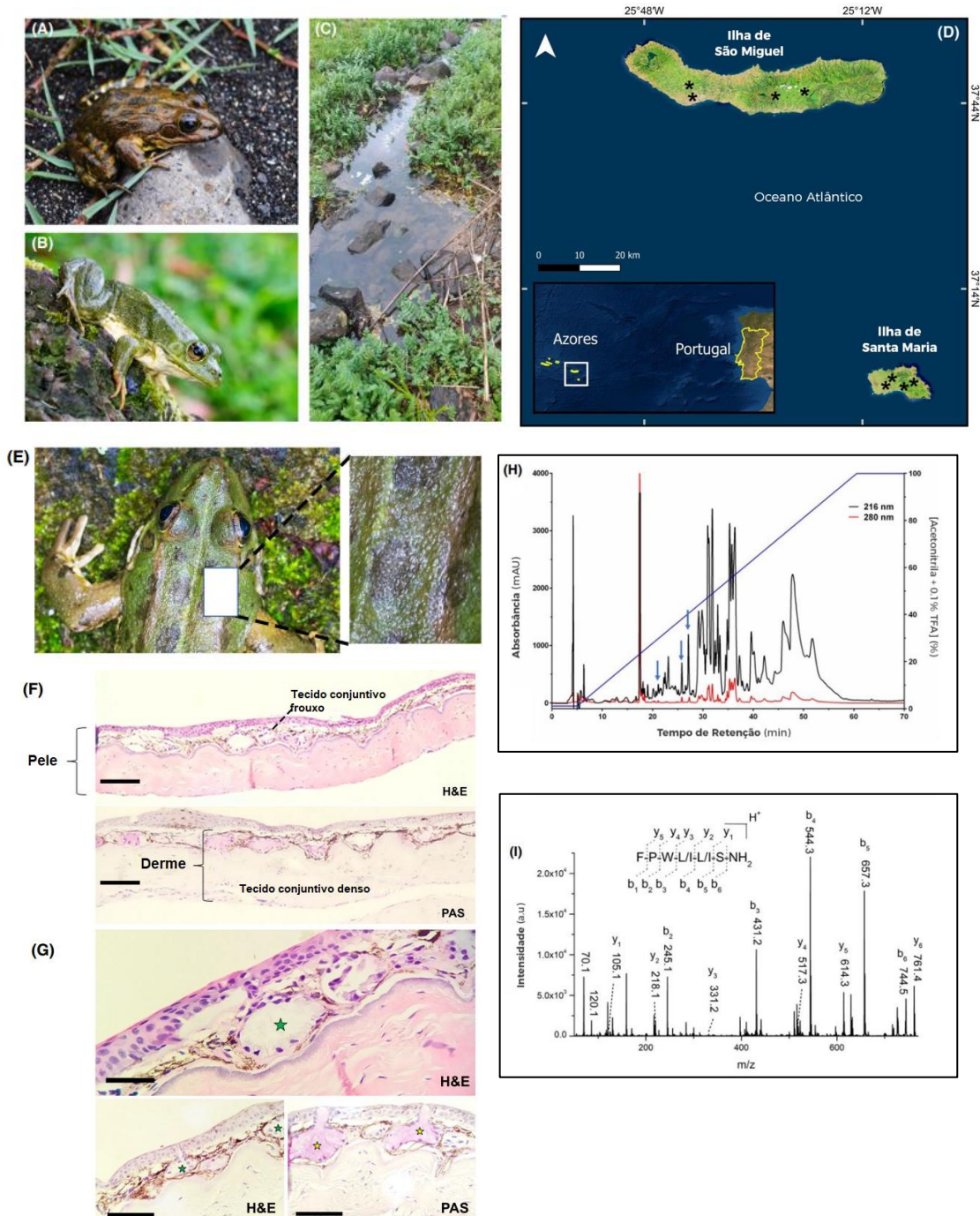


Figura 16. (A, B) Exemplos adultos de *Pelophylax perezi* (López-Seoane 1885) mostrando polimorfismo na pigmentação da pele com diferentes padrões de cores. (Fotos: Peter Eaton). (C) Habitat típico de *P. perezi* no arquipélago dos Açores é um pequeno corpo de água permanente (Ilha de Santa Maria, Açores, Portugal). (Foto: José Leite). (D) Mapa de distribuição das coletas de *P. perezi* neste trabalho no arquipélago dos Açores (ilhas de São Miguel e Santa Maria). (E) Detalhe de *P. perezi* mostrando a área da região dorsal do animal, com maior predominância de tecido glandular, onde a análise histológica foi realizada. (F)

Fotomicrografias da pele de *P. perezii*, mostrando a epiderme superficial e a derme dividida em uma camada subepitelial frouxa e uma camada profunda densa. O tecido epitelial é do tipo pavimentoso estratificado [epitélio pavimentoso (EP)], formado por até quatro camadas de células (barra de escala: 200 µm) (H&E: coloração de hematoxilina e eosina). **(G)** Na derme frouxa, há inúmeras glândulas alveolares simples, serosas (estrela verde) e mucosas (estrela amarela), e granulação densa de melanina dispersa (M) entre os alvéolos (F e G) (Figura 2C, barra: 200 µm). Na derme profunda, os feixes de fibras de colágeno exibem disposição não modificada e os núcleos dos fibroblastos dispersos na matriz extracelular. Glicoproteínas e mucopolissacarídeos foram marcados por reagente de Schiff (ácido periódico de Schiff, PAS). **(H)** Cromatograma de HPLC em fase reversa do extrato bruto da secreção da pele de *P. perezii*. A absorvância da amostra foi monitorada em 216 (linha preta) e 280 nm (linha vermelha) em unidades arbitrárias (a.u.). As frações contendo PpT-2 são indicadas pela seta azul. **(I)** Espectros MS/MS de PpT-2, $[M+H]^+ = 761,4$ Da, adquiridos em um MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme; sequência de aminoácidos FPWL/IL/IS-NH₂.

2.2 Estudos computacionais: Isomerização *cis-trans* e propriedades antioxidantes

A sequência de PpT-2 foi modelada com o auxílio do pacote computacional Avogadro, considerando a modificação amídica no C-terminal e a protonação do N-terminal (HANWELL et al., 2012). Avaliações conformacionais preliminares foram realizadas por meio de simulações de dinâmica molecular (MD) em alta temperatura, para reproduzir com precisão as características estruturais do peptídeo (BATAGIN-NETO et al., 2013). Para esse propósito, PpT-2 foi colocado em contato com um reservatório térmico a 1000 K, e 100 conformações distintas foram armazenadas durante a simulação para posterior otimização geométrica (50 estruturas com conformação inicial *cis* da prolina e 50 *trans*).

As buscas conformacionais por MD foram conduzidas utilizando o campo de força AMBER com o auxílio do pacote computacional Gabedit (WANG et al., 2004; ALLOUCHE et al., 2020). Otimizações geométricas preliminares foram realizadas para todos os confôrmeros usando a abordagem Hartree–Fock (HF) e posteriormente otimizadas no contexto da teoria do funcional da densidade de Kohn–Sham (KS-DFT). Índices de Fukui condensados para átomos (CAFI), suavidade local e mapas doador-aceptor (DAM) foram calculados para prever a reatividade local da sequência. Todas as abordagens *in silico* estão descritas detalhadamente no Suplemento S1 (KLAMT et al., 1993; BECKE et al., 1993; CANCE`S et al., 1997; BELLVER-LANDETE et al., 2019; YANG et al., 1986; FRISCH et al., 2009). As propriedades antioxidantes de PpT-2 foram comparadas às de salamandrina-I (nas formas protonada e não protonada), glutathione, trolox e outros antioxidantes, estimadas no mesmo nível teórico.

2.3 Síntese e quantificação do peptídeo

Durante este estudo, duas metodologias de síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS) foram utilizadas (CHAN et al., 2000; BRAND et al., 2019; GILL et al., 1989; BEHRENDT et al., 2016; GOMES et al., 2019).

2.4 Ensaios antibacterianos e de captura de radicais livres *in vitro*

A atividade antibacteriana do PpT-2 foi avaliada utilizando o método de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (2015) e conforme descrito anteriormente, contra quatro cepas de referência: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (BESSA et al., 2018). Os peptídeos foram testados em uma faixa de concentração de 1–1024 µg/ml. A atividade de captura de radicais livres foi avaliada *in vitro* por meio de dois ensaios químicos: ABTS (2,2-azino-bis(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Para ambos os ensaios, PpT-2 foi diluído em tampão fosfato salino (PBS) contendo 27% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar a solução estoque a 1,5 mg/ml. Essa solução foi diluída em várias concentrações (0,031–0,25 mg/ml) utilizando PBS antes da realização dos ensaios (GIÃO et al., 2007; MARXEN et al., 2007).

2.5 Análise intracelular de EROs e ERNs por Citometria de Fluxo

Espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) foram quantificadas em células microgliais BV-2 (BCRJ, #0356) e SK-N-BE(2) (*Homo sapiens*, tecido cerebral; neuroblasto, CRL-2271-ATCC) utilizando sondas fluorescentes intracelulares.

