



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**ESTRUTURA GÊNICA, INDUÇÃO, EXPRESSÃO E PROCESSAMENTO DE
PEPTÍDEOS BIOATIVOS ISOLADOS A PARTIR DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE**

Phyllomedusa azurea E *Physalaemus nattereri*

Eder Alves Barbosa

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Carlos Bloch Júnior

Coorientador: Dr. Alan Carvalho Andrade

Brasília, Novembro de 2014.

*Dedico aos meus amigos e
familiares...*

BANCA EXAMINADORA

- Dr. Norberto Peporine Lopes (Universidade de São Paulo)
- Dr. Guilherme Dotto Brand (Rede Sarah de Reabilitacao)
- Dr. Francisco José Lima Aragão (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)
- Dr. Antônio Sebben (Universidade de Brasília)
- **Suplente:** Dr^a. Maura Vianna Prates (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

ORIENTADORES

Orientador: Dr. Carlos Bloch Júnior

Coorientador: Dr. Alan Carvalho Andrade

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, como costume fazer todos os dias, agradeço a Deus. Pelo privilégio de viver e de, ao longo dessa curta existência, conhecer pessoas que me são tão queridas. Sinto-me muito grato porque ao longo da minha vida acadêmica conheci pessoas incríveis, as quais admiro muito. Desde a graduação, momento no qual pude me interessar por peptídeos de anfíbios e que me levou ao laboratório de espectrometria de massa da Embrapa Cenargen, ao longo do mestrado e do curso de doutorado, conheci pessoas com personalidades das mais distintas. Hoje, não imaginaria uma existência sem o privilégio de conhecê-las. Obrigado, Deus.

Falar de existência me remete a meus pais. Obrigado pai (Sr. Vicente de Paula Barbosa) e mãe (Sr^a. Terezinha Alves Dias) por terem se permitido entregar-se aos sentimentos que tiveram como resultado minha concepção. Obrigado por permitirem que eu nascesse e por cuidarem tão bem de mim, quando eu era ainda mais frágil. Obrigado pela educação que me impuseram e por terem sido exemplo na minha vida. Amo vocês.

Aos amigos, que são tantos, agradeço pela companhia e experiências compartilhadas nesses últimos anos, em especial. Vocês todos fazem a diferença. Sem o objetivo de depreciar os demais, obrigado por poder chamar vocês de amigos (em ordem cronológica de apresentação): Alan José, José Roberto, Felipe Vinecky, Carlos Bloch, Gabriel, Pollyanna Campos, Eduardo Fernandes e José de Lima. Além daqueles que tocam comigo no ministério de música Servos de Cristo. Perdoa-me se alguém não foi listado. Saber que tenho tantos bons amigos me emociona, de verdade.

Agradeço, imensamente, aos meus orientadores, Carlos Bloch e Alan Carvalho. Obrigado por tantos ensinamentos, pela paciência e por, principalmente, crerem que eu poderia chegar a esse momento. Obrigado por acreditarem nesse projeto e me permitirem executá-lo. Ambos me conhecem bem e sabem que eu faço, no âmbito acadêmico, exatamente o que eu

gosto de fazer. Isto torna as coisas muito mais fáceis e prazerosas. Bloch, em especial, obrigado por criar e permitir que exista um ambiente tão bom e agradável no laboratório e por nos ensinar o que é realmente importante nisso tudo que fazemos. Ah, e obrigado pelo café e por nos permitir tocar violão e cantar quando nos apraz e por se juntar a nós (e Vice-versa).

Obrigado a todos do Laboratório de Espectrometria de Massa e do Laboratório Genética e Biologia Molecular, ambos da Embrapa Cenargen. Obrigado pela companhia, pela ajuda, pelas conversas, pela paciência e pela amizade. “Tamo junto”.

Não poderia deixar de agradecer as mulheres, vocês mexem com minha cabeça. O mundo não teria sentido sem a presença inspiradora de vocês. São as mulheres aquelas capazes de transformar o dia de um homem (ou pelo menos o meu). E não me importo se vocês destroem o meu dia, pisam no meu coração, porque sei que vocês são capazes de torná-lo o melhor de todos também. E quando isto acontece... Ah... Isso sim é viver. Obrigado às minhas amigas, ex-namoradas, ficantes, as novas paixões que hão de vir e, desde já, aquela que um dia pertencerei totalmente e exclusivamente, com a qual terei filhos e formarei uma família. Vocês também fazem a diferença.

Agradeço à minha família como um todo, em especial, minhas Irmãs, Clébia e Tânia, ao meu irmão Clé, ao meu cunhado Odesiel e a tia Naná. Amo todos vocês.

Por fim, obrigado ao programa de pós-graduação da universidade de Brasília pelo curso oferecido, à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela estrutura física e ao CNPq pela bolsa de pós-graduação.

Viver é um privilégio. Algo muito raro e especial que deve ser afrontado positivamente e com alegria. É o maior bem que pode existir. Viva a vida! Feliz!

Sumário

I. ÍNDICE DE FIGURAS	9
II. INDÍCE DE TABELAS	12
III. TABELA DE AMINOÁCIDOS.....	14
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. O CICLO DE VIDA DOS ANFÍBIOS ANUROS.....	19
1.2. A PELE DOS ANFÍBIOS	25
1.3. PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS ISOLADOS A PARTIR DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE ANFÍBIOS ANUROS.....	28
1.3.1. PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	28
1.3.2. ANÁLOGOS DE BRADICININAS	32
1.3.3. INIBIDORES DE ENDOPEPTIDASES.....	33
1.3.4. TRIPTOFILINAS.....	34
1.3.5. DEMAIS PEPTÍDEOS.....	34
1.4. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	35
2. JUSTIFICATIVAS	42
3. OBJETIVOS	44
4. MATERIAL	45
4.1. OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	45
4.2. SOLUÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE RNA	45
4.3. SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	46
4.4. MATERIAL E SOLUÇÕES PARA SÍNTESE DE PEPTÍDEOS.....	46
4.5. ENZIMAS	47
4.6. KITS COMERCIAIS UTILIZADOS	47
4.7. SOLVENTES PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	48
4.10. OUTRAS SOLUÇÕES UTILIZADAS	49
5. MÉTODOS.....	51
5.1. LICENÇAS E AUTORIZAÇÕES.....	51
5.2. CAPTURA DOS ANIMAIS	51
5.3. OBTENÇÃO DA SECREÇÃO	52

5.4.	CROMATOGRAFIA LIQUIDA ULTRA RÁPIDA (UFLC).....	52
5.5.	ANÁLISES DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	53
5.5.1.	MALDI-TOF.....	53
5.5.2.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS)	53
5.6.	PROTEÔMICA DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE <i>P. azurea</i>	54
5.7.	SÍNTESE MANUAL E PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS	55
5.8.	DISSECÇÃO DA PELE	56
5.9.	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS BIOATIVOS APÓS ESTÍMULO ELÉTRICO.....	56
5.10.	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE GENES INDUZIDOS POR SIMULAÇÃO DE ESTRESSE BIÓTICO.....	57
5.11.	CULTIVO DE MICRORGANISMOS E PREPARO DAS SOLUÇÕES VISANDO OS ENSAIOS DE ESTRESSE BIÓTICO.....	57
5.14.	ISOLAMENTO DO RNA TOTAL	59
5.15.	ANÁLISE DE RNA TOTAL EM GEL DE AGAROSE.....	59
5.16.	SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO DE NUCLEOTÍDEOS	59
5.17.	DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL (qRT-PCR).....	60
5.18.	ENSAIOS DE EXPRESSÃO RELATIVA POR MEIO DE PCR EM TEMPO REAL (qRT-PCR)	61
5.19.	IMAGEM POR ESPECTROMETRIA DE MASSA (IMS)	61
5.20.	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLOCALIZAÇÃO APRESENTADA PELOS ÍONS PRESENTES NO TECIDO CUTÂNEO de <i>P. azurea</i>	62
6.	RESULTADOS.....	64
6.1.	TRANSCRIPTOMA DO TECIDO CUTÂNEO DE <i>P. azurea</i>	64
6.3.	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS NAS GLÂNDULAS GRANULARES APÓS ESTÍMULO ELÉTRICO.....	78
6.4.	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS NAS GLÂNDULAS GRANULARES APÓS ESTÍMULO BIÓTICO	85
6.5.	MONITORAMENTO DO CONTEÚDO DA SECREÇÃO GLANDULAR de <i>P. azurea</i> DURANTE A METAMORFOSE	90
6.5.1.	MALDI-IMAGING.....	90

6.5.2. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS)	119
7. DISCUSSÃO	132
7.2. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS NAS GLÂNDULAS GRANULARES DE <i>P. azurea</i> APÓS ESTÍMULO ELÉTRICO	134
7.3. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS NAS GLÂNDULAS GRANULARES DE <i>P. azurea</i> APÓS ESTÍMULO BIÓTICO	141
7.4. MONITORAMENTO DO CONTEÚDO DA SECREÇÃO GLANDULAR de <i>P. azurea</i> DURANTE A METAMORFOSE	144
7.5. EXPRESSÃO DIFERENCIAL NAS GLÂNDULAS GRANULARES DORSAIS E INGUINAIS DE <i>P. nattereri</i>	150
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estágios de Gosner: padronização das principais características anatômicas que determinam o estágio de desenvolvimento em que o girino se encontra durante o processo de metamorfose em anfíbios anuros. Estágios 1 ao 20. Retirado de Gosner (1960).....	21
Figura 2. Representação esquemática da glândula granular de anuros. Modificado de Dockray e Hopkins (1975).	27
Figura 3. Alinhamento de aminoácidos da estrutura primária de pré-pró-peptídeos antimicrobianos preditos a partir do sequenciamento de cDNAs isolados de diferentes anfíbios anuros. Os precursores foram selecionados aleatoriamente após uma busca por similaridade realizada na plataforma <i>NCBI Protein Blast</i>	31
Figura 4. Anuros da espécie <i>P. azurea</i> . A barra na fotografia inferior direita representa 3,5 cm.	38
Figura 5. Anuros da espécie <i>P. nattereri</i> . À esquerda, evidenciam-se as glândulas inguinais. A barra representa 5 cm.	39
Figura 6. Alinhamento de precursores da insulina caracterizados em diferentes espécies.	76
Figura 7. Cinética dos níveis de transcrição de genes que codificam peptídeos bioativos em <i>P. azurea</i> após o estímulo elétrico. Os níveis de expressão estão expressos em unidades arbitrárias. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica a proteína actina. C1 –animais que não sofreram estimulação elétrica cujos RNAs foram obtidos no primeiro dia de experimento. C2 –animais que não sofreram estimulação elétrica cujos RNAs foram obtidos no último dia de experimentos (120 dias em cativeiro). As barras horizontais representam os desvios padrões médios (três repetições).	80
Figura 8. Determinação da área da pele de <i>P. azurea</i> ocupada por íons após o esvaziamento das glândulas granulares. C1 - animais que não sofreram estimulação elétrica cujos tecidos foram obtidos no primeiro dia do experimento. C2 – animais que não sofreram estimulação elétrica cujos tecidos foram obtidos no último dia do experimento (72 horas em cativeiro). As barras horizontais representam os desvios padrões médios (n=3). Setas: apenas um animal apresentou íons com valores de intensidades mensurados.....	82
Figura 9. Cinética dos níveis de transcrição de genes que codificam precursores de hormônios em <i>P. azurea</i> após o estímulo elétrico. Os níveis de expressão estão expressos em unidades arbitrárias. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica a proteína actina. C1 – nível de transcrição dos genes em animais que não sofreram estimulação elétrica cujos RNAs foram obtidos no primeiro dia de experimento. C2 – nível de transcrição dos genes em animais que não sofreram estimulação elétrica, cujos RNAs foram obtidos no último dia de experimentos (120 dias em cativeiro). As barras horizontais representam os desvios padrões médios (três repetições).....	84
Figura 10. Níveis de transcrição de genes que codificam pré-pró-peptídeos em <i>P. azurea</i> após o contato com microrganismos. Os níveis de expressão estão expressos em unidades arbitrárias. Os animais ficaram expostos aos microrganismos por um período de 24 horas. Estímulo elétrico compreende animais que sofreram apenas o esvaziamento das glândulas e não foram expostos a nenhum outro tratamento. O controle tampão compreende animais que foram banhados apenas com a solução NaCl 0,6%. Os dados foram normalizados com a	

expressão do gene que codifica a proteína actina. As barras horizontais representam os desvios padrões médios (três repetições)..... 86

Figura 11. Área da pele de *P. azurea* ocupada por íons após o esvaziamento das glândulas granulares, seguido pela exposição a microrganismos por um período de 24 horas. O controle estímulo elétrico compreende animais que sofreram apenas o esvaziamento das glândulas e não foram expostos a nenhum outro tratamento, mas que permaneceram em ambiente não esterilizado. O controle tampão compreende animais que foram banhados apenas com a solução NaCl 0,6%..... 87

Figura 12. Níveis de transcrição de genes que codificam hormônios em *P. azurea* após o contato com microrganismos. Os níveis de expressão estão expressos em unidades arbitrárias. Os animais ficaram expostos por um período de 24 horas. Estímulo elétrico compreende animais que sofreram apenas o esvaziamento das glândulas e não foram expostos a nenhum outro tratamento, mas que permaneceram em ambiente não esterilizado. O controle negativo compreende animais que foram banhados apenas com a solução NaCl 0,6%. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica a proteína actina. As barras horizontais representam os desvios padrões médios (três repetições). O gráfico interno representa os resultados sem os dados alusivos ao estímulo elétrico. 89

Figura 13. Porcentagem da área ocupada por íons identificados no tecido cutâneo de *P. azurea* em diferentes estágios de desenvolvimento utilizando a técnica de MALDI-*Imaging*. (A) Estágio de desenvolvimento; (B) distribuição espacial dos íons no tecido dorsal analisado; (C) porcentagem da pele ocupada por íons. A barra de cor indica a intensidade dos íons presentes na pele. O experimento foi realizado em triplicata. O sinal \pm representa o desvio padrão. *no tecido de apenas um dos anfíbios no estágio 41 de desenvolvimento foi possível a identificação de moléculas por MALDI-*Imaging*..... 96

Figura 14. Intensidade de colocalização dos íons identificados a partir das aquisições de MALDI-*Imaging* em tecido dorsal de *P. azurea* no estágio 41 de desenvolvimento. A barra de cor determina o nível de colocalização apresentado por cada par de íons. A seta branca indica o único ponto na figura que representa uma colocalização identificada nesse estágio de desenvolvimento. Nesse estágio, foi possível a identificação de moléculas apenas em um tecido, dentre os três analisados. 97

Figura 15. Intensidade de colocalização dos íons identificados a partir das aquisições de MALDI-*Imaging* em tecido dorsal de *P. azurea* no estágio 43 de desenvolvimento. Os resultados representam a média das aquisições realizadas a partir de três tecidos distintos. A barra de cor determina o nível de colocalização apresentado por cada par de íons. 98

Figura 16. Intensidade de colocalização dos íons identificados a partir das aquisições de MALDI-*Imaging* em tecido dorsal de *P. azurea* no estágio 44 de desenvolvimento. Os resultados representam a média das aquisições realizadas a partir de três tecidos distintos. A barra de cor determina o nível de colocalização apresentado por cada par de íons. 99

Figura 17. Intensidade de colocalização dos íons identificados a partir das aquisições de MALDI-*Imaging* em tecido dorsal de *P. azurea* no estágio 46 de desenvolvimento. Os resultados representam a média das aquisições realizadas a partir de três tecidos distintos. A barra de cor determina o nível de colocalização apresentado por cada par de íons. 100