A produção intracelular de ROS foi medida com DCFH-DA (Sigma-Aldrich). A produção de RNS foi medida com DAF-FM (Sigma-Aldrich). As células BV-2 e SK-N-BE(2) foram aderidas à placa por 2 horas ($1,0 \times 10^5$ células/poço; 200 µl/poço) e, em seguida, submetidas aos seguintes tratamentos meio DMEM, 100 nM PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*, Sigma-Aldrich), 100 nM PMA + 50 µM PpT-2, 100 nM PMA + 100 µM PpT-2, 50 µM PpT-2, 100 µM PpT-2. O tempo de incubação foi de 30 minutos

para células BV-2 e 60 minutos para células SK-N-BE(2). Em seguida, as sondas DAF-FM e DCFDA foram adicionadas conforme as instruções do fabricante. A produção de ROS e RNS foi avaliada por citometria de fluxo (*FACSCalibur*, BD Bioscience), com excitação a 488 nm e detecção da emissão no canal FL-1 (515–545 nm). Para cada amostra, 10.000 eventos foram registrados e os dados foram analisados utilizando FlowJo v. 10.7

2.6 Ensaios de citotoxicidade em células humanas

2.6.1 Ensaio de hemólise em células sanguíneas humanas

A atividade hemolítica do PpT-2 foi testada utilizando glóbulos vermelhos humanos (RBCs), seguindo um protocolo previamente descrito, com algumas modificações (BIGNAMI et al., 1993).

Procedimento: Amostras de sangue humano foram coletadas em tubos contendo K₃EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético, sal de potássio). Os RBCs foram isolados por centrifugação e lavados três vezes com 50 mM de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4. Soluções do peptídeo em concentrações crescentes (0–400 µM) foram adicionadas a suspensões de hemácias (RBCs) a 1% (v/v) e incubadas por 1 hora a 37°C. As amostras foram então centrifugadas a $870 \times g$ por 5 minutos.

Os sobrenadantes foram coletados, e a absorbância (A) foi medida a 540 nm. O controle positivo (100% de hemólise) foi obtido adicionando-se 0,1% de Triton X-100 (v/v) a uma amostra, enquanto o controle negativo foi determinado por uma suspensão de RBCs em PBS pH 7,4. Os ensaios de hemólise foram realizados em triplicatas (SOUZA et al., 2020; BIGNAMI et al., 1993; ZHAO et al., 2013; PLÁCIDO et al., 2020). A porcentagem de hemólise foi calculada pela seguinte fórmula:

$$[(\text{Abs}_{\text{peptide}} - \text{Abs}_{\text{PBS}}) / (\text{Abs}_{\text{TritonX-100}} - \text{Abs}_{\text{PBS}})] \times 100$$

2.6.2 Ensaio de viabilidade celular de uma linha celular microglial humana

A citotoxicidade de PpT-2 também foi avaliada usando células microgliais humanas. A linha celular microglial humana HMC3 foi obtida da ATCC (ATCC®

CRL3304TM). Essas células foram cultivadas com DMEM GlutaMAX™-I (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Thermo Fisher Scientific), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific), sendo mantidas a 37°C, com 95% de ar e 5% de CO₂, em um incubador com umidade controlada.

A viabilidade celular foi determinada pela medição da atividade metabólica celular total, utilizando a redução de resazurina para o resorufina fluorescente. Brevemente, após 24 horas de exposição ao PpT-2, foram adicionados 8 µl de uma solução de resazurina a 400 µM em cada poço. Após 4 horas de incubação no escuro (37°C; 95% ar/5% CO₂), a fluorescência foi medida por espectrômetro de fluorescência com $\lambda_{excitação} = 530 \text{ nm}$ e $\lambda_{emissão} = 590 \text{ nm}$. Todas as exposições foram realizadas em triplicata e cada ensaio foi repetido em triplicata (FREITAS et al., 2011).

2.6.3 Ensaio de viabilidade celular de uma linha celular de câncer de próstata humana

A célula de câncer de próstata humana, PC3 (ATCC® CRL-1435™, *Homo sapiens* próstata; derivada de um local metastático: osso), foi cultivada em meio RPMI (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% (v/v) de FBS (Sigma-Aldrich) e 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina (Lonza) a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. O kit colorimétrico de proliferação celular com o corante XTT, 3'-[1-[(fenilamino)-carboni]-3,4-tetrazolium]-bis(ácido benzo-sulfônico 4-metoxi-6-nitro) (Sigma-Aldrich), foi utilizado para avaliar a viabilidade celular, conforme as instruções do fabricante (ROEHM et al., 1991). Resumidamente, as células PC3 foram semeadas em triplicata em placas de 96 poços a uma densidade celular de 5×10^4 células/ml. Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS e tratadas com concentrações crescentes de PpT-2 (10–400 µM) diluídas em meio RPMI não suplementado por mais 48 e 72 horas. A mistura XTT foi adicionada para uma incubação adicional de 4 horas. A absorbância (A) foi medida a 492 nm, com comprimento de onda de referência a 690 nm, e a viabilidade celular foi determinada pela seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = [((\text{Abs}_{492} - \text{Abs}_{690})_{\text{amostra}}) / ((\text{Abs}_{492} - \text{Abs}_{690})_{\text{controle}})] \times 100$$

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados em triplicata (KAMILOGLU et al., 2020).

2.7 Toxicidade *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella*

A toxicidade do PpT-2 foi adicionalmente avaliada usando o modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*, conforme descrito por Balasubramanian (2018), com algumas modificações. Grupos de 16 larvas de 6º instar de tamanho semelhante (250–300 mg) foram injetadas com 10 µl de diferentes doses de PpT-2 (40, 20 e 10 mg/kg) diluídas em PBS, ou apenas com PBS (grupo controle). Após o tratamento, as larvas foram mantidas a 30°C por 7 dias e monitoradas diariamente para sobrevivência. O ensaio foi realizado pelo menos duas vezes, e a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier foi gerada utilizando o software *GraphPad Prism 6*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Morfologia das glândulas e identificação de PpT-2

Os triptofilinas são uma grande, mas heterogênea, família de peptídeos inicialmente isolados do gênero *Phyllomedusa* (WANG et al., 2013). No entanto, peptídeos estruturalmente relacionados foram identificados em outros gêneros de anfíbios, incluindo *Litoria* da Oceania (STEINBORNER et al., 1994). Em nosso trabalho, identificamos um novo Tryptofillina na secreção dérmica de *P. perezii* (Figura 1A, B) do Arquipélago dos Açores (Figura 1C, D). Notavelmente, este é o primeiro peptídeo identificado na secreção dérmica de *P. perezii*, além de ser a primeira tryptofillina identificada em uma espécie de distribuição na Europa. A distribuição da espécie *P. perezii* a Península Ibérica e o sul da França, e o limite norte de sua distribuição provavelmente é ao sul da bacia do Loire (BARBADILLO et al., 1999).

Pelophylax perezii não é endêmico das ilhas oceânicas e, segundo estudos antropológicos, foi introduzido nesse habitat há pelo menos 200 anos (HARRIS et al. 2013). Atualmente, está distribuído por todas as ilhas do arquipélago dos Açores, vivendo em corpos de água temporários, como lagoas formadas por chuvas (Figura 1C). As secreções da pele de muitos, mas não todos, os anuros (sapos e rãs) que contêm peptídeos bioativos estão armazenados em glândulas granulares. Essas glândulas estão localizadas

principalmente na pele dorsal, onde as glândulas são cercadas por miócitos e inervadas por fibras simpáticas. Detalhes da pele dorsal de *P. perezii* mostram uma maior predominância de tecido glandular, onde as análises histológicas foram realizadas (detalhes da análise histológica estão incluídos na seção de informações suplementares) (Figura 1E). A epiderme superficial e a derme são divididas em uma camada subepitelial solta e uma camada profunda densa (Figura 1F). O epitélio estratificado pavimentoso é formado por até quatro camadas celulares (Figura 1G). Na derme solta, há inúmeras glândulas alveolares simples, serosas e mucosas, e uma granulação densa de melanina dispersa entre os alvéolos (Figura 1F, G). Na derme profunda, os feixes de fibras de colágeno exibem disposição não modificada, e os núcleos dos fibroblastos estão dispersos na matriz extracelular.

Apesar da grande variedade de peptídeos já descritos na biodiversidade de anfíbios europeus, como os brevinins antimicrobianos e os esculentins, não haviam sido feitos estudos com a secreção da pele de *P. perezii* (PLÁCIDO et al., 2020; SAVELYEVA et al., 2014; SIMMACO et al., 1994). A partir da análise de HPLC da secreção crua da pele, identificamos mais de 20 frações, incluindo aquela que continha o peptídeo em investigação (Figura 1H). Este foi detectado como um componente novo da secreção da pele, caracterizado por MALDI-TOF MS e degradação de Edman, possuindo uma massa molecular de 761,41 Da e a sequência de resíduos de aminoácidos FPWLLS-NH₂ (Figura 1I). A análise da sequência nos permitiu concluir que se tratava de um peptídeo do tipo triptofillina, nomeado PpT-2, para refletir a espécie de anfíbio de origem (*Pelophylax perezii*) e a classe tryptophyllin 2 (WANG et al., 2009).

A análise cromatográfica mostrou a presença de pelo menos três frações contendo PpT-2, o que pode ser explicado pela presença de prolina em sua sequência. As prolinas estão associadas à presença de diferentes rotâmeros *cis/trans*; isso será discutido mais adiante, ao abordar os estudos computacionais realizados.

Uma comparação da estrutura primária de PpT-2 com a estrutura de outras triptofilinas está previamente relatada na Tabela 1. Todos os membros dessa família heterogênea se dividem em três grupos distintos (T-1, T-2 e T-3). As triptofilinas continuam sendo o único grupo de peptídeos isolados das secreções da pele de anfíbios que são caracterizadas unicamente com base em aspectos químicos, em vez de ser por bioatividade específica. Por esse motivo, a bioatividade desse grupo de peptídeos ainda

não está clara, e a referência às suas estruturas primárias indica um alto grau de heterogeneidade. Identificados pela primeira vez na pele de rãs do gênero *Phyllomedusine* neotropicais, os peptídeos tryptophyllin-2 foram isolados também da secreção da pele da rã arborícola australiana *Litoria rubella* (WANG et al., 2013; STEINBORNER et al., 1994).

Tabela 5. Estruturas primárias, origem e parâmetros físico-químicos das triptofilinas de anfíbios

Sequência	Nome	Fonte Biológica	Distribuição Geográfica	Massa Molecular (M _a)	Ponto Isoelétrico (pI)	Referência
FPWLLSa	PpT-2	*Pelophylax perezii*	Ilha de São Miguel, Açores	761.4	13.8	Este trabalho
DMSPPWHa	PdT-2	*Pachymedusa dactinolor*	Endêmico do México	876.98	7.8	Feng et al., 2021
FPPWV	T-2a	*Phyllomedusa rhodei*	Endêmico do Brasil	643.79	13.8	WANG et al., 2009
FPPWL _a	T-2b	*Phyllomedusa rhodei*	Endêmico do Brasil	657.81	13.8	WANG et al., 2009
FPPWM _a	T-2c	*Phyllomedusa rhodei*	Endêmico do Brasil	675.85	13.8	WANG et al., 2009
pQPWW _a	T-2d	*Phyllomedusa rhodei*	Endêmico do Brasil	638.72	13.8	WANG et al., 2009
pQPWM _a	T-2e	*Phyllomedusa rhodei*	Endêmico do Brasil	670.79	13.8	WANG et al., 2009
pQFPWL	L1	*Litoria rubella*	Oceania	799.93	13.8	WANG et al., 2017
FPWL	L2	*Litoria rubella*	Oceania	561.68	6.0	WANG et al., 2017
FLPWY	L3	*Litoria rubella*	Oceania	724.86	5.9	WANG et al., 2017
pQIPWFHR	L4	*Litoria rubella*	Oceania	1094.24	9.2	WANG et al., 2017
KP(HyP)AWPa	PdT-1	*Pachymedusa dactinolor*	Endêmico do México	709.85	13.9	WANG et al., 2013

3.2 Análise estrutural teórica sobre a conformação de prolina em PpT-2

Para melhor interpretar as dissimilaridades observadas nos tempos de retenção das frações de PpT-2 detectadas por análise cromatográfica (Figura 1H), foi realizado um estudo comparativo das estruturas contendo prolina terminal *trans* e *cis*. A Figura 2A–F apresenta a distribuição relativa das estruturas (após otimização de geometria) em relação aos ângulos diédricos da unidade P, energias totais moleculares, área superficial e volume molecular.

Estruturas com ângulos diédricos próximos de 0° foram definidas como prolinas *cis*, enquanto aquelas próximas a 180° são definidas como prolinas *trans* (Figura 2A). Observe que as prolinas *cis* apresentam ligeira distorção estrutural, com ângulos diédricos próximos a 13°, enquanto valores médios próximos de 173° são observados para as prolinas *trans*. Ambos os sistemas apresentam características energéticas e estruturais muito semelhantes, o que sugere que ambos os rotâmeros devem estar presentes nas amostras (Figura 2B–F). Em particular, são observadas energias ligeiramente mais baixas para a prolina *cis*, o que também apresenta distâncias menores entre a cabeça e a cauda (Figura 2C,D). Peptídeos com prólinas terminais *cis* também apresentam áreas superficiais ligeiramente maiores. Tais diferenças sutis permitem interpretar os diferentes tempos de retenção detectados na análise cromatográfica (Figura 1H). O envolvimento de peptídeos assumindo a isomerização *cis-trans* de P também foi investigado para a bradicinina, um peptídeo bioativo encontrado em vertebrados, incluindo nas secreções da pele de anfíbios (CONLON et al., 1997). A bradicinina possui três resíduos de P, todos cruciais para estabelecer as várias conformações do peptídeo, mas apenas quando todos os três resíduos assumem a conformação *trans*, a bradicinina é capaz de se ligar ao seu receptor (PIERSON et al., 2013; GIELDON et al., 2008). Nesse caso, ela promove uma série de efeitos farmacológicos, principalmente associados à inflamação, resposta à dor, vasodilatação e regulação da pressão arterial (MARCEAU et al., 2020). Dadas as semelhanças energéticas e estruturais entre ambos os rotâmeros, a implicação biológica das múltiplas conformações de PpT-2 deve ser investigada mais a fundo no futuro.

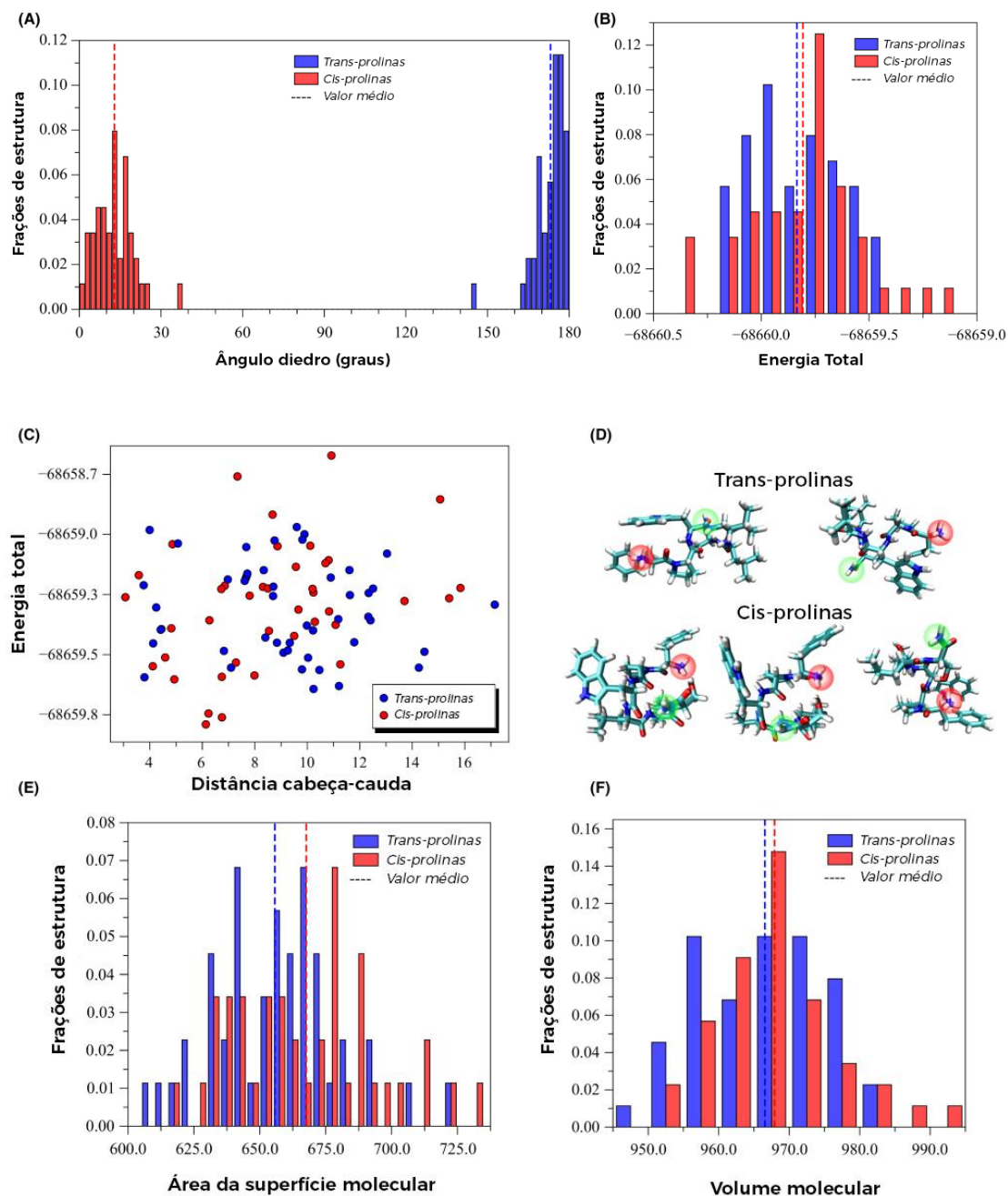


Figura 17. Comparação entre PpT-2 com resíduos de prolina cis e trans. (A) Distribuição dos ângulos diédricos, (B) energias totais, (C) distribuições de energia total em função das distâncias cabeça-cauda, (D) estrutura dos conformers mais estáveis, (E) área da superfície molecular e (F) volume molecular.

3.3 Ensaios antimicrobianos de PpT-2

Para explorar as atividades biológicas de PpT-2, foram realizados ensaios antimicrobianos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Embora a maioria das triptofilinas descritas na literatura não apresentem atividade antimicrobiana (TRAN et al., 2021) AcT-2 (GMRPPWF-NH₂), encontrado na secreção da pele da rã de olhos

vermelhos *Agalychnis callidryas*, inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus* (CIM = 256 µg/ml), *Escherichia coli* (CIM = 512 µg/ml) e *Candida albicans* (CIM = 128 µg/ml), ou seja, apresenta uma ação antimicrobiana moderada.¹² No entanto, para o PpT-2, nenhuma atividade antimicrobiana foi detectada até concentrações de 1 mg/ml do peptídeo (Tabela S1) (GE et al., 2014).