Figura 18. Intensidade de colocalização dos íons identificados a partir das aquisições de MALDI-*Imaging* em tecido dorsal de *P. azurea*, animais adultos. Os resultados representam a

média das aquisições realizadas a partir de três tecidos distintos. A barra de cor determina o nível de colocação apresentado por cada par de íons.....	101
Figura 19. Análise das secreções cutâneas de <i>P. azurea</i> em diferentes estágios de desenvolvimento por cromatografia líquida ultrarrápida em fase reversa. Nos cromatogramas referentes a cada estágio de desenvolvimento estão representadas as análises de três animais diferentes (n1, n2 e n3), identificadas pelas diferentes cores.	120
Figura 20. Interpretação do espectro de fragmentação do íon 568,37 gerado a partir das análises em espectrômetro de massa micrOTOF-Q II no modo fragmentação CID.....	121
Figura 21. Análise por cromatografia líquida ultra-rápida em fase reversa dos peptídeos FPPWL-NH ₂ (A) natural, (B) sintético contendo D-aminoácido na segunda posição, (C), sintéticos contendo apenas L-aminoácidos e (D) sintéticos contendo D-aminoácido na terceira posição.	123
Figura 22. Níveis de transcrição de genes que codificam precursores que contém a região conservada do peptídeo sinal de pré-pró-peptídeos antimicrobianos em <i>P. azurea</i> . Os níveis de transcrição estão expressos em unidades arbitrárias. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica a proteína actina. Os estágios de desenvolvimento foram determinados de acordo com Gosner (Figura 1). As barras horizontais representam os desvios padrões médios (três repetições).....	125
Figura 23. Espectro de massa global obtido a partir das aquisições de MALDI- <i>Imaging</i> realizadas com o tecido cutâneo dorsal de <i>P. nattereri</i> . (A) Detalhe do espectro de massa demonstrando a região dos íons das bradicininas. (B) Fotografia do tecido submetido às análises. As linhas pontilhas correspondem à área do tecido que foi analisada e a barra corresponde a 12,5 mm. (C-E) Imagens correspondentes aos íons [M+H] ⁺ da Bradicinina, (Val1, Thr6)-Bradicinina e nattererina 2, respectivamente.	126
Figura 24. Espectro de massa global obtido a partir das aquisições de MALDI- <i>Imaging</i> realizadas com a glândula inguinal de <i>P. nattereri</i> . (A) Detalhe do espectro de massa demonstrando a região dos íons das bradicininas. (B) Fotografia da glândula submetida às análises. As linhas pontilhas correspondem à área do tecido que foi analisada e a barra corresponde a 3,3 mm. (C-E) Imagens correspondentes aos íons [M+H] ⁺ da Bradicinina, (Val1, Thr6)-Bradicinina e nattererina 1 e 2, respectivamente.	127
Figura 25. Estrutura do precursor BBN1 o qual codifica (Val1, Thr6)-Bradicinina-SPA e Bradicinina caracterizados em <i>P. nattereri</i> . A sequência de aminoácidos predita evidencia (verde) peptídeo sinal, (azul) região ácida, (vermelho) sítios de clivagem enzimática; (caixa verde) peptídeo opióide, (caixa laranja) peptídeo (Val1, Thr6)-Bradicinina-SPA e (caixa azul) peptídeo Bradicinina. O asterisco indica o códon de terminação.	129
Figura 26. Estrutura de cDNA codificando Bradicinina, (Val1, Thr6)-Bradicinina caracterizados em <i>P. nattereri</i> . A sequência de aminoácidos predita evidencia (verde) peptídeo sinal, (azul) região ácida, (vermelho) sítios de clivagem enzimática; (caixa laranja) peptídeo (Val1, Thr6)-Bradicinina-VD. O asterisco indica o códon de terminação.....	130
Figura 27. Expressão relativa dos precursores BBN e BKL nas glândulas granulares dorsais e inguinais de <i>P. nattereri</i> . Os níveis de transcrição estão expressos em unidades arbitrárias. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica a proteína actina. As barras horizontais representam os desvios padrões médios (três repetições).....	131

II. INDÍCE DE TABELAS

Tabela 1. Análogos de bradisininas identificados na secreção cutânea de <i>P. nattereri</i> por espectrometria de massa (retirado de lembo, 2005).	41
Tabela 2. Oligonucleotídeos complementares à região 3' de cDNAs/RNAs	45
Tabela 3. Oligonucleotídeos degenerados complementares à região 5' de cDNAs que codificam peptídeos antimicrobianos em Hylídeos.....	45
Tabela 4. Mistura de peptídeos utilizados para a calibração do espectrômetro de massa com fonte de ionização do tipo MALDI.	50
Tabela 5. Lista dos precursores contendo similaridades a peptídeos descritos em anfíbios anuros, caracterizados a partir do transcriptoma de <i>P. azurea</i> . Os precursores foram traduzidos <i>in silico</i> . As interrogações representam ambiguidades não resolvidas nos respectivos códons. As áreas sublinhadas indicam a região do peptídeo maduro.....	66
Tabela 6. Lista dos precursores contendo similaridade a diferentes hormônios peptídicos caracterizados a partir do transcriptoma de <i>P. azurea</i> . Os precursores foram traduzidos <i>in silico</i> . As áreas sublinhadas indicam a região do peptídeo maduro.....	74
Tabela 7. Lista de peptídeos e proteínas identificados de maneira automática após nano LC-MSMS (<i>Synapt G2 – Waters Co.</i>) seguida de comparação com o banco de dados gerado a partir do transcriptoma do tecido cutâneo de <i>P. azurea</i>	77
Tabela 8. Eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos sintetizados que anelam em precursores que codificam pré-pró-peptídeos de interesse.	79
Tabela 9. Lista de íons empregados nas análises de MALDI- <i>Imaging</i> após <i>P. azurea</i> ser submetida ao estímulo elétrico.....	81
Tabela 10. Íons presentes no tecido cutâneo de <i>P. azurea</i> após a aplicação do estímulo elétrico. Os números sobrescritos em cada valor de íon indicam em quais anfíbios das triplicatas este foi observado.	83
Tabela 11. Eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos sintetizados que anelam em precursores que codificam os hormônios de interesse.	83
Tabela 12. Íons presentes no tecido cutâneo de <i>P. azurea</i> após 24 horas de contato com os microrganismos. Os números sobrescritos em cada valor de íon indicam em quais anfíbios das triplicatas este foi observado.	88
Tabela 13. Peptídeos identificados nos experimentos de MALDI- <i>Imaging</i> , numerados em ordem crescente de massa molecular.	91
Tabela 14. Porcentagem média de ocupação dos peptídeos nas glândulas ativas localizadas no tecido cutâneo dorsal de <i>P. azurea</i> em fase adulta (n=3).....	102
Tabela 15. Porcentagem de colocalização apresentada por filoseptinas no tecido cutâneo dos animais adultos de <i>P. azurea</i> . Os valores que representam mais de 50% de colocalização apresentam-se em destaque.....	108
Tabela 16. Porcentagem de colocalização apresentada por peptídeos relacionados a bradisininas no tecido cutâneo dos animais adultos de <i>P. azurea</i> . Os valores que representam mais de 50% de colocalização apresentam-se em destaque.	111

Tabela 17. Porcentagem de colocalização apresentada por dermaseptinas no tecido cutâneo dos animais adultos de <i>P. azurea</i> . Os valores que representam mais de 50% de colocalização apresentam-se em destaque.....	113
Tabela 18. Porcentagem de colocalização apresentada por triptofilinas no tecido cutâneo dos animais adultos de <i>P. azurea</i> . Os valores que representam mais de 50% de colocalização apresentam-se em destaque.....	115
Tabela 19. Porcentagem de colocalização apresentada por demais peptídeos no tecido cutâneo dos animais adultos de <i>P. azurea</i> . Os valores que representam mais de 50% de colocalização apresentam-se em destaque.....	115
Tabela 20. Ações fisiológicas causadas pela somatostatina no sistema gastrointestinal – adaptado de Low (2004).....	138

III. TABELA DE AMINOÁCIDOS

Resíduo	Símbolo de três letras	Símbolo de uma letra	Composição química	Massa monoisotópica
Alanina	Ala	A	C ₃ H ₅ NO	71.03712
Arginina	Arg	R	C ₆ H ₁₂ N ₄ O	156.10112
Asparagina	Asn	N	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	114.04293
Ácido aspártico	Asp	D	C ₄ H ₅ NO ₃	115.02695
Cisteína	Cys	C	C ₃ H ₅ NOS	103.00919
Ácido glutâmico	Glu	E	C ₅ H ₇ NO ₃	129.04260
Glutamina	Gln	Q	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	128.05858
Glicina	Gly	G	C ₂ H ₃ NO	57.02147
Histidina	His	H	C ₆ H ₇ N ₃ O	137.05891
Isoleucina	Ile	I	C ₆ H ₁₁ NO	113.08407
Leucina	Leu	L	C ₆ H ₁₁ NO	113.08407
Lisina	Lys	K	C ₆ H ₁₂ N ₂ O	128.09497
Metionina	Met	M	C ₅ H ₉ NOS	131.04049
Fenilalanina	Phe	F	C ₉ H ₉ NO	147.06842
Prolina	Pro	P	C ₅ H ₇ NO	97.05277
Serina	Ser	S	C ₃ H ₅ NO ₂	87.03203
Treonina	Thr	T	C ₄ H ₇ NO ₂	101.04768
Triptofano	Trp	W	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O	186.07932
Tirosina	Tyr	Y	C ₉ H ₉ NO ₂	163.06333
Valina	Val	V	C ₅ H ₉ NO	99.06842

IV. ABREVIATURAS

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

dCTP - Desoxicitosina 5' – trifosfato

dGTP - Desoxiguanidina 5' – trifosfato

dATP - Desoxiadenina 5' – trifosfato

dTTP - Desoxitimina 5' – trifosfato

DNA - Ácido desoxirribonucléico

RNA - Acido ribonucléico

mRNA - RNA mensageiro

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos 5' – trifosfato

G - Força G

IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

Kb - Quilobases

p/v - Peso/volume

pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase, do inglês Polymerase chain reaction

pH - Potencial hidrogeniônico

RNAse - Ribonuclease

rpm - Rotações por minuto

U - Unidade enzimática

UV - Ultravioleta

v - Volume

v/v - Volume/volume

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactose

N-terminal - Amino-terminal

C-terminal - Carboxi-terminal

SDS - Sódio dodecil sulfato

Tris - Tri(hidroximetil)aminometano

TE – Tampão composto por Tris e EDTA

MALDI - Ionização por dessorção de matriz assistida por laser, do inglês *matrix assisted laser desorption/ionization*

MS – espectrometria de massa, do inglês *mass spectrometry*

BK – bradicinina, do inglês bradykinin

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*

TFA – ácido trifluoroacético, do inglês *trifluoroacetic acid*

TOF – tempo de voo, do inglês *time of flight*

ESI – ionização por *electron spray*, do inglês *electron spray ionization*

MIC – concentração inibitória mínima, do inglês *minimal inhibitory concentration*

LC-MS – cromatografia de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa, do inglês *low chromatography mass spectrometry*

m/z – massa/carga

VIP – peptídeo intestinal vasoativo, do inglês *vasoactive intestinal peptide*

IMS – Imagem por espectrometria de massa, do inglês *imaging mass spectrometry*

EST – Etiqueta de sequência expressa, do inglês *expressed sequence tag*

V. RESUMO

Esse trabalho descreve um modelo experimental o qual emprega análises da expressão de peptídeos da secreção cutânea de anfíbios, com enfoque nas variações dos níveis de transcrição de genes de interesse e no mapeamento de peptídeos estocados nas glândulas granulares. A partir desse modelo, foram utilizadas ferramentas de biologia molecular e espectrometria de massa para investigar processos de maturação das glândulas granulares em *Phyllomedusa azurea* durante a metamorfose e para avaliar como esse anfíbio responde a diferentes estímulos. Os resultados evidenciam a presença dos peptídeos no tecido cutâneo, em pequenas concentrações, apenas a partir do estágio 41 de desenvolvimento. Um súbito aumento da concentração de peptídeos na pele de *P. azurea* é observado quando este migra para o hábitat terrestre. Contudo, mesmo logo após o término da metamorfose, as glândulas granulares não apresentaram o mesmo padrão de conteúdo peptídico do animal adulto. Os resultados indicam também que glândulas individuais armazenam um conteúdo próprio e que a presença de microrganismos modula tanto os processo de transcrição gênica, quanto os de tradução e estocagem de peptídeos. Ainda, fundamentado no modelo experimental proposto, a expressão diferencial de peptídeos nas glândulas granulares dorsais e inguinais foi investigada em anfíbios adultos da espécie *Physalaemus nattereri*. Observa-se, a partir dos resultados, que peptídeos antimicrobianos foram flagrados uniformemente distribuídos ao longo de todo o tecido cutâneo de *P. nattereri*, ao passo que os peptídeos relacionados a bradicininas são preferencialmente sintetizados nas glândulas inguinais. Isto sugere uma fina sintonia entre o sistema fisiológico e o comportamento deimático apresentado por esse anfíbio. O modelo experimental apresentado aqui pode ser estendido a outros grupos de animais, assim como, em experimentos que envolvam questionamentos relacionados a interações peptídeos/proteínas em tecidos das mais diversas origens.

VI. ABSTRACT

The present work describes a strategy that involves peptide frog skin expressing analysis, based on RNA transcription level measurement and glandular peptide skin mapping, to respond biological relevant questions. The chosen experimental model is based on molecular biology and mass spectrometry techniques to investigate granular glands maturation process of *Phyllomedusa azurea* through metamorphose and the peptide skin composition when this anuran is submitted to biotic stress. The results show that larvae of *P. azurea* on stage 37 presents right levels of RNA transcriptions, although low concentration of peptides were identified on skin just from stage 41. There was a sudden increased peptide skin concentration when *P. azurea* migrates to terrestrial habitat (stage 43). But, after metamorphose end, the standard glandular peptide content of juvenile frogs is different from adult frogs. The results show that individual glands have an intrinsic peptide content stored and that the microorganisms can alter the transcriptional level processes, as well as, the peptide skin gland content. The same experimental model was applied to investigate the differential peptide expression on granular glands and inguinal macro glands from *Physalaemus nattereri*. The results show that the antimicrobial peptides are present on entire animal skin, while the bradykinin related peptides are present mainly on inguinal macro glands. Our finding suggest an amazing fine-tuning among animal behavior, skin physiology and gene expression. The experimental model introduced here represents an alternative strategy for differential gene expression analysis and peptide interaction identification directly on biological tissue that can be applied on different animal models.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O CICLO DE VIDA DOS ANFÍBIOS ANUROS

A classe Amphibia abrange três ordens: Anura (sapos, rãs e pererecas), Caudata (salamandras) e Gymnophiona a qual abrange as cecílias ou cobras-cegas (Duellman e Trueb, 1994). Existem 7044 espécies de anfíbios descritas em todo o mundo (Frost, 2013). No território brasileiro, são 943 espécies descritas, das quais 913 pertencem à ordem Anura (Sociedade Brasileira de herpetologia - <http://www.sbherpetologia.org.br/>).

A maioria das espécies de anfíbios anuros possui um ciclo de vida bem definido o qual tem como principal característica uma fase de vida inicial aquática seguida de uma transição para o habitat terrestre. Quanto ao padrão reprodutivo, de um modo geral, o macho atrai a fêmea por meio do canto, ou vocalização, quando então, entram em amplexo, permanecendo assim até o momento da deposição dos ovos. Após a fertilização, os ovos desenvolvem-se e as larvas eclodem, geralmente na água. Apesar da existência de um padrão, no decorrer da evolução, as diversas espécies de anfíbios anuros desenvolveram diferentes estratégias reprodutivas, as quais se distinguem, por exemplo: no tipo de vocalização realizada pelo macho, no tamanho dos ovos, no local de deposição destes e no nível de cuidado parental adotado (Salthe, 1963; Altig e McDiarmid, 2007).

Os anfíbios constituem o grupo de vertebrados terrestres vivos mais antigo que se conhece, representando um dos primeiros grupos de animais a abandonar o ambiente aquático. Dessa maneira, uma das características marcantes desse grupo é a metamorfose que ocorre durante o ciclo de vida da grande maioria das espécies de anfíbios: após a eclosão, é necessário que as larvas sofram modificações anatômicas drásticas em praticamente todos os órgãos do corpo, as quais são imprescindíveis para que o animal habite o ambiente terrestre (Yoshizato, 1989).

Modificações anatômicas externas podem ser empregadas como padrão para determinar o estágio de desenvolvimento dos anfíbios anuros durante o processo de metamorfose (Gosner, 1960). Observa-se, na Figura 1A, que o Estágio 1 corresponde à fertilização do ovo, enquanto a eclosão ocorre por volta do Estágio 25 (Figura 1B). A formação dos membros posteriores se completa no estágio 40, enquanto os membros anteriores ainda estão sendo formados e permanecem inclusos até o Estágio 42, momento no qual estes emergem (Figura 1C). Após esse estágio, o anfíbio abandona o meio aquático, migra para o ambiente terrestre e o processo de absorção da cauda é iniciado. A metamorfose é concluída após o desenvolvimento completo da boca e a total absorção da cauda, dando origem ao animal juvenil, no Estágio 46.