3.4 Propriedades antioxidantes de PpT-2

Compostos antioxidantes apresentam uma interessante capacidade de interromper ou retardar reações em cadeia de oxidação responsáveis pelo dano celular (ALFEI et al., 2020). O mecanismo de ação desses compostos geralmente envolve uma série de processos complexos de desativação/captura de radicais livres por meio de mecanismos de transferência de carga (CT) e/ou reações químicas (CONLON et al., 1997). Do ponto de vista teórico, é importante classificar essa atividade para compostos distintos para identificar sistemas otimizados, o que pode ser alcançado por meio de estudos *in silico*.

Nesse contexto, cálculos químicos quânticos têm sido empregados com sucesso para investigar processos relevantes de transferência de carga (CT) e atividades antioxidantes de sistemas biológicos (CONLON et al., 1997; PLÁCIDO et al., 2020; BELLVER – LANDETE et al., 2019). Potenciais propriedades antioxidantes do PpT-2 (apenas o conformador mais estável) foram avaliadas por meio de cálculos baseados em DFT e comparadas com outros antioxidantes (PLÁCIDO et al., 2020). O mapa DAM destaca o PpT-2 como um bom receptor de elétrons e um mau doador de elétrons, de forma semelhante a salamandrina-I protonada (Figura 3A). Esse resultado sugere que esses peptídeos podem ter mecanismos antioxidantes semelhantes. Observe que a protonação na extremidade N aumenta as propriedades receptoras de elétrons da salamandrina-I. (PLÁCIDO et al., 2020).

A Figura 3B apresenta uma comparação entre os CAFIs de salamandrina-I e do PpT-2. Pode-se observar que a unidade W desempenha um papel essencial na reatividade de ambos os compostos, especialmente em relação a eletrófilos (f^+) e radicais livres (f^0). A reatividade em relação aos nucleófilos (f^-) é distribuída pela estrutura, sendo mais intensa nos átomos de oxigênio dos carboxamidas terminais. Uma comparação entre a maciez local de salamandrina-I protonada (NH_3^+ no terminal N) e PpT-2 é mostrada na Figura 4. As regiões sombreadas indicam o intervalo associado à maciez local de

oxidantes típicos (H_2O_2 , $\text{OH}^\bullet$ e $\text{HOO}^\bullet$, estimados no mesmo nível teórico por Plácido et al (2020), de modo que as semelhanças entre os índices s^+/s^- , s^-/s^+ , e s^0/s^0 dos peptídeos/espécies oxidantes comuns podem ser comparadas. De acordo com o princípio de dureza-maciez e ácidos-bases (HSAB), as reações químicas são favorecidas entre átomos com maciez local semelhante; nesse sentido, átomos com s^+ , s^- e s^0 nas regiões cinzas devem interagir efetivamente com os compostos oxidantes.

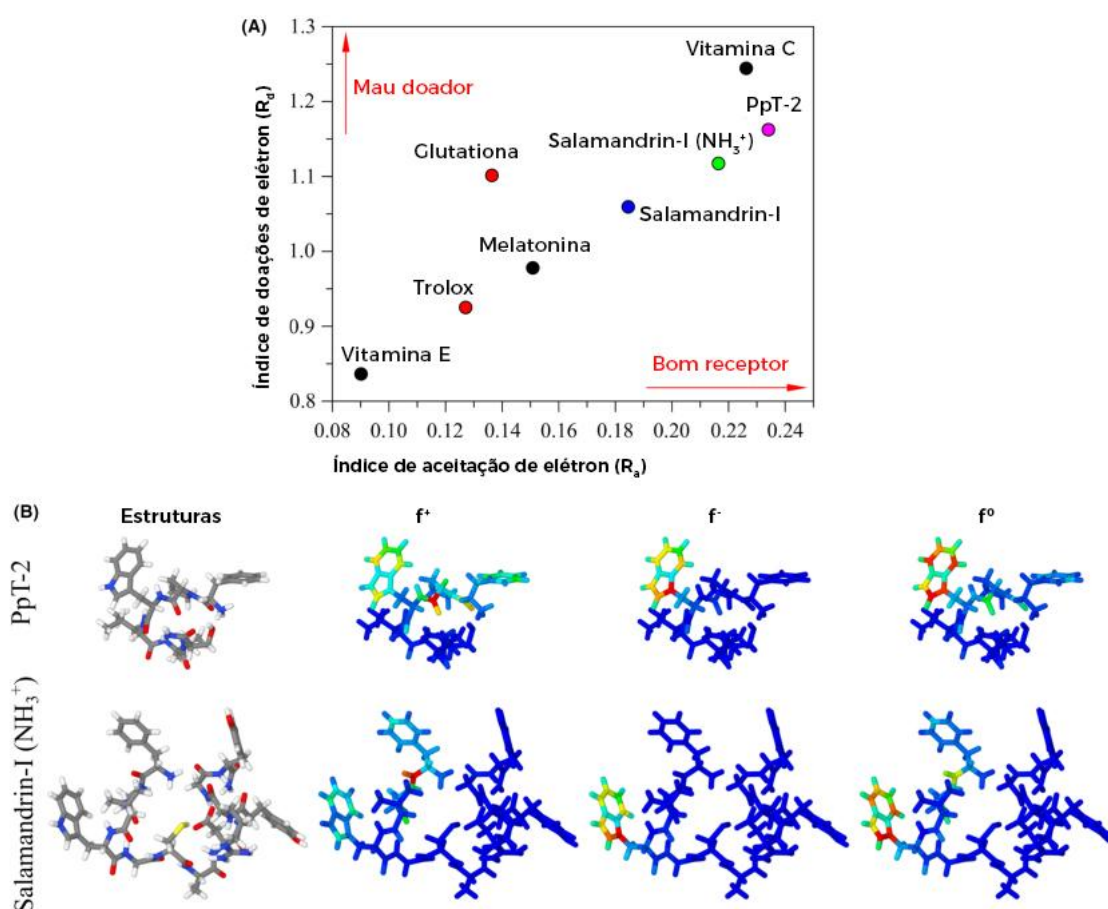


Figura 18: (A) Relação de doação/aceitação de elétrons de PpT-2 e salamandrina-I protonada comparada aos valores da literatura. (B) Representação molecular 3D de PpT-2 e salamandrina-I protonada, esquema de cores dos átomos: cinza (C), vermelho (O), azul (N) e branco (H). Representação em cores dos Índices de Fukui condensados para reações com nucleófilos (f^+), eletrofílicos (f^-) e radicais livres (f^0). As cores vermelha e azul representam locais reativos e não reativos, respectivamente. Outras cores representam situações intermediárias, seguindo uma escala RGB.

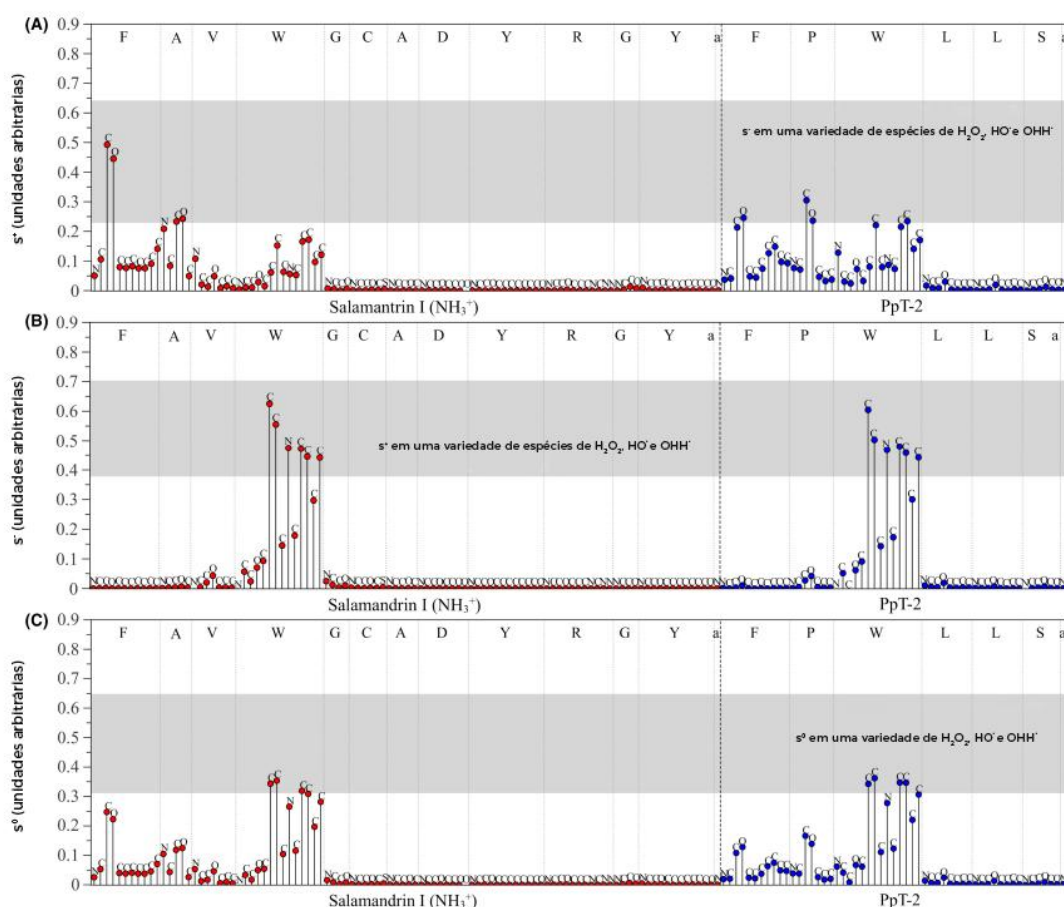


Figura 19. Estudo comparativo da suavidade química local da salamandrina-I protonada e do PpT-2 em relação ao H_2O_2 , $\text{OH}^\bullet$ e $\text{HO}^\bullet$. Atividades antioxidantes: (A) Antioxidantes como eletrófilos (s^+). (B) Antioxidantes como nucleófilos (s^-). (C) Antioxidantes como sequestradores de radicais livres (s^0).

Em relação aos resultados relatados por Plácido et al. (2020) pode-se notar que a protonação da salamandrina-I direciona a reatividade f^+ (ou seja, em direção aos nucleófilos) para os resíduos de aminoácidos terminais (fenilalanina (F) e alanina (A)), o que está associado à presença de um hidrogênio lábil (H) no grupo NH_3^+ (terminal N). Para f^+ , observa-se a relevância dos aminoácidos F, A e W na salamandrina-I; e F, P e W para PpT-2. Para f^- , a reatividade é dominada pelas unidades W em ambos os peptídeos. Como observado para f^0 e s^0 , a reatividade dos sistemas em relação aos radicais livres é dominada por W, indicando a relevância do triptofano nas propriedades antioxidantes dos peptídeos. Os dois peptídeos apresentam reatividades locais muito semelhantes, reforçando a hipótese de que possuem mecanismos de ação similares.

Diversos ensaios foram introduzidos para medir a capacidade antioxidante de moléculas biológicas. O conceito de capacidade antioxidante surgiu inicialmente da química e, posteriormente, foi adaptado à biologia, medicina, epidemiologia e nutrição (FLOEGEL et al., 2011). Esse conceito oferece uma visão mais ampla dos antioxidantes presentes em uma amostra biológica, pois considera os efeitos aditivos e sinérgicos de todos os antioxidantes, em vez do efeito de compostos isolados. Portanto, pode ser útil estudar os potenciais benefícios à saúde dos antioxidantes em doenças mediadas por estresse oxidativo. (PUCHAU et al., 2009).

A capacidade do PpT-2 de capturar radicais ABTS e DPPH *in vitro* foi testada utilizando trolox como composto de referência e o peptídeo endógeno glutathione como peptídeo antioxidante de referência (Tabela S2). O PpT-2 apresentou uma atividade de captura de ABTS de 0,269 mg de equivalentes de trolox por mg de peptídeo, o que é comparável à de outros peptídeos derivados de anfíbios, como salamandrina-I (0,285 mg de trolox-eq/mg de peptídeo) e antioxidina-RP1 (0,300 mg de trolox-eq/mg de peptídeo). Esses valores são superiores à atividade da antioxidina-I (0,010 mg de trolox-eq/mg de peptídeo), mas muito inferiores à da glutathione (1,911 mg de trolox-eq/mg de peptídeo). No geral, os resultados indicam que o PpT-2 possui atividades de captura de radicais livres, sendo a atividade mais forte contra os radicais ABTS, e essa capacidade está quimicamente associada à atividade antioxidante. Isso concorda com estudos anteriores, nos quais peptídeos bioativos identificados na secreção da pele de anfíbios apresentaram forte atividade antioxidante contra radicais ABTS e pouca ou nenhuma atividade contra radicais DPPH, como relatado para glutathione, salamandrina-I, antioxidina-RP1 e antioxidina-I (PIÁCIDO et al., 2020; BARBOSA et al., 2018).

3.5 Estudos de citotoxicidade e toxicidade *in vivo* de PpT-2

Apesar das limitações dos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, sua importância no desenvolvimento inicial de medicamentos é inquestionável. Existem vários prós e contras no uso de ensaios de viabilidade celular ou citotoxicidade como modelo confiável para medicamentos humanos (BÁCSKAY et al., 2018). Neste estudo, não houve diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular da micróglia humana tratada com PpT-2 (ANOVA de uma via; $F(4, 10) = 2,074$; $p = 0,1593$), como indicado pelo ensaio de resazurina até 100 μM , sugerindo a ausência de citotoxicidade para este triptofilina (Figura 5B).

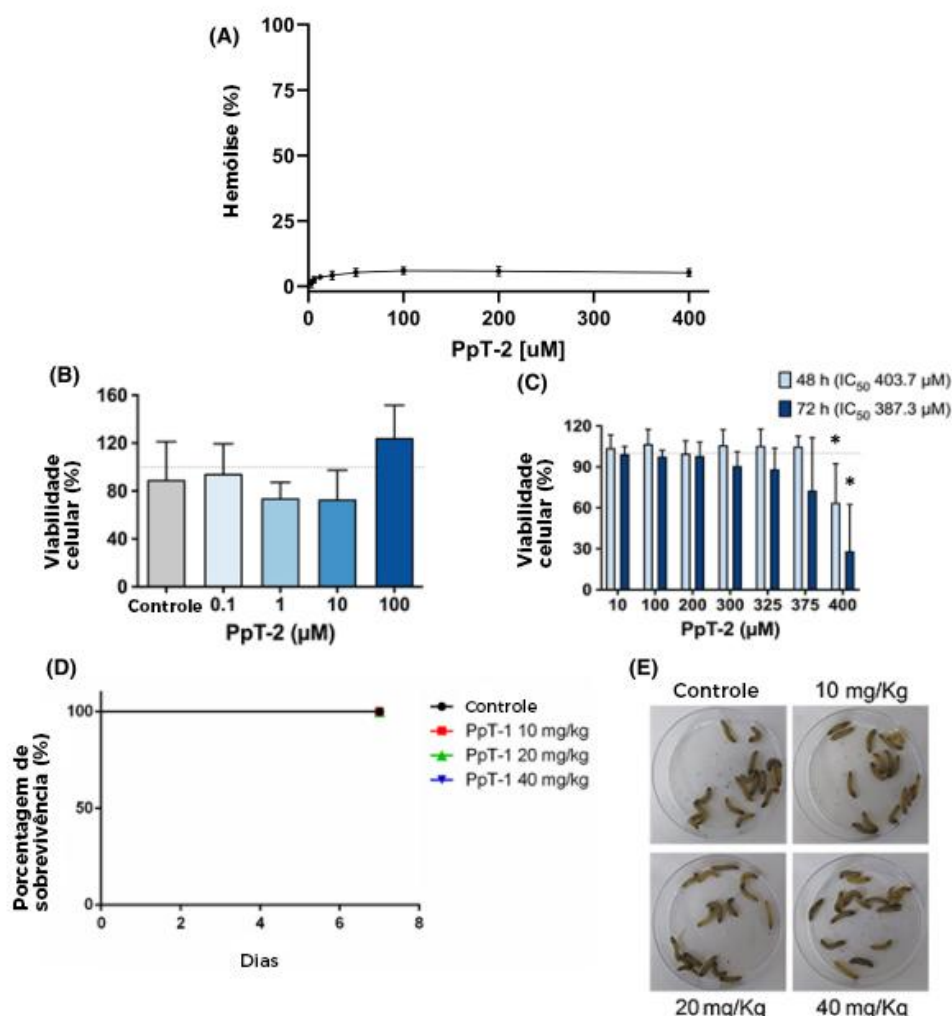


Figura 20. (A) Atividade hemolítica determinada para concentrações crescentes de PpT-2 contra hemácias humanas. A hemólise de 0% e 100% foi definida com base nos valores de absorbância obtidos para os controles negativo (tampão) e positivo (Triton X-100 0,1%), respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata. (B) Estudos de citotoxicidade do PpT-2 em células microgliais humanas, utilizando concentrações de 0,1 a 100 μM após 24 horas de incubação. (C) Efeito do peptídeo PpT-2 na viabilidade da linhagem celular de câncer de próstata PC3, com concentrações variando de 10 a 400 μM, após 48 e 72 horas de incubação. Os dados foram normalizados utilizando a viabilidade celular das células controle não tratadas, definida como 100% e representada pela linha cinza tracejada. O asterisco (*) denota uma diferença significativa em comparação com as células controle não tratadas ($p < 0,05$, ANOVA unidirecional seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett, usando células não tratadas como grupo de referência para cada tempo de incubação). IC₅₀ refere-se à concentração inibitória média. (D) Curva de sobrevivência de *Galleria mellonella* usando o teste de Mantel-Cox (log-rank) na presença de diferentes doses de PpT-2, avaliadas ao longo de sete dias. Curvas de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* tratadas com 10, 20 e 40 mg/kg de PpT-2. Todas as larvas foram injetadas com 10 μl de diferentes doses de PpT-2. Dados provenientes de dois experimentos, $n = 16$ para todos os grupos. (E) Larvas representativas dos grupos, nos dias 0 e 7 após o tratamento; a ausência de mielinização demonstra boas condições fisiológicas.