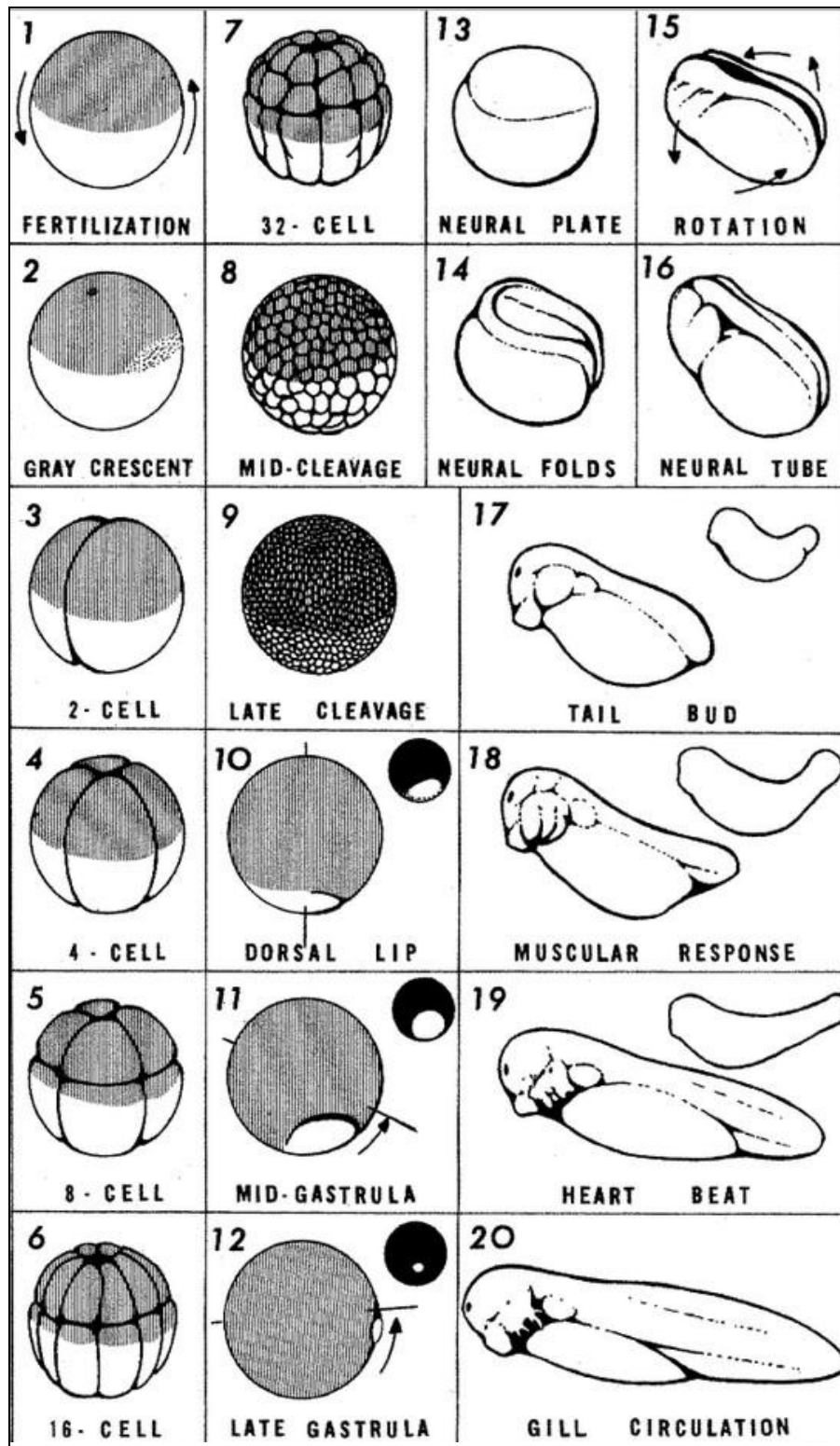


Figura 1A. Estágios de Gosner: padronização das principais características anatômicas que determinam o estágio de desenvolvimento em que o girino se encontra durante o processo de metamorfose em anfíbios anuros. Estágios 1 ao 20. Retirado de Gosner (1960).

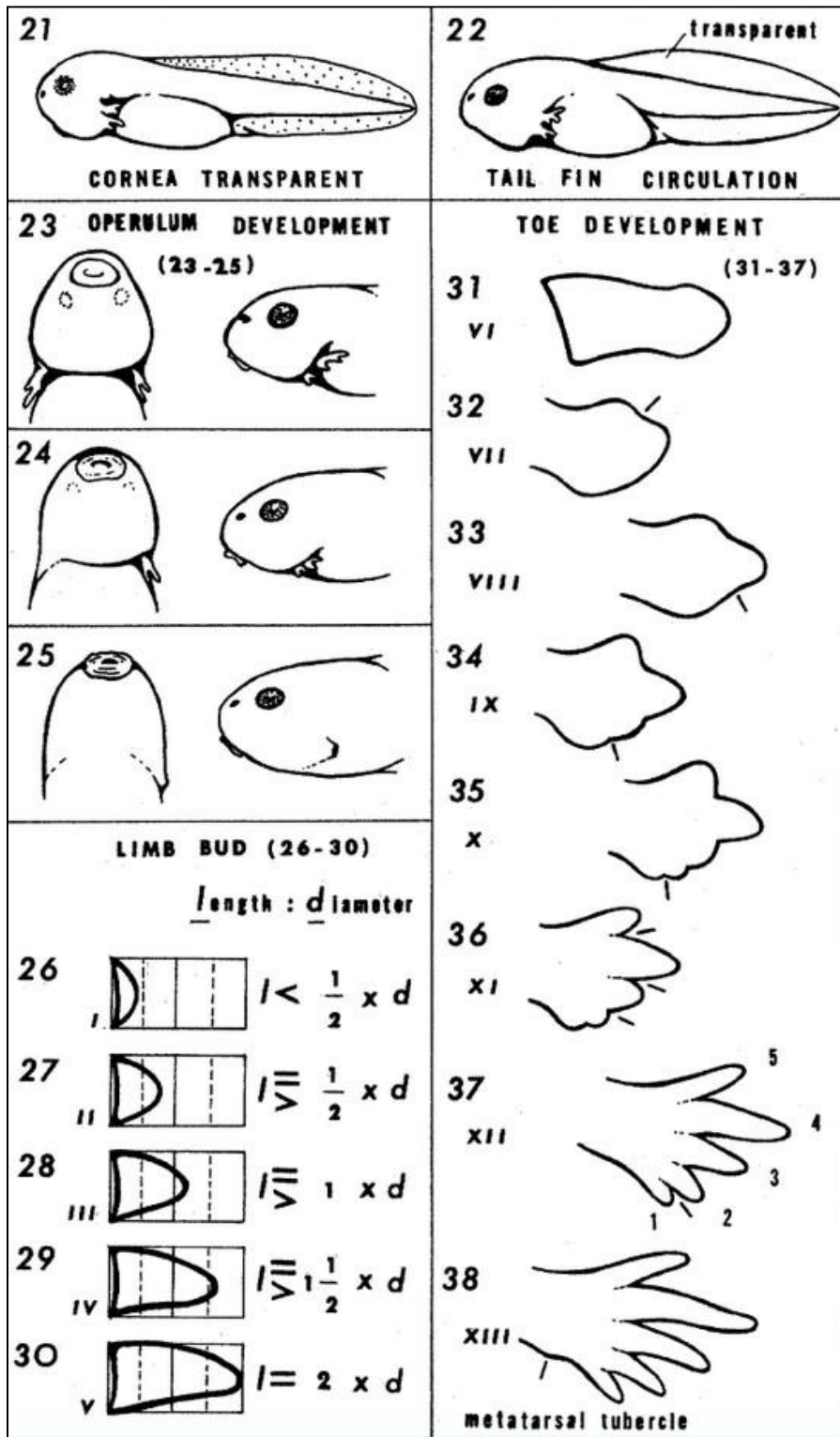


Figura 1B. Estágios de Gosner: padronização das principais características anatômicas que determinam o estágio de desenvolvimento em que o girino se encontra durante o processo de metamorfose em anfíbios anuros. Estágios 21 à 38. Retirado de Gosner (1960).

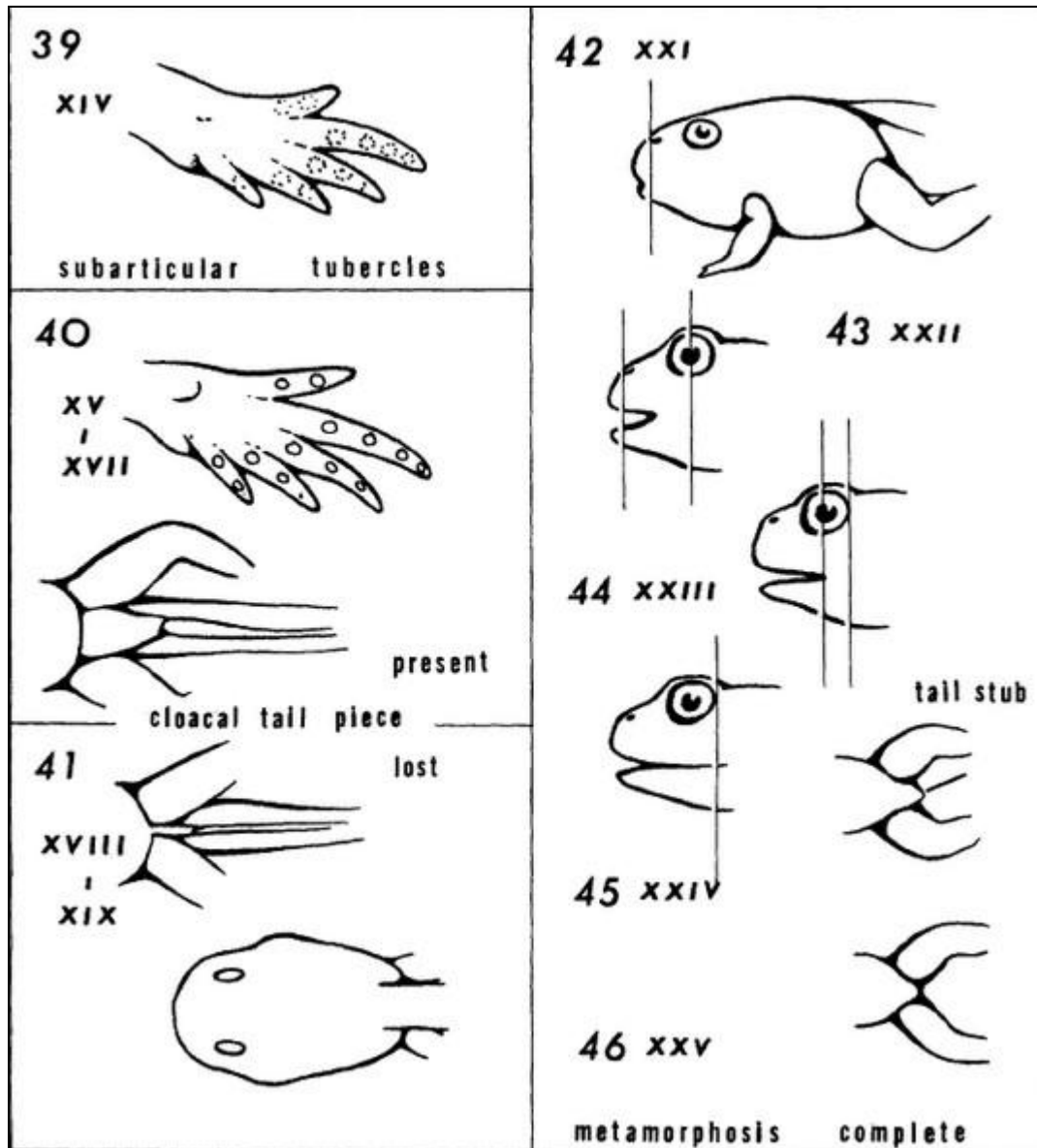


Figura 1C. Estágios de Gosner (1960): padronização das principais características anatômicas que determinam o estágio de desenvolvimento em que o girino se encontra durante o processo de metamorfose em anfíbios anuros. Estágios 39 à 46. Retirado de Gosner (1960).

Embora a tabela de Gosner seja útil como uma ferramenta para padronizar o estágio de desenvolvimento em que o anfíbio anuro em metamorfose se encontra, ela não leva em

consideração as mudanças teciduais internas, ou as que ocorrem em nível celular, ou ainda aquelas que ocorrem em nível molecular, como por exemplo:

1) Remodelamento do intestino: em girinos, o intestino é um órgão tubular, simples, enrolado em forma de caracol. Durante a metamorfose, aproximadamente, 75% do seu tamanho é reduzido, dando origem a um estômago, o qual possui características intrínsecas comuns entre os vertebrados, e a um intestino, de tamanho reduzido (Ishizuya-Oka e Shi, 2005). O epitélio torna-se estratificado e surgem dois tipos de glândulas secretoras (Angel *et al.*, 2003);

2) Pâncreas: durante a metamorfose, o pâncreas torna-se mais alongado e a estrutura da região produtora de insulina (células individuais, ou agregados contendo algumas células, no estágio larval) é remodelada em aglomerações celulares semelhantes a ilhas, (Maake *et al.*, 1998);

3) Eritrócitos: as globinas dos girinos e dos animais adultos são diferentes entre si. As células vermelhas dos girinos são induzidas a apoptose durante a metamorfose, enquanto as células progenitoras típicas do animal adulto são estimuladas (Nishikawa e Hayashi, 1999).

4) Tecido cutâneo: a pele dos girinos consiste em três camadas de células separadas do tecido muscular por meio de uma lâmina de colágeno, das quais a camada mais externa é análoga à periderme de mamíferos, enquanto fibroblastos subepiteliais fazem fronteira com o colágeno. Não há derme. A metamorfose induz as células da pele a entrar em apoptose e as células basais a formar o epitélio germinativo, típico do animal adulto (Schreiber e Brown, 2003). Os tecidos cutâneos mais complexos entre os anfíbios anuros possuem uma derme subjacente e, pelo menos, dois tipos de glândulas secretoras, as quais surgem durante a metamorfose (Delfino *et al.*, 1998; Delfino *et al.*, 2002).

Há muito tempo os fatores moleculares que direcionam a metamorfose em anfíbios têm despertado o interesse de cientistas. Ainda no século passado, observou-se que a remoção da

glândula tireoide inibe a metamorfose em girinos (Allen, 1925). Hoje, sabe-se que os hormônios tireoidianos (T4 e T3) são os responsáveis por orquestrar praticamente todos os eventos moleculares que resultam nas mudanças morfológicas ocorridas durante a metamorfose em anfíbios anuros. Tais hormônios interagem com seus receptores localizados no núcleo celular, os quais fazem parte da família dos fatores de transcrição (Sap *et al.*, 1986; Weinberger *et al.*, 1986). A partir de então, a metamorfose tem sido vislumbrada como sendo uma série de eventos transcricionais controlados por hormônios tireoidianos.

Os mesmos hormônios são os responsáveis por promover alterações distintas em tipos celulares iguais, como ocorre no tecido muscular que, quando localizado na cauda, é induzido à morte celular, enquanto nos membros é induzido a crescer e diferenciar-se. Embora muitas questões ainda permaneçam sem resposta, sabe-se que a concentração dos receptores tireoidianos, a quantidade de hormônio endógeno presente e a quantidade local de enzimas responsáveis por inativar T3 e T4 desempenham um papel crucial na orquestração dos eventos decorrentes da metamorfose (Brown e Cai, 2007).

1.2. A PELE DOS ANFÍBIOS

A pele dos anfíbios é um órgão que desempenha papéis imprescindíveis para a manutenção fisiológica destes organismos. Entre estes destacam-se: a respiração, o transporte de água e solutos, a regulação osmótica, a regulação da temperatura corporal e a defesa contra predadores e microrganismos (Sebben *et al.*, 1993). A defesa contra microrganismos patogênicos é importante porque a pele desses animais é um ambiente favorável para o crescimento de bactérias e fungos (Toledo e Jared, 1995). Ademais, o crescimento exagerado da microbiota cutânea natural deve ser controlado (Simmaco *et al.*, 1998). Tal microbiota é convive em mutualismo no tecido cutâneo dos anfíbios e participa na proteção contra infecções

causadas por microrganismos patogênicos, auxiliando o sistema imune inato (Harris *et al.*, 2009).

Existem dois tipos de glândulas na pele da maioria dos anfíbios: glândulas mucosas e glândulas granulares. As glândulas mucosas, menores e em maior número, são responsáveis por manter a pele úmida e escorregadia por meio da secreção de mucinas. As glândulas granulares, por outro lado, são maiores, apresentam-se em menor número e estão localizadas, principalmente, na região dorsal da pele desses animais. As glândulas granulares são responsáveis pela produção, armazenamento e liberação de moléculas bioativas, como peptídeos antimicrobianos (Dockray e Hopkins, 1975; Toledo e Jared, 1995).

De maneira geral, em nível microscópico, a estrutura das glândulas granulares dos anfíbios anuros, representada na Figura 2, é compreendida por tecido sincicial no qual os núcleos celulares, assim como as demais macro-organelas, estão dispostos na periferia da glândula, enquanto o restante do citoplasma é constituído de vesículas secretoras, em forma de grânulos contendo peptídeos e proteínas. Dependendo da espécie, esses grânulos, geralmente uniformes e arredondados, agrupam-se em estruturas maiores, as quais variam em forma e tamanho, mais comumente elipsoides. Situadas na derme, as glândulas se abrem para o meio exterior por meio de ductos epidermais e são recobertas por tecido mioepitelial (Dockray e Hopkins, 1975; Delfino *et al.*, 2002; Terreni *et al.*, 2003; Delfino *et al.*, 2006).

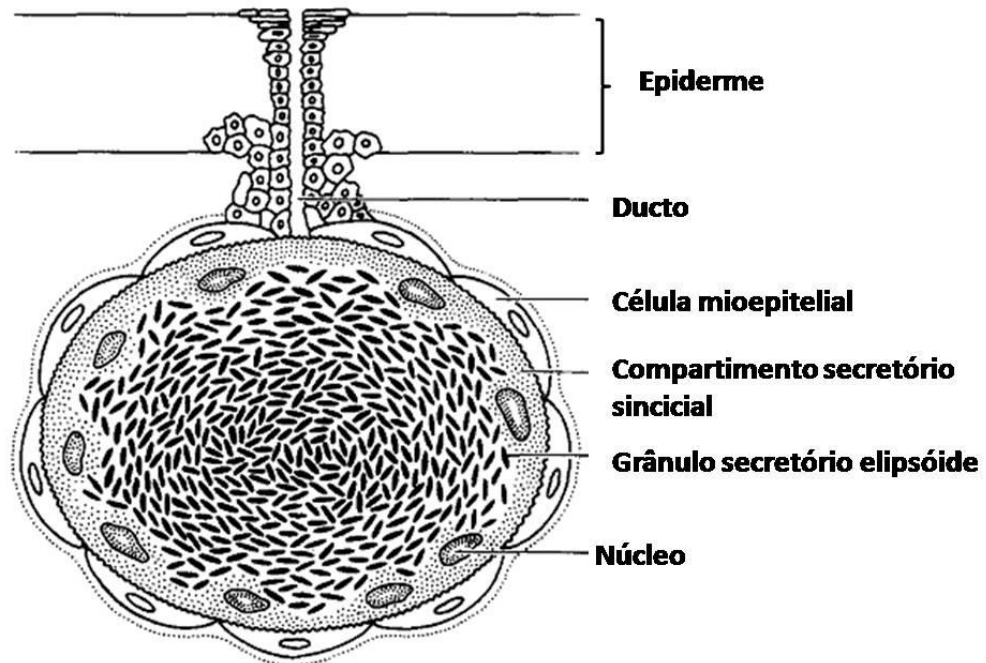


Figura 2. Representação esquemática da glândula granular de anuros. Modificado de Dockray e Hopkins (1975).

Por volta do Estágio 41 de desenvolvimento, o tecido cutâneo dos anuros começa a diferenciar e formar a derme, na qual se encontram as glândulas granulares. Estas se desenvolvem a partir de discretos adenoblastos que migram da epiderme, os quais se diferenciam e fundem suas membranas plasmáticas com adenoblastos adjacentes, dando origem ao arranjo sincicial característico das unidades secretoras em questão. A seguir, uma camada de células começa a se formar em volta do sincício, a qual dará origem ao tecido mioepitelial. A maturação da glândula se divide em duas fases: 1) fase de biossíntese, na qual existe uma grande produção de peptídeos e proteínas, o que envolve a intensa participação do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi e; 2) fase de condensação, momento no qual os produtos biossintéticos são estocados nos grânulos e o conjunto dos quais adota o formato elipsóide característico de algumas espécies. Essa fase é caracterizada ainda pela diminuição da atividade biossintética (Delfino *et al.*, 1998; Delfino *et al.*, 2002; Terreni *et al.*, 2003). Os

ductos somente serão totalmente formados após a queratinização da epiderme, o que ocorre após a metamorfose (Delfino *et al.*, 2006).

É interessante ressaltar que, em anfíbios pertencentes ao Hypochondrialis (anfíbios do gênero Phyllomedusa cujas semelhanças morfológicas não permitem precisar o número de espécies com o compõe), existem dois subtipos de glândulas granulares: Ia e Ib. A principal diferença entre as duas se dá na constituição do material que cada uma armazena. O subtipo Ia exibe conteúdo biossintético denso o qual se apresenta em estruturas com as mais diversas formas geométricas, assemelhando-se a cristais, cujo processo de maturação consiste de condensação e fusão. Já os produtos estocados nas glândulas do subtipo Ib constituem-se de vesículas contendo produto biossintético de aspecto aquoso, os quais sofrem maturação sem que ocorra o processo de fusão (Delfino *et al.*, 1998).

1.3. PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS ISOLADOS A PARTIR DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE ANFÍBIOS ANUROS

1.3.1. PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A produção de peptídeos antimicrobianos em anfíbios faz parte do sistema imune inato, um mecanismo essencial de defesa em organismos multicelulares, cuja função é agir como a primeira barreira de proteção contra o ataque e a proliferação de microrganismos patogênicos (Brown e Hancock, 2006). A estrutura primária dos primeiros peptídeos isolados a partir da secreção de anfíbios foi determinada por Csordas e Michl (1969) enquanto estudavam as toxinas do anfíbio *Bombina variegata*. No entanto, a atividade antimicrobiana desses peptídeos ainda não havia sido caracterizada. Zasloff (1987) foi o primeiro a descrever a atividade antimicrobiana de peptídeos caracterizados a partir da secreção cutânea de anfíbios. Estudando a espécie *Xenopus laevis*, o autor isolou, caracterizou e determinou a atividade antimicrobiana de dois peptídeos, nomeados de Magainina 1 e Magainina 2. Desde então, já

foram caracterizados mais de 700 peptídeos antimicrobianos isolados a partir da secreção cutânea de diversas espécies de anfíbios. Tais peptídeos possuem atividade contra um amplo espectro de patógenos microbióticos e estão agrupados em, pelo menos, 26 famílias distintas (Wang e Wang, 2004) – banco de dados acessado em 13 de Novembro de 2013.

Os peptídeos antimicrobianos isolados a partir da secreção cutânea de anfíbios possuem uma grande diversidade em estrutura primária. No entanto, a maioria desses peptídeos compartilha características físico-químicas comuns, como: carga positiva, devido principalmente à presença de resíduos catiônicos em sua estrutura primária; número de resíduos de aminoácidos variando entre 10-50; e estrutura tridimensional em forma de α -hélice anfipática quando estão em meio apolar (Nicolas *et al.*, 2003). Especula-se que essas características físico-químicas, comuns aos peptídeos antimicrobianos de anfíbios, sejam essenciais para a sua ação na inibição do crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, assim como, protozoários (Wieprecht *et al.*, 1997; Shai, 1999; Giangaspero *et al.*, 2001; Shai, 2002; Leite *et al.*, 2005; Brand, Leite, *et al.*, 2006; Magalhaes *et al.*, 2008).

A desestabilização de membranas biológicas tem sido considerada o mecanismo pelo qual os peptídeos antimicrobianos exercem sua função, agindo como detergentes, ou formando poros (Mecke *et al.*, 2005; Meincken *et al.*, 2005). No entanto, evidências sugerem que tal desestabilização pode ser apenas um dos mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos agem (Sahl *et al.*, 2005). De qualquer forma, a interação entre os peptídeos antimicrobianos e as membranas biológicas alvo é, aparentemente, imprescindível para a ação destes (Brand *et al.*, 2002).

Os peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea de anfíbios anuros são sintetizados e processados a partir da tradução de um RNA mensageiro que contém regiões altamente conservadas entre aqueles pertencentes às famílias Hylidae e Ranidae,

principalmente (Nicolas *et al.*, 2003). Os genes responsáveis pela transcrição de RNAs que codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios possuem em sua estrutura pelo menos dois éxons separados por uma região não codificadora pequena (Vouille *et al.*, 1997; Miele *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2005). O “éxon1” codifica a sequência de aminoácidos que forma a região do peptídeo sinal, assim como os primeiros aminoácidos de uma região que contém vários resíduos de aminoácidos carregados negativamente, conhecida como região acídica. O “éxon2” codifica o restante da sequência de aminoácidos da região acídica e a sequência de aminoácidos do que virá a ser o peptídeo maduro.

Dessa maneira, após o processamento do RNA, a tradução do RNA mensageiro nas glândulas granulares dos anfíbios dá origem a um pré-pró-peptídeo que comunga três regiões distintas, as quais estão demarcadas pela presença de sítios de clivagem enzimática reconhecidos por serino-proteases do tipo tripsina: uma região de peptídeo-sinal formada por 20-27 resíduos de aminoácidos; uma região acídica, rica em resíduos de ácido glutâmico, formada por cerca de 20 resíduos de aminoácidos; e a região do peptídeo maduro, que pode ser constituída por polímeros contendo 10 a 50 resíduos de aminoácidos, os quais serão estocados nas glândulas granulares após o processamento (Terry *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 2005).

As regiões que compreendem o peptídeo sinal e a região acídica dos pré-pró-peptídeos antimicrobianos de anfíbios são altamente conservadas entre aqueles pertencentes a diferentes gêneros, e, até mesmo, entre anfíbios pertencentes a famílias distintas (Nicolas *et al.*, 2003; Vanhoye *et al.*, 2003), em contraste com a região do peptídeo maduro, a qual pode ser altamente variável entre as diferentes espécies (Figura 3).

Espécie	Peptídeo sinal	Região ácida	Sequência progenitora do peptídeo antimicrobiano
<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	MAFLKKSFLFLVFLGLVPLSFCENDKR	---EGENEE-EQDDD-QSEEKR	ALGT-LLKGVGS AVATVGRMVADQFGKLLQAGQG-
<i>Pachymedusa dacinicolor</i>	MAFLKKSFLFLVFLGLVPLSFCENEKR	---EGENEK-EENDD-QSEEKR	SLGS-FMKGVGKGLATVGRIVADQFGKLLLEAGK-
<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	MAFLKKSFLFLVFLGLMVLSICEEEKR	---ENEDEEL-QEDDEQSEMKR	GLWS-TIKNVGK-----EAATAAGKAAL-GAL-
<i>Agalychnis annae</i>	MAFLKKSFLFLVFLGLMVLSICEEEKR	---EEENE---QEDDEQSEEKR	GMFTNMLKGIKGL---AGQAALGAVRTLA-GEQ-
<i>Phyllomedusa bicolor</i>	MDILKKSFLFLVFLGLVLSICEEEKR	---ENEDEE-KQDDE-QSEMKR	AMWKDVLKKGITVALHAGKAALGAVADTISQGEQ-
<i>Litoria splandida</i>	MAFLKKSFLFLVFLGLFVSVSICEEEKR	QEDEDEHVEEGENQEEGSEEKR	GLLSVL-GSVAKH---VLPHVVPVIAEHLG----
<i>Litoria caerulea</i>	MASLKKSFLFLVFLGLFVSVSICEEEKR	QEDEDENEEEGESQEEGSEEKR	GLFGLANGSVAK-----PHVVPVIVSILVQ----
<i>Litoria infrafronata</i>	MHFLKKSIFLVLVFLGLVLSICEEKR	---EDQNEEEVDNEEESEEKR	GLMSVLGHAVGN-----VLGGFLPKS-----
<i>Amolops loloensis</i>	MFTLKKSMLLFFLGTISLSLCEEER	NAD-EDDGE-----KEVKR	GIFALINATAAKFVGNLLKQAGKAGLEHLACKANNQC--
<i>Rana schmackeri</i>	MFTLKKSMLLFFLGTISLSLCEQER	AADEDNGEV----EEVKR	GLFTLIRGAVKMIKGTVAKEAGKTGLELMACKVTNQC--
<i>Odorrana grahami</i>	MFTMKKSMLLFFLGTISLSLCEQER	DADEDEGEAL----EEVKR	GLWDTIKQ----AGKKFFLVN----LDNIRCKVAGGCRT
<i>Rana amurensis</i>	MFIMKSMLLFFLGTISLSLCEQER	DADED--EVV----EEVKR	GLWESIKN----LGKKFALNI----MEKIKCKRFGGCLP
<i>Rana latouchii</i>	MFTMKKSMLLFFLGTISLSFCEEER	GADEDEVEMT--EEE-KR	GVLDTFND----VAIGVAKGAGTGVLKALLCKLDKSC--
<i>Rana latouchii</i>	MFTLKKSMLLFFLGTISLSFCEEER	GADEDEVEMT--EEE-KR	SILDKIKN----VALGVARGAGTGILKALLCKLDKSC--
<i>Rana nigrovittata</i>	MFTMKKSMLLFFLGTISLSLCEEER	GADEDDGEEMT--EEEVKR	SFLSKFND----IALDVARNAGKGVLTTLACKIDGSC--
<i>Rana livida</i>	MFTMKKSMLLFFLGTISLSLCEEER	GAEDDDGVEEMT--EEEVKR	GLLDTIKN----MALNAKRSAGVSVLNTLSCKLSKTC--
<i>Rana pipiens</i>	MFTMKKSMLLFFLGTISLSLCEQER	GAEDDDGVEIT--EEEVKR	GLMDTVKN----VAKNLAG----HMLDKLCKKITG-C--
<i>Rana versabilis</i>	MFTLKKSMLLFFLGTITLSLCEQER	GAEDDDGVEEMT--EEEVKR	GLLDTIKN---TAKNLAV----GLLDKIKCKMTG-C--
<i>Rana esculenta</i>	MFTMKKSMLLIFFLGTISLSLCEEER	NADDDGEMT---EEE-KR	GIMDTLKN----LAKTAGKALQSLVKMASCKLSGQC--
<i>Limnodynastes kuhlii</i>	MFTMKKSMLLIFFLGTINLSLCEEER	NAEEEKRDGD---DEMDAEVQKR	FIG---PIIKIASS----LLPTAICKIFKKC--
<i>Amolops loloensis</i>	MFTLKKSMLLFFLGTINLSLCEQER	NADEEDRDD---DEMDVEVEKR	FLP---MLAGLAAN----FLPKLFCIKKIC--
<i>Rana dybowskii</i>	MFTLKKSMLLFFLGTISLTLCEEER	DANEEENG---EVKVEEKR	FIGP-----IISALASLFGG----
<i>Kassina maculata</i>	MLSLLKSMLLFFLGMVFSIADDKR	EDEGEDKRADE-GEEKRAAEKR	FVG---AIAAALP----HVISAIKNALG----

Figura 3. Alinhamento de aminoácidos da estrutura primária de pré-pró-peptídeos antimicrobianos preditos a partir do sequenciamento de cDNAs isolados de diferentes anfíbios anuros. Os precursores foram selecionados aleatoriamente após uma busca por similaridade realizada na plataforma *NCBI Protein Blast*.

Durante a maturação da glândula granular, mais especificamente na fase de biossíntese, observa-se uma intensa atividade do retículo endoplasmático rugoso, assim como do complexo de Golgi (Dockray e Hopkins, 1975; Delfino *et al.*, 1998; Terreni *et al.*, 2003). Essas observações sugerem que a síntese e a maturação de peptídeos e proteínas estocadas nas glândulas granulares de anfíbios anuros ocorrem principalmente com o auxílio dessas organelas. Vale ressaltar que os grânulos que estocam tais peptídeos no citoplasma sincicial das glândulas em questão compartilham semelhanças com vesículas secretoras. Além disso, alguns peptídeos sofrem modificações pós traducionais, como amidação C-terminal (Pukala *et al.*, 2006), presença de D-aminoácidos (Magalhaes *et al.*, 2013), e formação de piroglutamato (dados não publicados gerados pelo grupo de pesquisa do qual faz parte o autor da tese), o que sugere a participação de enzimas do complexo de Golgi durante o processo de maturação.

1.3.2. ANÁLOGOS DE BRADICININAS

Os análogos de bradicininas isolados das secreções cutâneas de anfíbios exibem estruturas primárias similares aos encontrados em mamíferos. Após terem sido primeiramente caracterizados em *Rana temporária* (Anastasi *et al.*, 1965), foi demonstrada a presença de análogos de bradicininas na secreção cutânea de anfíbios que compõe diferentes famílias (Li *et al.*, 2003; Brand, Leite, *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011; Samgina *et al.*, 2011). Tais moléculas invariavelmente apresentaram as atividades biológicas características, quando testadas: vasodilatação, hipotensão e contração de músculos lisos não vasculares (Conlon, 1999; Conceicao *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011). Existem evidências de que os análogos de bradicininas exercem, em anfíbios, um papel de proteção contra a predação: a ação dessas moléculas no estômago de predadores estimularia a mobilidade gástrica e a consequente regurgitação do animal, o que levaria a uma rejeição desse tipo de presa (Conlon, 1999).

1.3.3. INIBIDORES DE ENDOPEPTIDASES

Inibidores de endopeptidases são comumente encontrados nas secreções de anfíbios anuros, dentre os quais, o primeiro descrito foi o BSTI (*Bombina skin trypsin inhibitor*), caracterizado a partir de análises da secreção cutânea de *Bombina bombina*. O BSTI demonstrou-se eficiente em inibir a atividade enzimática das endopeptidases tripsina e trombina (Mignogna *et al.*, 1996). A maioria dos inibidores de endopeptidases isolados em secreção de anuros apresenta massa molecular próxima a 6 KDa, dentre os quais, grande parte possui alta similaridade estrutural ao BSTI e ação inibitória contra diversos tipos de serino-proteases e metaloproteases, como: trombina (Lu *et al.*, 2008), prolil endopeptidases (Gebhard *et al.*, 2004), quimotripsina (Wang *et al.*, 2012) e tripsina (Mignogna *et al.*, 1996; Conlon e Kim, 2000; Ali *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2002; Chen e Shaw, 2003).