A micróglia serve como os fagócitos mononucleares residentes do cérebro e é altamente heterogênea dentro de um sistema nervoso central (SNC) saudável. A presença de células gliais ativadas localizadas em regiões de lesão cerebral é inicialmente considerada um sinal de patologia e, como tal, considerada para uso como um marcador sensível para identificar locais de lesão predestinados para destruição tecidual iminente (VON BERNHARDI et al., 2007). A ausência de citotoxicidade *in vitro* (Figura 5B) sugere a possibilidade de estudos neuroprotetores para avaliar se a atividade antioxidante intrínseca da molécula pode levar à neuroproteção celular por meio da regulação da atividade da micróglia (BARBOSA et al., 2018). No entanto, apesar dos efeitos intracelulares causados pelo peptídeo, como a modulação do equilíbrio redox do glutatona, ainda são necessários estudos sobre a internalização deste peptídeo. O teste de hemólise é um ensaio rápido e simples inicial de citotoxicidade. Em geral, peptídeos com alta atividade hemolítica não são adequados para uso terapêutico. PpT-2 não demonstrou atividade hemolítica significativa contra os glóbulos vermelhos humanos até 400 μ M (Figura 5A).

O teste de hemólise tem sido utilizado como uma avaliação de segurança dos efeitos de peptídeos em um modelo padronizado de células de mamíferos. Wang et al., (2017) demonstraram que um triptofilina expandido (AcT3, pEGKPYWPPPFLPE) da pele da rã *Agalychnis callidryas* também não apresentou atividade hemolítica até 160 μ M para os glóbulos vermelhos de cavalo.

O potencial anticâncer de PpT-2 também foi avaliado através da análise dos seus efeitos antiproliferativos em células de câncer de próstata PC3. O ensaio foi realizado em um ambiente sem soro para evitar possíveis interações. Apesar de nenhum efeito ter sido observado após 24 horas de incubação (dados não mostrados), um efeito sobre a viabilidade das células PC3 após 48 e 72 horas de incubação foi registrado (Figura 5C), destacando o potencial antitumoral do PpT-2. Essa triptofilina teve efeitos antiproliferativos após 48 e 72 horas de incubação em comparação com as células de controle não tratadas, causando uma diminuição na viabilidade celular em concentrações acima de 375 μ M após 72 horas de incubação, sendo essa diminuição significativa a 400 μ M de PpT-2 para ambos os pontos de tempo.

Os valores de IC₅₀ determinados foram 403,7 µM e 387,3 µM para 48 e 72 horas, respectivamente. Esses resultados estão em acordo com efeitos semelhantes observados, embora em concentrações mais baixas, para PsT-1 contra a mesma linha celular de próstata (PC3), uma triptofilina da secreção da pele da rã *Phyllomedusa sauvagei* (WANG et al., 2013). Pode haver uma ligação entre os efeitos antioxidantes e antiproliferativos de PpT-2. Células tumorais têm níveis mais elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS) do que células normais, devido à sua taxa de proliferação rápida.

Portanto, medicamentos quimioterápicos poderiam ser especificamente projetados para promover ou suprimir os níveis de ROS e, consequentemente, antagonizar a progressão tumoral. Em um estudo interessante, uma sequência curta de peptídeos (KRSH) demonstrou exibir atividade antioxidante direcionada às mitocôndrias *in vitro*, induzindo apoptose nas linhagens celulares de câncer HeLa e MCF-7, enquanto reduzia drasticamente os níveis de ROS. Apesar dos valores de IC₅₀ *in vitro* de ambas as triptofilinas e do KRSH não foram muito baixos, a relação entre ROS e metástase, juntamente com a baixa toxicidade de PpT-2, torna-o um ponto de partida atraente para a exploração futura de triptofilinas para o tratamento de médio a longo prazo de certos tipos de tumores (ZHAN et al., 2019).

Apesar do interesse por uma avaliação inicial de citotoxicidade *in vitro*, a avaliação *in vivo* é frequentemente preferível. Nesse sentido, as larvas de *Galleria mellonella* se destacam como um modelo *in vivo* interessante para avaliar a virulência microbiana, bem como a eficácia e toxicidade de antimicrobianos, mostrando resultados semelhantes aos obtidos com modelos de mamíferos. No presente estudo, nenhuma das concentrações testadas de PpT-2 induziu a morte das larvas de *G. mellonella* durante os 7 dias de tratamento (Figura 5D, E). Assim, PpT-2 apresenta baixa toxicidade, semelhante a outros peptídeos (GORR et al., 2019).

3.6 Atividade neuroprotetora do PpT-2

Finalmente, a capacidade antioxidante do PpT-2 também foi avaliada em células de mamíferos, nomeadamente micróglia de camundongos (*Mus musculus*) que respondem ao dano tecidual e infecção, produzindo e liberando ROS e RNS para o ambiente do SNC (BLOCK et al., 2007). ROS são moléculas difusíveis capazes de realizar processos de transdução de sinais em resposta a estímulos extracelulares. Um

papel das ROS na gliose foi proposto a partir de estudos que mostram uma inibição pelo tratamento com antioxidantes. A geração de ROS ativa a síntese induzível de óxido nítrico (iNOS), aumentando a produção de óxido nítrico (NO) pelas células gliais e endoteliais (SCHIEBER et al., 2014). A produção de ROS induzida pela microglia e a inflamação desempenham um papel fundamental em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer (DA) e Parkinson (DP) (LEE et al., 2019).

Células microgliais de camundongo (BV-2) foram estimuladas com PMA, um composto químico conhecido por induzir a produção de ROS e RNS, seja na presença ou ausência de PpT-2 em duas concentrações (Figura 6B,C) (BHAT et al., 2015). O PMA ativa a proteína quinase C, que por sua vez ativa a NADPH oxidase (NOX) por fosforilação da p47phox, levando ao aumento da geração de ROS. Nossos resultados mostram que, nas concentrações testadas, o PpT-2 apresenta uma potente inibição do estresse oxidativo nas células BV-2 durante os 30 minutos de incubação simultânea (peptídeo e PMA), ou seja, logo no início do tratamento. Vale ressaltar que o PpT-2 inibe a geração de RNS mesmo em células não estimuladas pelo PMA, o que significa que a inibição ocorre nessas condições no estado basal. Em conjunto, nossos resultados mostram que o PpT-2, por meio de seus efeitos antioxidantes, controla os níveis de ROS e RNS em estado estacionário. Assim, esta triptofilina tem grande potencial terapêutico para tratar ou prevenir distúrbios neurodegenerativos, dada sua atividade antioxidante na micróglia e o envolvimento do desequilíbrio redox na iniciação e progressão de doenças como Alzheimer, Parkinson, Huntington e outras. Notavelmente, apesar do grande número de triptofilinas conhecidas até hoje, este é o primeiro estudo a verificar esse tipo de bioatividade e potencial terapêutico para o PpT-2.

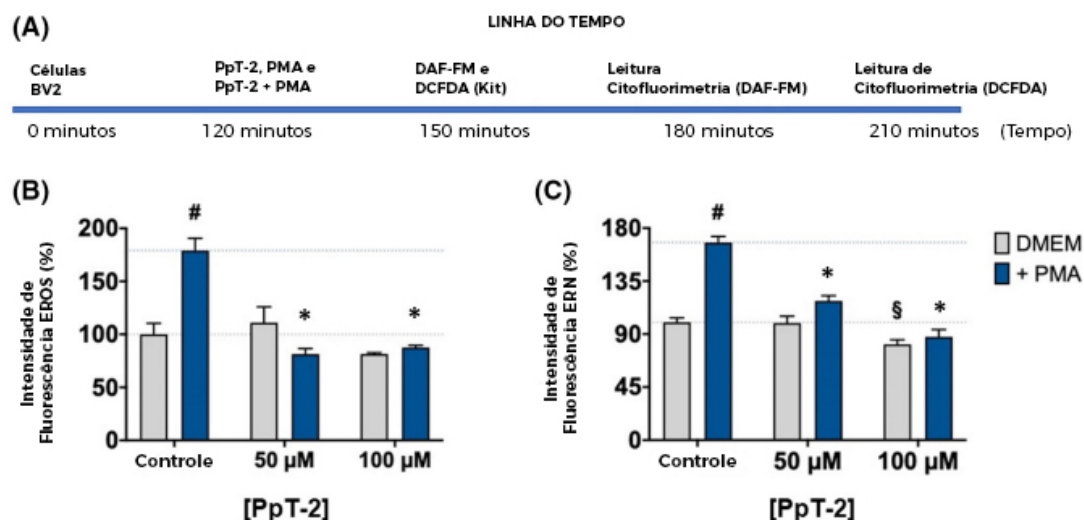


Figura 21. O PpT-2 exibe propriedades antioxidantes e neuroprotetoras em células de micróglia de camundongo (BV-2). **(A)** Linha do tempo do ensaio. **(B e C)** A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) em células BV-2 de micróglia de camundongo foi induzida por forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e tratada com peptídeos nas concentrações de 50 e 100 µM. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Primeiramente, as células tratadas com PMA foram comparadas com aquelas mantidas apenas com meio de cultura, utilizando um teste t não pareado (o símbolo "#" indica uma diferença significativa, $p < 0,05$). Em seguida, foi realizada uma ANOVA unidirecional seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett, usando células controle não tratadas (o símbolo "\$" indica uma diferença significativa, $p < 0,05$) ou células controle tratadas com PMA (o asterisco "*" indica uma diferença significativa, $p < 0,05$) como grupo de referência.