Alguns inibidores de endopeptidases possuem duas atividades biológicas, como ocorre com os TIL (*trypsin inhibitory loop*), os quais possuem massa molecular próxima a 2 KDa e apresentaram atividade antimicrobiana quando testados *in vitro* (Li *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2012). O inibidor enzimático BTAI apresenta o maior peso molecular (22 KDa), quando comparado a outros inibidores caracterizados em secreções de anfíbios, tem afinidade por tripsina e foi isolado da secreção cutânea de *Bufo andrewsi* (Zhao *et al.*, 2005).

O papel biológico dos inibidores de endopeptidases na secreção cutânea de anfíbios ainda não está muito claro. No entanto, especula-se que eles fazem parte do arsenal de moléculas que protege o animal do ataque de microrganismos, devido ao fato de algumas dessas moléculas apresentarem atividade antimicrobiana (Li *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2012). Além disto, os inibidores poderiam estar protegendo os peptídeos presentes na própria secreção cutânea contra a ação de eventuais endopeptidases de predadores, impedindo

assim, uma possível degradação das moléculas biologicamente ativas antes que elas alcancem seus alvos moleculares (Mignogna *et al.*, 1996; Chen e Shaw, 2003).

1.3.4. TRIPTOFILINAS

Existe uma classe de pequenos peptídeos isolados a partir da secreção cutânea de anfíbios conhecida como triptofilinas. As principais características compartilhadas pelos peptídeos que fazem parte dessa família são o tamanho (4 a 7 resíduos de aminoácidos), a presença do resíduo de aminoácido triptofano, geralmente, na terceira ou quarta posição, e a amidação N-terminal (Montecucchi, 1985; Steinborner *et al.*, 1994; Wang, Zhou, Chen, *et al.*, 2009).

Até o momento, a atividade biológica de apenas dois peptídeos pertencentes à família das triptofilinas foi demonstrada, ambos, induzindo diretamente a contração de musculatura lisa (Chen *et al.*, 2004; Wang, Zhou, Chen, *et al.*, 2009). No entanto, dezenas de triptofilinas não apresentaram qualquer atividade biológica quando testadas *in vitro*, como as ausências de ação miotrópica (Conlon *et al.*, 2005), antimicrobiana e na inibição da produção de óxido nítrico (Samgina *et al.*, 2010). Dessa maneira, o papel biológico dessa classe de moléculas permanece incerto.

1.3.5. DEMAIS PEPTÍDEOS

Outras atividades biológicas já foram descritas a partir de ensaios realizados com diferentes peptídeos isolados da secreção cutânea de anfíbios anuros, como por exemplo, indução da secreção de hormônios do trato gastrointestinal (Severi *et al.*, 1991), analgesia (Wu *et al.*, 2011), inibição de canais para sódio voltagem dependente sensíveis a tetrodotoxina (You *et al.*, 2009), peptídeos miotrópicos, como o isolado da secreção cutânea de *Phyllomedusa sauvagei* (Wang, Zhou, Zhou, *et al.*, 2009). Além do mais, existe um grande número de moléculas isoladas cujas atividades biológicas ainda não foram determinadas.

De modo geral, a maneira pela qual todos os polipeptídeos isolados da secreção cutânea de anuros são sintetizados e processados é similar àquela que ocorre com os peptídeos antimicrobianos, exceto os inibidores enzimáticos. Ou seja, síntese de um RNA mensageiro o qual traduz um pré-pró-peptídeo contendo as três regiões características: peptídeo sinal e região acídica conservados e região do peptídeo maduro. O precursor sofre então, clivagem enzimática, possíveis modificações e posterior liberação do peptídeo maduro nos grânulos secretores (Li *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Neiva *et al.*, 2013). A estrutura dos RNAs mensageiros caracterizados que codificam os inibidores enzimáticos não apresenta a região acídica, embora alguns possuam a região do peptídeo sinal conservada (Chen e Shaw, 2003; Lu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012).

O fato de as secreções de anfíbios possuírem peptídeos com estruturas semelhantes a de moléculas rotineiramente encontradas no cérebro e no intestino de vertebrados levou Erspamer *et al.* (1981) a propor a existência de um eixo de comunicação do tipo cérebro-intestino-pele. Tal proposta sugere que tais tecidos podem ser capazes de se intercomunicar de maneira que um possa modular o comportamento fisiológico do outro. Estudos mais recentes indicam, por exemplo, que mudanças direcionadas na composição da microbiota intestinal podem interferir no tratamento de doenças da pele e no crescimento capilar (Arck *et al.*, 2010).

1.4. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

O sistema imune inato é um mecanismo de defesa evolutivamente conservado que apresenta os mesmos padrões moleculares em plantas e animais (Janeway e Medzhitov, 2002). Exerce sua função quando o organismo é infectado por patógenos, ao passo que sua ativação acontece por meio de receptores celulares de membrana, conhecidos como *Toll-like*

receptors (TLR), os quais reconhecem moléculas específicas presentes na superfície dos microrganismos (Hoffmann *et al.*, 1999). Dentre as moléculas que podem ser reconhecidas pelo sistema imune inato, se destacam os lipopolissacarídeos (LPS) presentes nas membranas externas de bactérias Gram-negativas, peptidoglicanos e ácido lipoteicoico (LTA) de bactérias Gram-positivas, e 1,3- β -D-Glucan presentes na superfície de fungos (Medzhitov e Janeway, 2002).

Estudos realizados em insetos demonstraram que o reconhecimento dessas moléculas pelo sistema imune inato aciona uma complexa cascata de sinalização do tipo serino-proteinase (Jiang e Kanost, 2000), a qual, em um último estágio, induz a expressão de genes que codificam fatores de transcrição do tipo $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$). Estes fatores de transcrição são sintetizados no citoplasma e posteriormente transportados ao núcleo celular, onde irão interagir com a região promotora dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos, induzindo o aumento da taxa de transcrição de tais genes (Anderson, 2000; Lemaitre e Hoffmann, 2007). Em moscas do gênero *Drosophila*, existem duas rotas de sinalização diferentes que levam à síntese de peptídeos antimicrobianos por meio da ação de dois tipos de fatores nucleares de transcrição distintos: DIF (*dorsal-related immunity factor*) e *Relish*. O primeiro é ativado principalmente em resposta a infecções promovidas por fungos e bactérias Gram-positivas, enquanto o segundo àquelas promovidas por bactérias Gram-negativas (Lemaitre *et al.*, 1996).

Foi demonstrado que glicocorticóides são capazes de suprimir a síntese de peptídeos antimicrobianos em células humanas por meio da indução de genes que codificam inibidores dos fatores de transcrição, chamados I- $\kappa\beta$. Esses inibidores (I- $\kappa\beta$) ligam-se à NF- $\kappa\beta$ presentes no citoplasma, impedindo sua entrada no núcleo celular (Scheinman *et al.*, 1995).

No que diz respeito à indução da expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios, foi demonstrado que a presença da bactéria *Aeromonas*

hydrophila quando presente na pele de *Pelophylax esculentus* promove um aumento do “pool” de peptídeos presentes na secreção cutânea deste, reduzindo a proliferação bacteriana e controlando os níveis de infecção (Simmaco *et al.*, 1998). Miele colaboradores (1998) caracterizaram a presença de sítios de ligação a fatores de transcrição do tipo NF- κ B na região promotora do gene que codifica as bombininas, peptídeos antimicrobianos isolados a partir da secreção cutânea de *Bombina orientalis*, corroborando a hipótese de que o sistema inato de defesa é conservado evolutivamente entre os animais. Além disso, estudos demonstram que sapos da espécie *Pelophylax esculentus*, quando tratados com glicocorticoides, tornam-se temporariamente incapazes de sintetizar peptídeos antimicrobianos para a secreção cutânea (Miele *et al.*, 1998). Como demonstrado em células de mamíferos, os glicocorticoides inibem a expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios por meio da indução da síntese de I- κ B, um inibidor de fatores de transcrição do sistema imune inato (Simmaco *et al.*, 1997).

1.5. *Phyllomedusa azurea*

Phyllomedusa azurea (Cope, 1862) é um anfíbio que habita grande parte da América do Sul e faz parte do grupo *Hypochondrialis* (Frost, 2013), cujo nome, na verdade, suspeita-se representar um complexo de espécies (Faivovich *et al.*, 2010). Recentemente, foi demonstrado que os caracteres morfológicos não são suficientes para distinguir *P. azurea* de *Phyllomedusa hypochondrialis* e que, provavelmente, as regiões do cerrado brasileiro abriguem apenas as espécies designadas como *P. hypochondrialis* (Bruschi *et al.*, 2013). Dessa maneira, enquanto não houver recursos diagnósticos confiáveis para a diferenciação precisa entre as duas espécies, esta deve ser tratada com cautela. Assim, deve-se ter sempre em mente que podem haver equívocos quanto à espécie em questão, principalmente tratando-se dos anfíbios que habitam a região brasileira.

P. azurea apresenta hábito noturno, mede aproximadamente 3,5 cm, possui coloração predominante verde, além de um padrão de cor listrado em preto e alaranjado na parte interna das patas anteriores, das posteriores, e na região lateral posterior do corpo. Na época de reprodução, esse anfíbio pode ser encontrado, principalmente, em arbustos próximos a rios ou corpos de água (Figura 4).



Figura 4. Anuros da espécie *P. azurea*. A barra na fotografia inferior direita representa 3,5 cm.

A secreção cutânea dos anfíbios pertencentes ao gênero *Phyllomedusa* tem sido considerada como uma das mais ricas em componentes moleculares dentre aquelas já investigadas. Diversos peptídeos com atividade biológica já foram caracterizados a partir da secreção cutânea de *P. azurea*, destacando-se os peptídeos antimicrobianos pertencentes às famílias das Filoseptinas, primeiramente descritos nessa espécie (Leite *et al.*, 2005), Dermaseptinas (Brand *et al.*, 2002; Brand, Leite, *et al.*, 2006), além de diversos peptídeos

relacionados a bradicininas (Brand, Krause, *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2006), triptofilinas e peptídeos opióides (Thompson *et al.*, 2007).

1.6. *Physalaemus nattereri*

Physalaemus nattereri (Steindachner, 1863) é um anfíbio anuro pertencente à família Leptodactylidae cujo primeiro registro de distribuição geográfica faz alusão à região central do Brasil (Steindachner, 1863; Melo-E-Silva *et al.*, 2008). Mais recentemente, a sua presença foi descrita também na Bolívia (Riva *et al.*, 2000), na Argentina (Lavilla *et al.*, 2001) e no Paraguai (Brusquetti e Lavilla, 2006). Os animais dessa espécie medem aproximadamente 5 cm e possuem hábito noturno. Uma característica morfológica importante desse anfíbio se dá na presença de duas glândulas inguinais negras, localizadas na região dorsal posterior (Figura 5).



Figura 5. Anuros da espécie *P. nattereri*. À esquerda, evidenciam-se as glândulas inguinais. A barra representa 5 cm.

As glândulas inguinais estruturam-se em dois discos negros que realizam uma função intimidadora quando associadas a um comportamento deimático que se caracteriza pela exposição visual das glândulas a possíveis predadores dando a impressão de se tratar de uma face com dois grandes olhos negros, aumentando assim, a proporção do tamanho real que o anfíbio possui (Lenzi-Mattos *et al.*, 2005). Ainda que esse comportamento não seja suficiente para afugentar o predador, a secreção cutânea desse anfíbio possui uma grande quantidade de moléculas tóxicas, as quais são capazes de infligir uma série de efeitos fisiológicos danosos em vertebrados (Lenzi-Mattos *et al.*, 2005). A ave da espécie *Syrigma sibilatrix* desenvolveu uma alternativa para contornar tal adversidade, lavando o anfíbio de forma contínua, até que se esgote o conteúdo tóxico de suas glândulas, antes de ingeri-lo (Giaretta, 2004).

Além das glândulas inguinais, *P. nattereri* possui as glândulas granulares dorsais comuns aos anfíbios (Mattos *et al.*, 2003). Essas glândulas, em conjunto, produzem uma secreção cutânea viscosa, a respeito da qual poucos estudos foram realizados com o objetivo de caracterizar o seu conteúdo, não existindo qualquer artigo científico publicado sobre o assunto, até o momento.

O pouco que se conhece a respeito do conteúdo da secreção cutânea de *P. nattereri* está descrito em teses e dissertações. Dentre estes, experimentos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa cujo autor da presente tese faz parte resultaram na caracterização de dois peptídeos com atividade antimicrobiana, chamados de nattererina 1 (NH₂-GLKDMIKNLAKEAAVKIAGAVIN KFSPQPQ-COOH) e nattererina 2 (NH₂-GLKDMIKNLAKEAAVKIAGAVINRFSPQPQ-COOH), cujos valores das massas experimentais obtidas foram [M+H]⁺ = 3179.79 Da e [M+H]⁺ = 3207.80 Da, respectivamente, os quais estão descritos em uma dissertação de mestrado (Martins, 2005); além de 15 peptídeos relacionados a bradicininas representados na tabela 1 (Iembo, 2005), descritos em uma tese de doutorado.

Tabela 1. Análogos de bradicininas identificados na secreção cutânea de *P. nattereri* por espectrometria de massa (retirado de lembo, 2005).

Peptídeos relacionados a bradicinina (BRPs)		[M+H] ⁺ (mensurada)	[M+H] ⁺ (calculada)
Análogos de bradicinina (Bk)			
(Val ¹ , Thr ⁶ , des-Arg ⁹)-Bk	VPPGFTPF	861,52	861,45
(des-Arg ⁹)-Bk	RPPGFSPF	904,50	904,47
(Thr ⁶ , des-Arg ⁹)-Bk	RPPGFTPF	918,54	918,48
(Val ¹ , Thr ⁶)-Bk	VPPGFTPF	1017,62	1017,55
Bradicinina	RPPGFSPF	1060,65	1060,57
(Thr ⁶)-Bk	RPPGFTPF	1074,67	1074,58
(Hyp ³)-Bk	RPHypGFSPFR	1076,65	1076,56
(Hyp ³ , Thr ⁶)-Bk	RPHypGFTPF	1090,66	1090,58
(Val ¹ , Thr ⁶)-Bk-VD	VPPGFTPFVD	1231,74	1231,65
(Val ¹ , Thr ⁶)-Bk-SPA	VPPGFTPFSPA	1272,76	1272,67
(Hyp ³)-Bk-VD*	RPHypGFSPFRVD	1290,74	1290,66
Filocininas (Pk)			
(Thr ⁶)-Pk	RPPGFTPFRIY	1350,85	1350,73
(Hyp ³ , Thr ⁶)-Pk	RPHypGFTPFRIY	1366,82	1366,73
Sulfatado (Thr ⁶)-Pk	RPPGFTPFRIY (SO₃H)	1430,83	1430,69
Sulfatado (Hyp ³ , Thr ⁶)-Pk	RPHypGFTPFRIY (SO₃H)	1446,78	1446,68

Além de o conhecimento a respeito do conteúdo da secreção cutânea de *P. nattereri* ser escasso, não há qualquer informação que descreva a diferença, ou a semelhança, que pode haver entre as moléculas produzidas pelas glândulas inguinais e as moléculas produzidas pelas glândulas granulares dorsais.

2. JUSTIFICATIVAS

A variedade de peptídeos antimicrobianos isolados das secreções de anfíbios caracterizada por técnicas bioquímicas é maior do que aquela descrita pelo sequenciamento convencional de cDNAs (dados não publicados gerados pelo grupo de pesquisa do qual faz parte o autor da tese). Além disso, pouco se conhece a respeito das variações presentes na estrutura do peptídeo sinal de precursores que codificam peptídeos distintos em uma mesma espécie de anfíbio. Tais inferências podem ser elucidadas com a construção de um transcriptoma gerado a partir dos métodos empregados nas plataformas de sequenciamento de nova geração, utilizando o tecido cutâneo de um anfíbio.

Os mecanismos macromoleculares relacionados ao surgimento das glândulas granulares em anfíbios anuros durante o processo de metamorfose têm sido descritos em diversas espécies (Dockray e Hopkins, 1975; Delfino *et al.*, 1998; Delfino *et al.*, 2002; Terreni *et al.*, 2003; Delfino *et al.*, 2006). Em *Phyllomedusa hypochondrialis*, por exemplo, animais que se encontram no estágio 41 de Gosner já apresentam uma porcentagem alta de glândulas granulares em etapas avançadas de maturação, o que sugere que as moléculas estocadas já estariam exercendo um papel regulatório e defensivo no ambiente aquático (Delfino *et al.*, 1998). No entanto, não se conhece a estrutura dos peptídeos que estão presentes na secreção durante esse processo de maturação das glândulas granulares, se é semelhante ao do animal adulto, ou se existe um padrão característico de biossíntese para cada uma das fases que compõe a metamorfose.

Quanto aos fatores externos que poderiam estimular a produção de peptídeos antimicrobianos na pele dos anfíbios, foi demonstrado que a presença de bactérias induz a produção de peptídeos antimicrobianos na pele de anfíbios (Simmaco *et al.*, 1998). Dessa forma, seria importante estudar as interações que envolvem os anfíbios e os microrganismos,

buscando analisar os efeitos da presença de microrganismos específicos na expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos. Por outro lado, nada se sabe a respeito da estimulação da síntese de peptídeos com outras atividades biológicas, os quais estão presentes na secreção cutânea de anfíbios, nem mesmo se o próprio estímulo promovido pela presença de microrganismos induz esse sistema.

Foi demonstrado que, quando as glândulas granulares dos anuros são esvaziadas, existe um processo de restauração e não de formação de novas glândulas. A regeneração da glândula após um evento de total depleção do seu conteúdo foi descrita em *Xenopus laevis*. Após uma semana, foi observado que células localizadas na região apical da glândula (pescoço da glândula) proliferam e invadem o sincício. Tais células se fusionam com as demais, formando, inicialmente, pequenas unidades sinciciais, momento no qual os peptídeos são detectados novamente. Os grânulos começam, então, a surgir e a glândula torna-se totalmente regenerada por volta de 4-6 semanas. No entanto, pouco se conhece a respeito dos mecanismos moleculares que regulam a regeneração das glândulas cutâneas. Existem apenas indícios de que os hormônios tireoidianos exercem algum papel nesse processo (Danks *et al.*, 1997).

Elucidar os processos biológicos que regem a síntese e o processamento de peptídeos que compõe a secreção cutânea de anfíbios, assim como a relação desses mecanismos com o meio externo são de profunda importância para compreender o funcionamento do sistema imune inato em animais, auxiliando nas investigações que têm como objetivo a criação de estratégias que visam o controle de infecções nos mais diversos organismos. Além disto, evidenciar cientificamente o potencial biotecnológico e a importância desses animais como fonte de conhecimento pode ajudar a persuadir as autoridades competentes a preservar o habitat em que tais animais vivem, o que inclui toda a fauna e flora que os rodeiam.

3. OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivos principais investigar os processos de síntese e de processamento de peptídeos bioativos presentes na secreção cutânea de *Phyllomedusa azurea* durante a metamorfose e quando esse anfíbio responde ao contato com microrganismos; e investigar, em *Physalaemus nattereri*, o conteúdo diferencial de peptídeos nas glândulas granulares dorsais e inguinais.

Para isto, em *P. azurea*, foram realizados: 1) obtenção de um transcriptoma do tecido cutâneo de animais adultos, utilizando os métodos empregados nos sequenciadores automáticos de nova geração, com ênfase na análise de transcritos que codificam peptídeos e proteínas presentes nas secreções glandulares e de moléculas que poderiam fazer parte dos mecanismos moleculares que regulam a síntese desses peptídeos; 2) determinação da composição de peptídeos presentes nas secreções de *P. azurea* durante o processo de metamorfose, assim como do padrão de colocação de peptídeos presentes nas glândulas ao longo do tecido cutâneo; 3) análise das variações dos níveis de transcrição de genes de interesse quando *P. azurea* é submetida a diferentes condições de estresse. Ao passo que, em *P. nattereri*, foram realizados: 1) obtenção de duas bibliotecas de cDNA construídas a partir do tecido cutâneo dorsal e das glândulas inguinais; 2) mapeamento dos íons presentes nos tecidos distintos; 3) análises dos níveis de transcrição de genes de interesse.

4. MATERIAL

4.1. OLIGONUCLEOTÍDEOS

Todos os oligonucleotídeos foram dissolvidos em água *Milli-Q* de forma a obter uma concentração de uso igual a 10 µM. A Tabela 2 apresenta a sequência dos oligonucleotídeos que possuem como alvo a região 3' de RNAs ou cDNAs, assim como sua aplicação.

Tabela 2. Oligonucleotídeos complementares à região 3' de cDNAs/RNAs

Nome	Sequência (5' – 3')	Aplicação
Oligo-dT (15)	TTTTTTTTTTTTTTTT	Síntese de cDNAs visando PCR quantitativo
NOT-1-Primer	GACTAGTTCTAGATCGCGAGCGGCCGCC(T)15	Síntese de cDNA visando PCR convencional
NOT-1-Rev	TCGCGAGCGGCCGCCCTTTTT	PCR

A Tabela 3 apresenta as sequências dos oligonucleotídeos complementares à região codificadora do peptídeo sinal de pré-pró-peptídeos antimicrobianos de anfíbios anuros da família Hylidae.

Tabela 3. Oligonucleotídeos degenerados complementares à região 5' de cDNAs que codificam peptídeos antimicrobianos em Hylideos.

Nome	Sequência (5' – 3')
PPS-1	ATG GCT TTC CTG AAR AAR TCB CTT TTY CTT GTA CTA TTC CTT GS
PPS-1A	ATG GCT TTC CTG AAG AAA TCT CTT TTC CTT GTA CTA TTC CTT GG
PPS-2	ATG GCT TTC CTG AAR AAR TCB CTT TTY CTT GTA TTA TTT CTC GG
PPS-2A	ATG GCT TTC CTG AAG AAA TCT CTT TTC CTT GTA TTA TTT CTC GC

4.2. SOLUÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE RNA

Trizol LS Reagent – 100 mL (*Invitrogen*)

4.3. SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Tampão de corrida para gel de agarose (TAE) 50x:

Tris-base – 24,2% (p/v)

0,5 M EDTA – 1% (v/v)

Ácido Acético Glacial – 5,71% (v/v)

Água Milli-Q - 942,9 mL

Juntar os reagentes e autoclavar a 120 °C por 20 minutos.

Tampão para amostra:

10X *Loading Buffer* (*Invitrogen*) – utilizado em uma concentração final igual a 1X.

Solução de brometo de etídio 20.000X

Brometo de etídio – 5 mg/mL

4.4. MATERIAL E SOLUÇÕES PARA SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

Resinas *Rink-amide-MBHA* e *Wang T* (*Peptides International*[®]);

Derivados de aminoácidos 9-fluorenilmetóxicarbonil (*Peptides International*[®]);

4-metilpiperidina em dimetilformamida;

Nihidrina;

O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluorofosfato (HBTU, 0,6 mmol; 227,5 mg);

Dimetilformamida anidra;

Diisopropiletilamina;

Tioanisol;

Fenol;

1,2-etanodiol;

Triisopropilsilano;

Ácido trifluoroacético;

Éter diisopropílico gelado;

Acetonitrila 50%.

4.5. ENZIMAS

ImProm II Reverse Transcriptase (Promega)

RQ1 DNase – 1 U/μL (Promega)

Tac DNA Polymerase (Invitrogen)

4.6. KITS COMERCIAIS UTILIZADOS

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen)

Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent and Kit (Invitrogen)

Superscript Reverse Transcriptase kit (Invitrogen)

Wizard SV Gel Clean-up System (Promega)

pGEM-T Easy vector system (Promega)

Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit

4.7. SOLVENTES PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Solvente A (Polar) – água *Milli-Q* contendo ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v);

Solvente B (Apolar) – acetonitrila contendo ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v).

4.8. SOLVENTES PARA CROMATOGRAFIA EM NANO ESCALA

Solvente A (Polar) – água *Milli-Q* contendo ácido fórmico 0,1% (v/v);

Solvente B (Apolar) – acetonitrila contendo ácido fórmico 0,1% (v/v).

4.9. MICRORGANISMOS UTILIZADOS

Os microrganismos utilizados nos ensaios de estresse biótico foram isolados da pele do anfíbio anuro *Phyllomedusa distincta*, parcialmente identificados e cedidos, gentilmente, pela Universidade Católica de Brasília. São eles:

- INT69-145 – Família: Enterobacteriaceae; gênero: *Cedecea* (Gram-negativas);
Similaridade: *Enterobacter* sp. HPC64; AY996978 (1.000);

- RG-55-117 – Família: Macrobacteriaceae (Gram-positivas); Similaridade: *Clavibacter michiganensis*; PD039; AF474328 (1.000) e *Curtubacterium luteum* (T); DSM 20542; X77437 (1.000).

Escherichia coli DH5 α foi utilizada nos experimentos de biologia molecular envolvendo a transfecção de bactérias com plasmídeos de interesse.

4.10. OUTRAS SOLUÇÕES UTILIZADAS

Mistura de dNTPs

dATP (*Promega*) – 10 mM

dCTP (*Promega*) – 10 mM

dGTP (*Promega*) – 10 mM

dTTP (*Promega*) – 10 mM

IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosideo)

IPTG – 100 mM

A solução, preparada com água Milli-Q, foi esterilizada por filtração em membrana biológica contendo poros com espessura igual a 0,22 μ m (Millipore).

X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactose)

X-gal – 20 mg/ml (dissolvido em N,N-Dimetilformamida).

Ampicilina

Ampicilina – 1 g dissolvido em água *Milli-Q* foi esterilizada por filtração em membrana biológica contendo poros com espessura igual a 0,22 μ m (*Millipore*).

Matriz para ionização de peptídeos por meio de MALDI-TOF/MS

α -ciano-4-hydroxicinamico (5 mg/ml) dissolvida em acetonitrila/água/3% ácido trifluoroacético (5:4:1).

Mistura de peptídeos para calibração dos espectrômetros de massa

Para as análises realizadas em espectrômetro com fonte de ionização do tipo MALDI, foi adicionada uma solução de matriz para ionização na proporção de 1/1 (v/v) à mistura de peptídeos antes de proceder à calibração (Tabela 4).

Tabela 4. Mistura de peptídeos utilizados para a calibração do espectrômetro de massa com fonte de ionização do tipo MALDI.

Peptídeo	Massa Monoisotópica
Bradykinin(1-7) _{[M+H]⁺_mono}	757,4
Angiotensin_II _{[M+H]⁺_mono}	1046,5
Angiotensin_I _{[M+H]⁺_mono}	1296,7
Substance_P _{[M+H]⁺_mono}	1347,7
Bombesin _{[M+H]⁺_mono}	1619,8
Renin_Substrate _{[M+H]⁺_mono}	1758,9
ACTH_clip(1-17) _{[M+H]⁺_mono}	2093,1
ACTH_clip(18-39) _{[M+H]⁺_mono}	2465,2
Somatostatin(28) _{[M+H]⁺_mono}	3147,5

A calibração do espectrômetro de massa com fonte de ionização do tipo ESI (*Micro-TOF-Q*) foi realizada utilizando ESI TUNNING MIX – *Agilent Technologies*.

Condicionador para aquários de água doce

Prime Seachem - condicionador para aquários de água doce, utilizado segundo recomendações do fabricante.

Cloridrato de lidocaína

Cloridrato de lidocaína 2% sem vaso constritor - Hipolabor

Tampão TE

Tris 10 mM (pH 8 ajustado com HCl)

1 mM EDTA

5. MÉTODOS

5.1. LICENÇAS E AUTORIZAÇÕES

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Uso Animal da Universidade de Brasília (UnBDOC nº 119267/2011). Os animais necessários à execução deste projeto foram capturados conforme permissão legal (Licença número: 31066-1) cedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) após submissão e aprovação do projeto de pesquisa.

5.2. CAPTURA DOS ANIMAIS

Animais adultos, machos, da espécie *Phyllomedusa azurea* foram capturados manualmente durante o período noturno, sendo localizados por meio dos sons emitidos durante a vocalização. Após a coleta e durante o transporte, os anfíbios foram colocados individualmente em recipientes plásticos (20 x 15 cm) umedecidos. Amostras das folhagens presentes no local da coleta foram dispostas nos recipientes para forrar o fundo destes. Dois animais testemunhas foram tombados na coleção herpetológica do Laboratório de Anatomia Comparativa dos Vertebrados da Universidade de Brasília, cujos códigos de acesso são AS3051 e AS3052.

Os ninhos de *P. azurea* foram recolhidos manualmente e transportados para o laboratório de anatomia animal da Universidade de Brasília, onde permaneceram aos cuidados e foram cedidos gentilmente pelo professor da Universidade de Brasília, Dr. Antônio Sebben. Após a eclosão dos ovos, os girinos foram colocados em recipientes contendo água da torneira, previamente tratada com condicionador para aquários de água doce, a qual foi trocada a cada três dias. Os girinos foram alimentados diariamente com ração para peixes. Após o surgimento do membro anterior, os girinos foram retirados do ambiente aquático e colocados em recipiente contendo substrato sólido.

Anfíbios da espécie *P. nattereri* foram gentilmente cedidos pelo professor da Universidade de Brasília, Dr. Osmino Júnior.

5.3. OBTENÇÃO DA SECREÇÃO

A secreção cutânea dos anfíbios em diferentes estágios de desenvolvimento foi obtida com o método não invasivo e não letal de estimulação elétrica (6 V) a qual foi realizada em quatro etapas com duração de 30 segundos de estímulo. O material foi coletado com água *Milli-Q* e imediatamente congelado para liofilização.

A coleta da secreção cutânea dos animais adultos e dos girinos foi realizada utilizando-se 50 mL e 12 mL de água *Milli-Q*, respectivamente, de maneira padronizada. O estímulo elétrico dos girinos em fase de vida aquática foi realizado com estes imersos em água *Milli-Q* a qual foi recolhida para as análises. Foram obtidas secreções cutâneas de três anfíbios pertencentes a cada um dos estágios de desenvolvimento.

5.4. CROMATOGRAFIA LIQUIDA ULTRA RÁPIDA (UFLC)

As secreções cutâneas dos girinos foram submetidas à cromatografia líquida ultrarápida em UFLC modelo LC-20AD (*Shimadzu Co.*) utilizando coluna de fase reversa *Shim-pack XR-ODS 2.0 mm i.d. x 50 mm (Shimadzu Co.)*. As amostras foram dissolvidas em igual volume de água *Milli-Q* e submetidas à centrifugação por 10 minutos. Um mesmo volume de cada amostra dissolvida foi submetido ao procedimento cromatográfico cuja injeção das amostras ocorreu de maneira automática. Após equilibrar a coluna com solução 0,1% (v/v) TFA/água *Milli-Q*, as frações foram eluídas sob gradiente linear de 0,1% (v/v) TFA/acetonitrila variando de 5% a 75% em 15 minutos e 75% a 95% em 5 minutos. O fluxo foi de 0,4 mL/min. A leitura do espectro foi realizada em 216 nm e 280 nm. Em um primeiro momento, as frações foram coletadas individualmente em tubos com capacidade para 1,8 mL e secadas por centrifugação sob vácuo, visando às análises em espectrômetro de massa.

5.5. ANÁLISES DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

5.5.1. MALDI-TOF

Após a secagem, as frações cromatográficas foram dissolvidas em água *Milli-Q*. A quantidade de solução utilizada para dissolver as amostras foi ajustada de acordo com o valor da absorbância apresentada pela fração cromatográfica coletada a qual variou entre 10 a 100 μL . Em uma placa de MALDI, foram misturados 1 μL da solução correspondente à fração cromatográfica e 3 μL de matriz para ionização (ácido α -ciano-4-hydroxicinamico). A massa molecular dos peptídeos foi determinada por MALDI-TOF/MS utilizando espectrômetro de massa modelo AltoFlex Speed ou UltraFlex III (*Bruker Daltonics*) no modo refletido, controlado pelo *software FlexControl*. Os íons de interesse foram fragmentados no modo *LIFT* (MS/MS), visando o sequenciamento *de novo* de peptídeos. Antes de cada análise, o espectrômetro foi calibrado com o uso da mistura de peptídeos (Tabela 4). Os espectros foram analisados manualmente utilizando o *software FlexAnalysis* (*Bruker Daltonics*).

5.5.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS)

As secreções dos girinos foram analisadas quanto à constituição e a massa molecular dos íons presentes em cromatógrafo líquido ultra rápido acoplado ao espectrômetro de massa de alta resolução modelo *Micro-TOFQ II* (*Bruker Daltonics*), com fonte *electron spray* operando em modo positivo. Os equipamentos foram controlados pelo *software Hystar 3.2* (*Bruker Daltonics*). Foi utilizado um fluxo de 0,4 mL/min e um gradiente de acetonitrila o qual variou de 5% a 95% em 20 min. Os demais parâmetros cromatográficos foram os mesmos daqueles utilizados na cromatografia líquida ultra rápida.

A fim de comparação, secreções cutâneas de anfíbios adultos capturados em ambiente nativo foram utilizadas nas análises. A quantidade da secreção utilizada foi igual à media aritmética do valor da concentração da secreção cutânea dos anfíbios no estágio 46 de desenvolvimento. Para a quantificação das amostras, foi utilizado o método de quantificação descrito por Murphy e Kies (1960).

5.6. PROTEÔMICA DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE *P. azurea*

A secreção cutânea de oito animais adultos foi misturada e 50 µg dessa solução foram submetidos a procedimentos de redução, alquilação e digestão enzimática com tripsina após tratamento com *RapiGESTM* (Waters Co.), segundo sugestões do fabricante. Os peptídeos tripticos foram separados por cromatografia líquida em nano escala utilizando um cromatográfico modelo *nanoACQUITY TM system* (Waters Co.) equipado com uma coluna analítica de fase reversa *nanoEaseTM BEH130 C18* (Waters Co.). As soluções cromatográficas utilizadas foram 0,1% (v/v) ácido fórmico/água *Milli-Q* e 0,1% (v/v) ácido fórmico/acetonitrila. Gradiente de 3-40%, 40-60% e 60-95% da solução 0,1% (v/v) ácido fórmico/acetonitrila foram empregados na separação dos peptídeos em um fluxo de 600 nL/min.