4. CONCLUSÃO

A rã verde ibérica (*P. perezi*) secreta e armazena no tecido da pele um peptídeo semelhante a triptofilina, chamado PpT-2, cuja estrutura apresenta semelhanças com as triptofilinas de classe 2, sendo um peptídeo amidado com um motivo Pro-Trp. Testes *in silico* realizados para verificar as propriedades antioxidantes do PpT-2 revelaram uma razão de doação/aceitação de elétrons semelhante à de outros antioxidantes, sendo particularmente similar ao salamandrina-I protonado. Tanto o salamandrina-I quanto o PpT-2 apresentam um resíduo de triptofano importante para suas propriedades antioxidantes, conforme indicado pelos estudos *in silico*. Experimentos *in vitro* revelaram que o PpT-2 atua como um captador de radicais livres, principalmente contra o radical ABTS, e inibe o estresse oxidativo induzido pelo PMA na micróglia de camundongo. Assim, os resultados *in vitro* corroboram a previsão *in silico* da atividade antioxidante. Além disso, o PpT-2 apresentou baixa citotoxicidade *in vivo* e *in vitro*, ao mesmo tempo que demonstrou efeitos antiproliferativos moderados contra células de câncer de próstata. No geral, esses resultados indicam que o PpT-2 é um peptídeo promissor com aplicações

terapêuticas e biotecnológicas potenciais, principalmente para o tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos. Este trabalho também demonstra que as secreções da pele de anfíbios continuam sendo uma fonte valiosa de compostos biológicos de interesse farmacológico e econômico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SHI D, XI X, WANG L, et al. Baltikinin: a new myotropic tryptophyllin-3 peptide isolated from the skin secretion of the purplesided leaf frog, *Phyllomedusa baltea*. *Toxins* (Basel). 2016;8(7):1-10. doi:10.3390/toxins8070213

YANG H, WANG X, LIU X, et al. Antioxidant peptidomics reveals novel skin antioxidant system. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8(3):571-583. doi:10.1074/mcp.M800297-MCP200

Taboada C, Brunetti AE, Pedron FN, et al. Naturally occurring fluorescence in frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(14):3672-3677. doi:10.1073/pnas.1701053114

YANG X, WANG Y, ZHANG Y, et al. Rich diversity and potency of skin antioxidant peptides revealed a novel molecular basis for highaltitude adaptation of amphibians. *Sci Rep*. 2016;6(19866):1-11. doi:10.1038/srep19866

LEITE JRSA, SILVA LP, RODRIGUES MIS, et al. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides*. 2005;26(4):565-573. doi:10.1016/j.peptides.2004.11.002

ARCANJO DDR, VASCONCELOS AG, COMERMA-STEFFENSEN SG, et al. A novel vasoactive proline-rich oligopeptide from the skin secretion of the frog *Brachycephalus ephippium*. *PLoS One*. 2015;10(12):1-19. e0145071. doi:10.1371/journal.pone.0145071

Perseo G, De Castiglione R. Syntheses of tetra- and pentapeptides from skin extracts of *Phyllomedusa rhodei* (tryptophyllins). *Int J Pept Protein Res*. 1984;24(2):155-160. doi:10.1111/j.1399-3011.1984.tb00941.x

CHEN T, ORR DF, O'ROURKE M, et al. *Pachymedusa dacinicolor* tryptophyllin-1: structural characterization, pharmacological activity and cloning of precursor cDNA. *Regul Pept*. 2004;117(1):25-32. doi:10.1016/j.regpep.2003.08.004

WANG L, ZHOU M, CHEN T, et al. PdT-2: a novel myotropic type-2 tryptophyllin from the skin secretion of the Mexican giant leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. **Peptides**. 2009;30(8):1557-1561. doi:10.1016/j.peptides.2009.04.019

WANG R, CHEN T, ZHOU M, et al. PsT-1: A new tryptophyllin peptide from the skin secretion of Waxy Monkey Leaf Frog, 15824934, 2022, *Phyllomedusa sauvagei*. **Regul Pept**. 2013;184:14-21. doi:10.1016/j.regpep.2013.03.017

ELLIS-STEINBORNER ST, SCANLON D, MUSGRAVE IF, et al. An unusual kynurenine-containing opioid tetrapeptide from the skin gland secretion of the Australian red tree frog *Litoria rubella*. Sequence determination by electrospray mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**. 2011;25(12):1735-1740. doi:10.1002/rcm.5041

GE L, LYU P, ZHOU M, et al. AcT-2: a novel myotropic and antimicrobial type 2 tryptophyllin from the skin secretion of the central American red-eyed leaf frog, *Agalychnis callidryas*. **Sci World J**. 2014;2014:1-7. doi:10.1155/2014/158546

BARBOSA EA, OLIVEIRA A, PLÁCIDO A, et al. Structure and function of a novel antioxidant peptide from the skin of tropical frogs. **Free Radic Biol Med**. 2018;115:68-79. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.001

FENG G, WU J, YANG H-L, Mu L-X. Discovery of antioxidant peptides from amphibians: a review. **Protein Pept Lett**. 2021;28:1-10. doi:10.2174/0929866528666210907145634

BARBOSA EA, PLÁCIDO A, MOREIRA DC, et al. The peptide secreted at the water to land transition in a model amphibian has antioxidant effects. **Proc R Soc B**. 2021;288(1962):1-10. doi:10.1098/rspb.2021.1531

GUO C, HU Y, LI J, et al. Identification of multiple peptides with antioxidant and antimicrobial activities from skin and its secretions of *Hylarana taipehensis*, *Amolops lifanensis*, and *Amolops granulosus*. **Biochimie**. 2014;105:192-201. doi:10.1016/j.biochi.2014.07.013

Wang X, Ren S, Guo C, et al. Identification and functional analyses of novel antioxidant peptides and antimicrobial peptides from skin secretions of four East Asian frog species. **Acta Biochim Biophys Sin**. 2017;49(6):550-559. doi:10.1093/abbs/gmx032

SOUSA NA, OLIVEIRA GAL, DE OLIVEIRA AP, et al. Novel ocellatin peptides mitigate LPS-induced ROS formation and NF-kB activation in microglia and hippocampal neurons. **Sci Rep.** 2020;10(1):2696. doi:10.1038/s41598-020-59665-1

HANWELL MD, CURTIS DE, LONIE DC, et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J Cheminform.** 2012;4(17):1-17. doi:10.1186/1758-2946-4-17

BATAGIN-NETO A, OLIVEIRA EF, GRAEFF CFO, et al. Modelling polymers with side chains: MEH-PPV and P3HT. **Mol Simul.** 2013;39(4):309- 321. doi:10.1080/08927022.2012.724174

WANG J, WOLF RM, CALDWELL JW, et al. Development and testing of a general Amber force field. **J Comput Chem.** 2004;25(9):1157-1174. doi:10.1002/jcc.20035

ALLOUCHE A. Software news and updates. Gabedit – a graphical user interface for computational chemistry softwares. **J Comput Chem.** 2010;32(1):174-182. doi:10.1002/jcc.21600

KLAMT A, SCHÜÜRMAN G. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. **J Chem Soc, Perkin Trans.** 1993;2:799-805. doi:10.1039/P29930000799

Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **J Chem Phys.** 1993;98(7):5648-5652. doi:10.1063/1.464913

CANCÈS E, MENNUCCI B, TOMASI J. A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. **J Chem Phys.** 1997;107(8):3032-3041. doi:10.1063/1.474659

BELLVER-LANDETE V, BRETHERAU F, MAILHOT B, et al. Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. **Nat Commun.** 2019;10(1): doi:10.1038/s41467- 019-08446-0

YANG W, MORTIER WJ. The use of global and local molecular parameters for the analysis of the gas-phase basicity of amines. **J Am Chem Soc.** 1986;108(19):5708-5711. doi:10.1021/ja00279a008

FRISCH MJ, TRUCKS GW, SCHLEGEL HB, et al. Gaussian 09, Revision D.01. Gaussian, Inc.2009.

CHAN WC, WHITE PD. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. Oxford University Press; 2000.

BRAND GD, RAMADA MHS, MANICKCHAND JR, et al. Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. **PLoS One**. 2019;14(8): e0220656. doi:10.1371/journal.pone.0220656

Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. **Anal Biochem**. 1989;182(2):319- 326. doi:10.1016/0003-2697(89)90602-7

BEHRENDT R, WHITE P, OFFER J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. **J Pept Sci**. 2016;22(1):4-27. doi:10.1002/psc.2836

GOMES A, BESSA LJ, FERNANDES I, et al. Turning a collagenesisinducing peptide into a potent antibacterial and antibiofilm agent against multidrug-resistant gram-negative bacteria. **Front Microbiol**. 2019;10:1915. doi:10.3389/fmicb.2019.01915

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI document M07-A10. In: Patel JB, Cockerill III FR, Bradford PA, et al. (Eds), Approved Standard, 10th Ed.; Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

BESSA LJ, EATON P, DEMATEI A, et al. Synergistic and antibiofilm properties of ocellatin peptides against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Future Microbiol**. 2018;13(2):151-163. doi:10.2217/fmb-2017-0175C

GIÃO MS, GONZÁLEZ-SANJOSÉ ML, RIVERO-PÉREZ MD, et al. Infusions of Portuguese medicinal plants: dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. **J Sci Food Agric**. 2007;87(14):2638-2647. doi:10.1002/jsfa.3023

MARXEN K, VANSELOW KH, LIPPEMEIER S, et al. Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. **Sensors**. 2007;7(10):2080-2095. doi:10.3390/s7102080

BIGNAMI GS. A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. **Toxicon**. 1993;31(6):817-820. doi:10.1016/0041-0101(93)90389-Z