As frações eluídas foram analisadas em espectrômetro de massa modelo *Synapt G2 HDMSTM* (Waters Co.), acoplado ao cromatógrafo líquido, com fonte de ionização *nano elétron spray* operando em modo positivo. Os dados de MS e MS/MS obtidos foram processados e os peptídeos e proteínas foram identificados utilizando o *software ProteinLynx Global Server* (PLGS) *version 2.5* (Waters Co.) o qual empregou o banco de dados que foi construído a partir do sequenciamento automático de nucleotídeos isolados do tecido cutâneo de *P. azurea*.

5.7. SÍNTESE MANUAL E PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Os peptídeos foram sintetizados seguindo o modelo convencional de síntese em fase sólida F-MOC, originalmente proposto por Merrifield em 1963 (Fields & Noble, 1990).

Os peptídeos amidados e não amidados foram sintetizados utilizando as resinas do tipo *Rink-amide-MBHA* (*Peptides International*®, 200-400 Mesh, grau de substituição 0,37 meq/grama; 0,15 mmol; 405,5 mg) e *Wang T* (*Peptides International*®, 200-400 Mesh, grau de substituição 0,59 meq/grama; 254,2 mg). Os grupos protetores foram removidos por reação com 4-metilpiperidina 20% em dimetilformamida. A desproteção foi averiguada qualitativamente pelo teste de Kaiser, que avalia a disponibilidade do grupo amina-terminal pela reação com níhidrina. Os derivados de aminoácidos 9-fluorenilmetóxicarbonil (*Peptides International*®), adicionados à resina em excesso molar (quatro vezes), foram ativados *in situ* por O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluorofosfato (HBTU, 0,6 mmol; 227,5 mg) na presença de dimetilformamida anidra e diisopropiletilamina (1,1 mmol; 187 µL) e deixados reagir por 1 hora sob agitação à temperatura ambiente. Os peptídeos foram liberados da resina, bem como os grupos protetores das cadeias laterais dos peptídeos foram removidos, simultaneamente, por clivagem ácida. Os peptídeos foram clivados na seguinte condição: água (500 µL), tioanisol (500 µL), fenol (500 µL), 1,2-etanodiol (250 µL), triisopropilsilano (100 µL) e ácido trifluoroacético (9,4 mL). A reação foi executada à temperatura ambiente sob agitação por 1,5 horas em capela. Em seguida os peptídeos foram precipitados em éter diisopropílico gelado, e retidos como resíduo em filtração. Subsequentemente, os peptídeos foram solubilizados em acetonitrila 50%, separados da resina por filtração, e o filtrado foi liofilizado.

5.8. DISSECÇÃO DA PELE

Os anfíbios foram eutanasiados por infusão de solução de cloridrato de lidocaína 2% líquida em excesso (aproximadamente 100 µL) diretamente no cérebro, com o auxílio de uma seringa com capacidade para 1 mL acoplada a agulha, segundo recomendações de Sebben (2007). O tecido cutâneo dorsal foi isolado com o auxílio de pinças e tesouras. Os tecidos dissecados visando o isolamento de RNA foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C.

5.9. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS BIOATIVOS APÓS ESTÍMULO ELÉTRICO

Anfíbios da espécie *P. azurea* foram submetidos previamente à extração/coleta da secreção cutânea, com o objetivo de depletar o conteúdo peptídico de suas glândulas granulares. Os animais foram colocados juntos em cativeiro não esterilizado e após períodos de tempos experimentais pré-determinados, as peles dos animais foram isoladas. Os tempos experimentais foram: imediatamente após a extração da secreção cutânea (tempo zero), 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas e 72 horas após. Dois grupos controle foram constituídos por animais que não foram submetidos à extração da secreção cutânea. Os animais do grupo controle I sofreram os mesmos procedimentos executados nos grupos experimentais antes do início dos experimentos, ao passo que, os do grupo controle II permaneceram em cativeiro e sofreram os mesmos procedimentos no último dia de experimentos. Os tecidos cutâneos isolados foram utilizados para extração do RNA total visando experimentos de expressão relativa de genes por meio de PCR quantitativo - porção esquerda do tecido - e para análise dos componentes moleculares por meio de espectrometria de massa (MALDI – *Imaging*) - porção direita do tecido. Cada grupo, experimental e controle, foi constituído por três animais.

5.10. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE GENES INDUZIDOS POR SIMULAÇÃO DE ESTRESSE BIÓTICO

Anfíbios da espécie *P. azurea* foram separados em dois grupos experimentais e um grupo controle. Cada grupo abrangeu três animais, os quais foram submetidos previamente à extração/coleta da secreção cutânea com o objetivo de esvaziar suas glândulas granulares quanto ao conteúdo proteico. Os animais foram colocados individualmente em recipientes plásticos (20 x 15 cm) previamente lavados com solução NaOH, enxaguados com etanol 75% e esterilizados por meio de exposição à luz ultravioleta por 20 minutos. Os animais dos grupos I e II foram submetidos a banhos, a cada quatro horas, com 1 mL de solução contendo microrganismo Gram negativo (INT69-145) e Gram-positivo (RG 55-117), respectivamente. O grupo controle foi constituído por anfíbios que foram submetidos a banhos com 1 mL de solução NaCl 0,6% nos mesmos intervalos de tempo. Após 24 horas, os tecidos dorsais dos animais foram dissecados e submetidos à extração de RNA total, visando experimentos de expressão relativa de genes por meio de PCR quantitativo - porção esquerda do tecido - e à análise dos componentes moleculares por meio de espectrometria de massa (MALDI – *Imaging*) - porção direita do tecido.

5.11. CULTIVO DE MICRORGANISMOS E PREPARO DAS SOLUÇÕES VISANDO OS ENSAIOS DE ESTRESSE BIÓTICO

As bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (Item 4.9) foram inoculadas em 12 mL de meio líquido R2A à temperatura ambiente por 24 horas em agitador horizontal. Ao alcançarem a $OD_{600} = 0,6$ estas foram centrifugadas por 10 min. a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de bactérias foi dissolvido em 12 mL de solução NaCl 0,6%. Esse procedimento foi repetido por três vezes e após a terceira lavagem o precipitado foi dissolvido em 12 mL de solução NaCl 0,6 % para ser utilizado nos ensaios de estresse biótico.

5.12. EXPRESSÃO DIFERENCIAL NAS GLÂNDULAS GRANULARES DORSAIS E INGUINAIS DE *P. nattereri*

Os tecidos que compreendem as glândulas granulares dorsais e inguinais de *P. nattereri* foram isolados e submetidos, separadamente, à construção de uma biblioteca de cDNA, ao mapeamento de íons por MALDI-*Imaging* e à determinação dos níveis de transcrição de genes de interesse por PCR em tempo real.

5.13. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA A PARTIR DO TECIDO CUTÂNEO DE *P. nattereri*

Os tecidos de interesse foram submetidos à extração do RNA total do qual 1 µg foi utilizado como molde para a síntese da primeira fita de cDNA, utilizando o *kit Superscript Reverse Transcriptase (Invitrogen)*, segundo as normas do fabricante. A síntese da segunda fita de cDNA foi realizada a partir de reações em cadeia da polimerase (PCR) do tipo 3'RACE utilizando os oligonucleotídeos apresentados na Tabela 3 e o oligonucleotídeo reverso NOT-1-Rev (Tabela 2). Os ciclos de temperatura foram: quatro ciclos de 94°C/30s e 72°C/120s; 5 ciclos de 94°C/30s e 68°C/120s; e 25 ciclos de 94°C/30s, 65°C/30s e 68°C/120s. Após a PCR, as soluções foram analisadas por eletroforese em gel de agarose e os fragmentos contendo 300-400 pb foram purificados utilizando *Wizard SV Gel Clean-up System (Promega)*, de acordo com instruções do fabricante. Os fragmentos purificados foram ligados em vetor plasmideal utilizando *pGEM-T Easy vector system (Promega)*, segundo as instruções do fabricante. As soluções foram, então, submetidas à transfecção por eletroporação em *Escherichia coli* (DH5α), as quais foram inoculadas em meio seletivo LBA por 16 horas à 37 °C. Os clones de interesse foram submetidos ao crescimento em meio LB líquido 16 horas à 37 °C sob agitação e o DNA plasmideal foi purificado e submetido ao sequenciamento automático de nucleotídeos.

5.14. ISOLAMENTO DO RNA TOTAL

Os tecidos foram pulverizados em nitrogênio líquido com o auxílio de pistilo e cadinho. Aproximadamente 10 mg dos tecidos pulverizados foram utilizados para a extração do RNA total, utilizando o reagente Trizol (*Invitrogen*), de acordo com as normas do fabricante. A integridade do RNA extraído foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%. O RNA total extraído foi submetido a um tratamento com RQ1 DNase (*Promega*) de acordo com as normas do fabricante. O RNA total foi, então, quantificado em espectrofotômetro do tipo *NanoDrop*, modelo ND 1000 (*Uniscience*), e armazenado a – 80 °C.

5.15. ANÁLISE DE RNA TOTAL EM GEL DE AGAROSE

O gel de agarose foi preparado com tampão TAE 1X em concentração igual a 1% (p/v). Brometo de etídeo foi adicionado em uma concentração igual a 0,5 µg/mL. As amostras aplicadas no gel foram misturadas com o tampão para amostra 10X *Loading Buffer* (*Invitrogen*) em uma concentração final igual a 1X e submetidas à eletroforese em tampão TAE 1X. O RNA foi visualizado com a utilização de um transiluminador de luz ultravioleta.

5.16. SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO DE NUCLEOTÍDEOS

5.16.1. *P. azurea*

O tecido cutâneo de oito espécimes de *P. azurea* foi utilizado para a obtenção de 150 µg de RNA total o qual foi quantificado por *Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent and Kit* (*Invitrogen*), segundo normas do fabricante, e sua integridade checada por eletroforese em gel de agarose 1%. Após o RNA ser dissolvido em 50 µL de tampão TE, este foi entregue aos cuidados da empresa 454 *Life Science/Roche* (EUA) para os procedimentos de sequenciamento de transcritos em plataforma do tipo GS-FLX.

Utilizando o *software Geneious*, o banco de dados gerado foi submetido a buscas de transcritos que compartilham similaridade com a estrutura daqueles que codificam peptídeos já caracterizados a partir da secreção cutânea de *P. azurea*. Tanto a estrutura da região do peptídeo sinal, quanto a região do peptídeo maduro foram utilizadas nessas buscas. Posteriormente, foi realizada uma montagem automática dos *contigs*, utilizando o programa *DNASTar*.

5.16.2. *P. nattereri*

Amostras de DNA plasmideal contendo os fragmentos de PCR produzidos a partir do RNAm de *P. nattereri* foram submetidas à reação de sequenciamento com *Big Dye Terminator (Applied Biosystems)* em sequenciador automático de nucleotídeos modelo *3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems)*, de acordo com o fabricante. Os oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR visando o sequenciamento foram o *M13 Forward Primer* ou *M13 Reverse Primer*. As análises das sequências de nucleotídeos obtidas foram realizadas utilizando os programas *EditSeq* e *SeqMan (DNASTAR)*.

5.17. DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

As sequências nucleotídicas de interesse, determinadas pelos sequenciamentos automáticos, foram utilizadas como molde para o desenho e síntese de oligonucleotídeos específicos visando ensaios de expressão relativa de genes realizados por meio de PCR em tempo real, utilizando o *software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems)*.

Foi realizado o experimento para determinação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos sintetizados. Para isto, foram realizadas diluições seriadas (razão 1:10) de soluções contendo o cDNA sintetizado a partir do RNA total de *P. azurea* ou *P. nattereri*. As amostras foram submetidas a ensaios de qRT-PCR realizados em um *7500 Fast Real-Time*

PCR System (Applied Biosystems), no modo *Absolute quantification*. *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX* (Invitrogen) foi utilizado no preparo das reações, de acordo com o fabricante. As reações foram montadas em triplicata e as análises foram realizadas utilizando o programa *7500 software v2.0.6*.

5.18. ENSAIOS DE EXPRESSÃO RELATIVA POR MEIO DE PCR EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

Um miligrama de RNA total foi submetido à síntese de cDNA com a enzima *ImProm II* (Promega), segundo as normas do fabricante, utilizando o oligonucleotídeo oligo-dT (15) (Tabela 2). Uma fração deste foi diluída em água *Milli-Q* (1:30). Esta solução foi utilizada como *template* nos ensaios de PCR em tempo real, realizados em um *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), no modo *Relative Quantification Plate*. *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX* (Invitrogen) foi utilizado no preparo das reações, de acordo com o fabricante, em conjunto com os oligonucleotídeos específicos para transcritos de RNAs de interesse.

A expressão do gene que codifica a proteína actina em *P. azurea* foi utilizada como um normalizador para esta espécie de anfíbio, ao passo que, a expressão do gene que codifica a proteína actina em *Hypsiboas punctatus* foi utilizada como um normalizador em *P. nattereri*. Ao término de cada reação, procedeu-se o ciclo de dissociação para verificação da especificidade dos oligonucleotídeos. O valor dos níveis de transcrição de cada precursor analisado foi definido a partir da média de três repetições. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas de acordo com o manual sugerido pela *Applied Biosystems*.

5.19. IMAGEM POR ESPECTROMETRIA DE MASSA (IMS)

Após a dissecação, os tecidos visando experimentos de IMS foram devidamente esticados em lâminas de vidro para secagem à temperatura ambiente. Após a secagem, os

tecidos foram fixados em placa de MALDI utilizando fita adesiva dupla-face (com exceção dos tecidos cutâneos dos girinos, os quais foram colocados diretamente na placa de MALDI para a secagem). Uma fina camada de matriz para a ionização de peptídeos e proteínas foi depositada sobre os tecidos de maneira uniforme com o auxílio de micropipeta manual. Após 60 minutos de secagem, as amostras foram submetidas à análise em espectrômetro de massa *UltraFlex III TOF/TOF (Bruker Daltonics)* no modo refletido (*P. azurea*) ou linear (*P. nattereri*). A varredura automática das amostras e a aquisição dos dados foram controladas com o *software FlexImaging (Bruker Daltonics)*, ajustado para rastrear as áreas determinadas em passos únicos de 200 µm, com 50 disparos em cada posição e laser com intensidade igual, ou aproximada, a 30%. O mapeamento foi ajustado para a detecção dos componentes com razão *m/z* entre 600 e 5000. A calibração do espectrômetro foi realizada utilizando uma mistura de peptídeos, cujas massas moleculares se encontram na tabela 4, da qual foi depositada uma alíquota sobre o tecido a ser analisado. A análise das imagens obtidas foi realizada utilizando o *software FlexImaging (Bruker Daltonics)*.

5.20. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLOCALIZAÇÃO APRESENTADA PELOS ÍONS PRESENTES NO TECIDO CUTÂNEO de *P. azurea*

Após a varredura dos tecidos e obtenção dos espectros de massa inerentes à técnica de MALDI-*Imaging*, foi originada uma figura para cada íon identificado. As áreas compartilhadas pelos íons foram mensuradas utilizando o *software ImagJ*. Com este, cada figura que representa a área ocupada por um determinado íon foi sobreposta a cada uma das outras figuras que representam os demais íons identificados no tecido de interesse. Para cada par de figuras analisadas foi gerada uma nova figura contendo apenas as eventuais áreas em comum entre elas. Dessa maneira, essa nova figura representa a área em comum ocupada por dois íons no mesmo tecido, ou seja, a colocalização apresentada por eles. O mesmo *software* foi utilizado para mensurar os pixels contidos nessa figura, atribuindo um valor o qual foi

normalizado pela área total analisada em cada tecido. A média aritmética dos valores de colocação apresentados por cada par de íons das triplicatas foi calculada. Os resultados foram dispostos em uma matriz ordenada de acordo com o valor m/z do íon, começando pelo de menor massa. Com o objetivo de facilitar a visualização dos resultados, essa matriz foi utilizada para a construção de um gráfico de intensidade.

6. RESULTADOS

6.1. TRANSCRIPTOMA DO TECIDO CUTÂNEO DE *P. azurea*

Os tecidos cutâneos (patas, dorso e ventre) de oito animais machos da espécie *P. azurea* foram isolados e submetidos aos procedimentos visando à extração de RNA total a partir do qual foram gerados os dados de transcriptoma, utilizando os métodos empregados nos sequenciadores automáticos de nucleotídeos de nova geração (pirossequenciamento – 454).

Foram geradas 615 mil sequências de nucleotídeos. Em uma primeira tentativa de montagem dos *contigs*, utilizou-se como referência o banco de ESTs gerado a partir dos RNAs mensageiros isolados do anuro *Xenopus laevis*, disponível nos bancos de dados. No entanto, menos de 1000 montagens foram geradas. Dessa maneira, outros métodos estão sendo avaliados com o objetivo de aperfeiçoar as montagens.