ZHAO J, ZHAO C, LIANG G, et al. Engineering antimicrobial peptides with improved antimicrobial and hemolytic activities. **J Chem Inf Model**. 2013;53(12):3280-3296. doi:10.1021/ci400477e

PLÁCIDO A, BUENO J, BARBOSA EA, et al. The antioxidant peptide salamandrin-I: first bioactive peptide identified from skin secretion of *Salamandra genus* (*Salamandra salamandra*). **Biomolecules**. 2020;10(4):512. doi:10.3390/biom10040512

FREITAS J, CANO P, CRAIG-VEIT C, et al. Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable *in vitro* reporter gene assay. **Toxicol Vitro**. 2011;25(1):257-266. doi:10.1016/j.tiv.2010.08.013

ROEHM NW, RODGERS GH, HATFIELD SM, et al. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. **J Immunol Methods**. 1991;142(2):257-265. doi:10.1016/0022-1759(91)90114-U

KAMILOGLU S, SARI G, OZDAL T, CAPANOGLU E. Guidelines for cell viability assays. **Food Front**. 2020;1:332-349. doi:10.1002/fft2.44

BALASUBRAMANIAN S, SKAF J, HOLZGRABE U, et al. A new bioactive compound from the marine sponge-derived *Streptomyces* sp. SBT348 inhibits staphylococcal growth and biofilm formation. **Front Microbiol**. 2018;9:1473. doi:10.3389/fmicb.2018.01473

STEINBORNER ST, GAO CW, RAFTERY MJ, et al. The structures of four tryptophyllin and three rubellidin peptides from the Australian red tree frog *Litoria rubella*. **J Chem**. 1994;47(11):2099-2108. doi:10.1071/CH9942099

BARBADILLO LJ, LACOMBA JI, PÉREZ MELLADO V, et al. Anfíbios y reptiles de la Península Ibérica, Baleares y Canarias. **GeoPlaneta S.A**; 1999.

JAMES HARRIS D, SPIGONARDI MP, MAIA JPMC, et al. Molecular survey of parasites in introduced *Pelophylax perezi* (Ranidae) water frogs in 15824934, 2022, the Azores. **Acta Parasitol**. 2013;58(4):607-611. doi:10.2478/s11686-013-0176-0

CONLON JM, KOLODZIEJEK J, NOWOTNY N. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. **Biochim Biophys Acta - Biomembr**. 2009;1788(8):1556-1563. doi:10.1016/j.bbamem.2008.09.018

SAVELYEVA A, GHAVAMI S, DAVOODPOUR P, ASOODEH A, LOS MJ. An overview of Brevinin superfamily: structure, function and clinical perspectives. **Adv Exp Med Biol**. 2014;818:197-212. doi:10.1007/978-1-4471-6458-6_10

SIMMACO M, MIGNOGNA G, BARRA D, et al. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. **J Biol Chem**. 1994;269(16):11956-11961.

CONLON JM, ARONSSON U. Multiple bradykinin-related peptides from the skin of the frog, *Rana temporaria*. **Peptides**. 1997;18(3):361-365. doi:10.1016/S0196-9781(96)00339-7

PIERSON NA, CHEN L, RUSSELL DH, CLEMMER DE. *Cis* - *Trans* isomerizations of proline residues are key to bradykinin conformations. **J Am Chem Soc**. 2013;135(8):3186-3192. doi:10.1021/ja3114505

GIELDON A, LOPEZ JJ, GLAUBITZ C, SCHWALBE H. Theoretical study of the human bradykinin-bradykinin B2 receptor complex. **ChemBioChem**. 2008;9(15):2487-2497. doi:10.1002/cbic.200800324

MARCEAU F, BACHELARD H, BOUTHILLIER J. Bradykinin receptors: agonists, antagonists, expression, signaling, and adaptation to sustained stimulation. **Int Immunopharmacol**. 2020;82:106305. doi:10.1016/j.intimp.2020.106305

TRAN TTN, TRAN DP, NGUYEN VC, et al. Antioxidant activities of major tryptophyllin L peptides: a joint investigation of Gaussianbased 3D-QSAR and radical scavenging experiments. **J Pep Sci**. 2021;27:e3295. doi:10.1002/psc.3295

ALFEI S, MARENGO B, ZUCCARI G. Oxidative stress, antioxidant capabilities, and bioavailability: ellagic acid or urolithins? **Antioxidants**. 2020;9(8):1-31. doi:10.3390/antiox9080707

FLOEGEL A, KIM DO, CHUNG SJ, et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **J Food Compos Anal**. 2011;24(7):1043-1048. doi:10.1016/j.jfca.2011.01.008

PUCHAU B, ZULET MÁ, DE ECHÁVARRI AG, et al. Dietary total antioxidant capacity: a novel indicator of diet quality in healthy young adults. **J Am Coll Nutr**. 2009;28(6):648-656. doi:10.1080/07315724.2009.10719797

BÁCSKAY I, NEMES D, FENYVESI F, et al. Role of cytotoxicity experiments in pharmaceutical development. **Cytotoxicity. Intechopen**. 2018;131-146. doi:10.5772/intechopen.72539

VON BERNHARDI R. Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease. **Neurotox Res**. 2007;12(4):215-232. doi:10.1007/BF03033906

ZHAN W, LIAO X, LI L, et al. In vitro mitochondrial-targeted antioxidant peptide induces apoptosis in cancer cells. **Onco Targets Ther.** 2019;12:7297-7306. doi:10.2147/OTT.S207640

BROWNE N, HEELAN M, KAVANAGH K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence.** 2013;4(7):597-603. doi:10.4161/viru.25906

GORR SU, FLORY CM, SCHUMACHER RJ. *In vivo* activity and low toxicity of the second-generation antimicrobial peptide DGL13K. **PLoS One.** 2019;14(5):e0216669. doi:10.1371/journal.pone.0216669

BLOCK ML, ZECCA L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. **Nat Rev Neurosci.** 2007;8(1):57-69. doi:10.1038/nrn2038

SCHIEBER M, CHANDEL NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr Biol.** 2014;24(10):453-462. doi:10.1016/j.cub.2014.03.034

LEE SY, HUR SJ. Mechanisms of neuroprotective effects of peptides derived from natural materials and their production and assessment. **Compr Rev Food Sci Food Saf.** 2019;18(4):923-935. doi:10.1111/1541-4337.12451

BHAT AH, DAR KB, ANEES S, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomed Pharmacother.** 2015;74:101-110. doi:10.1016/j.biopha.2015.07.025

Anexos

Trabalhos apresentados em eventos científicos nacionais e internacionais:

Relacionados ao projeto de tese:

OLIVEIRA, A.N., BARBOSA, E, CARNEIRO, D.M., DIAS, J.N, ALBUQUERQUE, P., FREITAS, J., BRAND, G.D., EATON, P., LEITE, J.R.S.A., PLÁCIDO, A. Novel antioxidant tryptophyllins-like peptides obtained from the skin secretions of the Iberian green frog (*Pelophylax perezi*) and ghost frog (*Physalaemus centralis*). ITAL. Centro de Ciência e qualidade de alimentos. São Paulo, 2019

NOGUEIRA, A. BRANGO-VANEGAS, J. , BARBOSA, E., MOREIRA, D.C., DIAS, J., BRAND, G.D., LEITE, J.R.S.A., PLÁCIDO, A. New antioxidant tryptophyllin-like peptide from skin secretion of the *Physalaemus centralis*. INOVATEC, 2020.

Livros publicados/organizados ou edições:

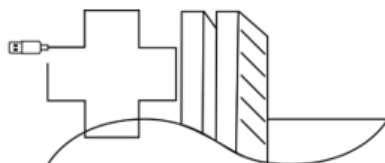
BOOK ABSTRACT – I Health Innovation Internacional Meeting, 2019: Promoting quality of life through science and technology

BOOK ABSTRACT – II Health Innovation Internacional Meeting, 2020

BOOK ABSTRACT – III Health Innovation Internacional Meeting, 2024

Produção científica nacional sem relação com o tema da tese:

MOTTA, JAÍZA & GUIRRA, ALESSON & OLIVEIRA, ARIANE & GUARALDO, ELIANE & GAMARRA, ROBERTO & PARANHOS FILHO, ANTONIO. (2022). A science mapping approach to pasture degradation. **Caminhos de Geografia**. 23. 189–204. 10.14393/RCG238859517.



**II Encontro Internacional de Inovação
em Saúde do Distrito Federal**

Promoção da qualidade de vida através da ciência e tecnologia

CERTIFICADO

Prêmio Categoria Poster, Primeiro lugar para o trabalho: “**Novos peptídeos antioxidantes da classe triptofilinas, obtidos da secreção cutânea do anfíbio *Physalaemus centralis***” de autoria de ARIANE NOGUEIRA DE OLIVEIRA, José Brango-Vanegas, Éder Barbosa, Daniel Moreira, Jhones Dias, Guilherme Brand, José Roberto S. de A. Leite, Alexandra Plácido que foi apresentado no “**II Encontro Internacional de Inovação em Saúde do Distrito Federal**” que ocorreu entre 6 a 8 de março de 2020 organizado pelo Núcleo de Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA) da Faculdade de Medicina da UnB em parceria com *Bioprospectum*, Lda.

Dr. José Roberto S.A. Leite
Coordenador Técnico do II INOVATEC
Sub-Coordenador do NuPMIA

Dra. Selma A. S. Kuckelhaus
Coordenadora Geral do II INOVATEC
Coordenadora do NuPMIA

Organização

Brasília, 08 de Março de 2020.