Como a abordagem principal desse trabalho diz respeito aos peptídeos presentes na secreção cutânea de *P. azurea*, foram empregadas buscas por similaridade no banco de dados gerado. Estas foram realizadas utilizando-se como molde de procura, tanto a estrutura do peptídeo sinal de pré-pró-peptídeos, quanto a estrutura de peptídeos maduros já descritas em anfíbios.

O método empregado mostrou-se satisfatório, permitindo a identificação de 72 precursores distintos que apresentam similaridades com moléculas, em sua maioria, já descritas em anfíbios (Tabela 5). Dentre estas, oito análogos de bradicininas, 10 análogos de dermaseptinas, um análogo de dermorfina, 16 análogos de inibidores enzimáticos, um análogo de peptídeo opióide, seis análogos de filoseptinas, um análogo de sauvatídeo (peptídeo miotrópico isolado da secreção cutânea de *Phyllomedusa sauvagei* (Wang, Zhou, Zhou, *et al.*, 2009), três análogos de triptofilinas, além de 26 sequências contendo a estrutura de pré-pró-

peptídeos de anfíbios anuros, cujo peptídeo maduro não apresenta similaridade com aqueles presentes nos bancos de dados, dentre estes sete peptídeos contendo cisteínas. Além das estruturas já mencionadas, as quais estão relacionadas com moléculas já descritas em secreções de anfíbios, durante as buscas manuais, foi possível a identificação de quatro outros precursores: três homólogos a proteínas secretórias ricas em cisteínas (CRISP) e uma proteína S-100.

Tabela 5. Lista dos precursores contendo similaridades a peptídeos descritos em anfíbios anuros, caracterizados a partir do transcriptoma de *P. azurea*. Os precursores foram traduzidos *in silico*. As interrogações representam ambiguidades não resolvidas nos respectivos códon. As áreas sublinhadas indicam a região do peptídeo maduro.

Nome	Sequência do precursor	Número de reads	Similaridade/ organismo	Cobertura	Identidade	E-value
Bradicinina 1	MSFLKKSFLVLFGLVVSFSICEEEKRETEEEENEDE IEEESEEKKRFE <u>PVPPGFTPF</u> RFQS	3	[Val1, Thr6]-bradykinyl-Gln, Ser/ <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	100%	100%	0,002
Bradicinina 2	MAFLKKSFLVLFGLVVSISFCDEEKRQDDDEASERE EKKEIHEEGNQEEERA <u>VPPPLDG</u>	1	—	—	—	—
Bradicinina 3	MAFLKKSFLVLFGLVVSISFCDEEKRQDDDEASERG EKKEIHEEGNQEEERR <u>AVPPLGWMK</u> KRKME	1	Taste receptor type 2 member 7-like/ <i>Sorex araneus</i>	69%	100%	0,31
Bradicinina 4	MAFLKKSFLVLFGLVVSISFCDEEKRQDDDEASERE EKKEIHEGNQEERR <u>VPPQGW</u> MK KENGITLRSITLSN GAKID	1	Tryptophyllin/ <i>Phyllomedusa nordestina</i>	87%	100%	24
Bradicinina 5	MDFLKKSFLVLFGLVVSISLCDEEKREEDDDEGNES EEEKEIQER <u>VPPGYSQNPWG</u> KK	2	—	—	—	—
Bradicinina 6	MSILKKSFLVLFGLVVSFSICEEEKREAEENEDE IEEESDEKKR <u>ESPDRPPVQS</u> FR <u>Y</u>	1	Phyllokininogen-1/ <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	100	73	0,011
Bradicinina 7	MSFLKKSFLVLFGLVVSFSICEEEKRETEEEENEDE IEEESEEKKREDPE <u>RPPGFTPF</u> RIY	7	[Thr6]-phyllokinin/ <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	100%	100%	3,00E-04
Bradicinina 8	MAFLKKSFLVLFGLVVSISFCDEEKRQDDDEASERE EKKEIHEGNQEERR <u>VPPQGW</u> MK KRKME	1	Taste receptor type 2 member 7-like/ <i>Sorex araneus</i>	61%	100%	2,9
Bradicinina 9	MSFLKNSLLLVLFLGLVVSFSICEEEKRENEEEENEDE IEEQSEEKKR <u>IVELDPGFTPF</u> RRP	3	—	—	—	—
Dermaseptina 1	MAFLKKSFLVLFGLVVSISICEEEKRENEDEEKQED DEQSEMKR <u>ALWKDVLK</u> KIGTVALHAGKAAF <u>GAAADTI</u> <u>SQGES</u>	3	Dermaseptin-3/ <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	100%	100%	3,00E-11
Dermaseptina 2	MALLKKISFSLYSLDWFPPSVKKRREKMKMRRNKK DDEQSEMKR <u>ALWKDVLK</u> KIGTVALHAGKAAF <u>GAAADTI</u> <u>ISQ</u> GG S	2	Dermaseptin-3/ <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	100%	100%	3,00E-11

Dermaseptina 3	VLFLGLVLSLSICEEEKRENEDEEKQEDDEQSEMKR <u>AL</u> <u>WKDVLKNRNSGFTCRKSGFWCCR</u>	1	—	—	—	—
Dermaseptina 4	MAFLKKSFLVFLVFLGMVLSLSICEEEKRENEDEEKQED DEQSEMKR <u>GLWSTIKNVATAAGKAVLGAL</u> GEQ	1	<i>Dermaseptin-like peptide 3/ Phyllomedusa azurea</i>	100%	92%	5,00E-12
Dermaseptina 5	MAFLKKSFLVFLVFLGMVLSLSICEEEKRENEDEVEEQED DEQSEMKR <u>GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNSA</u> <u>SEAI</u> GEQ	5	<i>Dermaseptin-6/ Phyllomedusa hypochondrialis</i>	100%	94%	0,003
Dermaseptina 6	MAFLKKSFLVFLVFLGMVLSLSICEEEKRENEDEEEQED DEQSEMKR <u>GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL</u> GEQ	5	<i>Dermaseptin-01/ Phyllomedusa oreades</i>	100%	97%	3,00E-18
Dermaseptina 7	MAFLKKSFLVFLVFLGMVLSLSICEEEKRENEDEEEQED DEQSEMKR <u>GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAAFRC</u> <u>RGAI</u> SIK	2	<i>Dermaseptin-like peptide 5/ Phyllomedusa azurea</i>	58%	81%	0,35
Dermaseptina 8	MAFLKKSFLVFLVFLGMVLSLSICEEEKRENEDEELQED DEQSEMKR <u>GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL</u> GEQ	8	<i>Dermaseptin-1/ Phyllomedusa hypochondrialis</i>	100%	100%	2,00E-15
Dermaseptina 9	KSLFLVFLVFLVFLVLSVCEEEKRENEDEEEQEDDEQSE MKR <u>GLWSKIKAVAAAAGKAALGAVNEAL</u> GEQ	1	<i>Dermaseptin-like peptide 2/ Phyllomedusa azurea</i>	100%	96%	2,00E-14
Dermaseptina 10	MAFMKKSFLVFLVFLGLVLSLFCDEKRENEDEEGQED DEQSEEKR <u>GLWKLLAKGAGKMLGHVASKILGPK</u> GQPE S	2	<i>Dermaseptin-3/ Phyllomedusa tarsius</i>	92	74%	8,00E-04
Dermorfina 1	MSFLKKSLLLILFLGLVLSLSICKEKRENEEENENEEN HEEESEMKR <u>YAFGYPS</u> GEAKMKRETEEENENEENHE EESEMKR <u>YAFGYPS</u> GEAKMKRETEEENENEENHEEE SEMKR <u>YAFGYPS</u> GEAKKKL	12	<i>Dermorphin/ Phyllomedusa hypochondrialis</i>	100%	100%	30
Inibidor Enzimático 1	MKTLISSALLFCVLAVALWPVPEAEAEAEAGE <u>VEKLY</u> <u>CPWYYYFGCFDVNHVCGTDGNTYRSRCWLCRENRFRL</u> <u>MC</u>	1	<i>pancreatic secretory trypsin inhibitor/ Condylura cristata</i>	92%	53%	0,005
Inibidor Enzimático 2	MKTLISFALLFCVLAALWPVPEAEA <u>VTEPKCDKNAD</u> <u>MCTEDYRPVCGTNGKYSNECQLCLHNKKLGKKLKL</u> <u>IKVNASLKSWSFRC</u>	8	<i>proteinase inhibitor PSKP-1/ Phyllomedusa nordestina</i>	73%	71%	4,00E-15

Inibidor Enzimático 3	<u>MKTLISFALLFCILAAALWPVPEAEGATAPKCNSEAT</u> <u>GCNRMYPVCGTNGEKYNNECELCRYNSENKHKVKIA</u> <u>YKGECKT</u>	10	<i>proteinase inhibitor</i> <i>PSKP-1/</i> <i>Phyllomedusa</i> <i>nordestina</i> <i>Pancreatic</i>	96%	54%	1,00E-09
Inibidor Enzimático 4	<u>MKTLISSALLFCILAAVLWPVPEAEGATKPKCPWFSS</u> <u>GCPSEQNFVCGTDGRSYMNECVMC TWNKNHGAKVKIE</u> <u>KRVIVLCS EDIRKRKINLMKNKPCAIQCTDMFQ</u>	1	<i>secretory trypsin</i> <i>inhibitor II/ Rattus</i> <i>norvegicus</i>	59%	44%	3,00E-07
Inibidor Enzimático 5	<u>MKTLISFALLFSMLATVLAPPPSQPF EKL VFTKITEP</u> <u>DCKRYEGKKCP LHKSPVCGTDERTYYNECALCVFIRT</u> <u>STKKKDKLIKIGKWEACRKTIPYIK</u>	2	<i>Proteinase inhibitor</i> <i>PSKP-1/</i> <i>Phyllomedusa</i> <i>nordestina</i> <i>Pancreatic</i>	100%	100%	5,00E-34
Inibidor Enzimático 6	<u>MKTLISSALLFCILAAALWPVPEAEGAKEPECSKYS P</u> <u>EEKCPLAIDPVC GSDGRSYSNECAMCLHMRQSKKKLO</u> <u>IKKEGKC</u>	10	<i>secretory trypsin</i> <i>inhibitor-like/</i> <i>Alligator sinensis</i>	100%	47%	7,00E-10
Inibidor Enzimático 7*	<u>MKTLISFALLFCVLAALWPVPEAEA VTEPKCDKNAD</u> <u>MCTEDYRPVCGTNGKKYSNECQLCLHNK</u>	1	<i>Proteinase inhibitor</i> <i>PSKP-1/</i> <i>Phyllomedusa</i> <i>nordestina</i>	100%	82%	1,00E-12
Inibidor Enzimático 8	<u>MKTLISSALLFCVLAVALWPVPEAEAEAEAGEVEKLY</u> <u>CPWY YFGCFDVNHVCGTDGNTYRSRCWLCRENRFK</u> <u>KNVQIRKWSDC</u>	2	<i>Serine protease</i> <i>inhibitor Kazal-type</i> <i>3-like/Xenopus</i> <i>(Silurana) tropicalis</i>	78%	51%	7,00E-06
Inibidor Enzimático 9	<u>MKTLISSALLFCILAAALWPVPEAEAE EEEKLYCPWY</u> <u>YAFGCFDNNPVC GKD GATYSNKCALCTLNKYRTEKVE</u> <u>FKKWGSC</u>	4	<i>Serine protease</i> <i>inhibitor Kazal-type</i> <i>3-like/Xenopus</i> <i>(Silurana) tropicalis</i> <i>Pancreatic</i>	96%	45%	2,00E-06
Inibidor Enzimático 10	<u>MKTLISSALLFCVLAALWPVPEAEGATAPKCNSEAT</u> <u>GCNRMYPVCGTNGEKYNNECELCRYNSENKHKC</u>	1	<i>secretory trypsin</i> <i>inhibitor/ Felis catus</i>	97%	62%	3,00E-07
Inibidor Enzimático 11	<u>MKTLISSALLFCILAAALWPVPEAEGATAPKCNSEAT</u> <u>GCNRMYPVCGTNGEKYNNECELCRYNSENKKNVKIA</u> <u>YKGECKT</u>	6	<i>Proteinase inhibitor</i> <i>PSKP-1/</i> <i>Phyllomedusa</i> <i>nordestina</i>	96%	56%	2,00E-10
Inibidor Enzimático 12	<u>MKTLISSALLFCVLAALWPVPEAEA IIEPKCSRYP S</u> <u>ICTFGPNAVCGTDGKKYFN ECTLCVINRKNKGKVKIE</u> <u>KYGAC</u>	2	<i>Proteinase inhibitor</i> <i>PSKP-1/</i> <i>Phyllomedusa</i> <i>nordestina</i>	100%	50%	8,00E-07

Inibidor Enzimático 13	<u>MKTLISSALLFCVLAVALWPVPEARSRSRSTRGRKSC</u> <u>TVRGIINFGCFDVNHVCGTDGNTYRSRCWLCRENRF</u> <u>KKNVQIRKWSDC</u>	2	<i>Serine protease inhibitor Kazal-type 3-like/Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	76%	51%	6,00E-06
Inibidor Enzimático 14	<u>MKTLISSALLFCILAAALWPIPEAEGLFCPVHYYWFG</u> <u>CYGNNPVCATDGQTYRSACHVCLVNKNEGKDLSTKL</u> <u>GSC</u>	1	<i>Serine protease inhibitor Kazal-type 2/Alligator sinensis</i>	90%	48%	2,00E-04
Inibidor Enzimático 15	<u>MKTLISSALLFCILAAALWPIPEAEGLFCPGYYYWFG</u> <u>CYGNNPVCATDGQTYRSACHVCLVNKNEGKDLSTKL</u> <u>GSC</u>	1	<i>Serine protease inhibitor Kazal-type 2/Alligator sinensis</i>	90%	48%	2,00E-04
Inibidor Enzimático 16	<u>MQGPHYFLFCMVHLVTALTDEEKKTIVETHNLYRSQV</u> <u>DPTAADMKALRWKSLLEDLATSAAKCIWDHNEERGH</u> <u>RGENLFIMSGSPLDVKMGMEDWHRELNYNFTTDTC</u> <u>EDKMCGHYTMVWAETERVCGGESFCEKLEGFDES</u> <u>NMFILVCNYEPPGNFRGEKPYTPGEPSCSPSTYICRDS</u> <u>LCVVDNEDSEHHPTRKPVATTEASTAQSGRQGTQGI</u>	6	<i>Peptidase inhibitor 16/Otolemur garnettii</i>	95%	53%	1,00E-71
Opióide 1	<u>MSFLKKSLLLVLFLGLVSFSISEEEKRETKEEENEDK</u> <u>IEEENEVKKRQQGEGGPGYGLSPLRFS</u>	2	<i>Bioactive peptide 1/Phyllomedusa hypochondrialis</i>	100%	100%	5,00E-09
Filoseptina 1	<u>MAFLKKSFLVLFLGLVSLSCIEEEKRETEEEENDQE</u> <u>EDDKSEEKRFLSLLPSLVSGAVSLAKKLG</u>	4	<i>Phylloseptin-12/Phyllomedusa azurea</i>	100%	95%	7,00E-08
Filoseptina 2	<u>MAFLKKSFLVLFLGLVSLSCIEEEKRETEEEENDQE</u> <u>EDDKSEEKRFLSLLPSLVSGAVSLAKN</u>	3	<i>Phylloseptin-12/Phyllomedusa azurea</i>	94%	94%	1,00E-05
Filoseptina 3	<u>MAFLKKSFLVLFLGLVSLSCIEEEKRETEEEKENEQE</u> <u>DDKSEEKRFSLIPHAINAVSAIAKHFG</u>	16	<i>Phylloseptin-7/Phyllomedusa azurea</i>	100%	100%	1,00E-10
Filoseptina 4	<u>MAFLKKSFLVLFLGLVSLSCIEEEKRETEEEYNYQG</u> <u>EDDKSEEKRFSLIPHAINAVSTLVHFFG</u>	15	<i>Phylloseptin-2/Phyllomedusa azurea</i>	100%	100%	3,00E-11
Filoseptina 5	<u>MAFLKKSFLVLFLGFVSFSICQEEKRETEEEENEQE</u> <u>DDDSEEKRFSLIIPAAISAVSALANHF</u>	2	<i>Phylloseptin-14/Phyllomedusa azurea</i>	100%	95%	8,00E-10
Filoseptina 6	<u>MSFLKKSFLVLFLGFVSLSICIEEEKRESEEKENEQE</u> <u>DDREERSEEKRLGMIIPVAISALS</u> <u>SKLG</u>	2	<i>Phylloseptin-s5/Phyllomedusa sauvagii</i>	100%	100%	1,00E-08
Sauvatídeo 1	<u>MAFLKKSFLVLFLGFVSISFCDEEKRQDDDEANESE</u> <u>EKKDIHEVEKRLRPAILVRVKGKGLGK</u>	1	<i>Sauvatide/Phyllomedusa</i>	81%	92%	0,048

		<i>sauvagii</i>				
Triptofilina 1	MDFLKKSLFVLVFLGLVSI SFCDEEKKQEDDEENERK EKREK <u>FPPWL</u> GEKREI <u>FPPWL</u> GEKREA <u>FPPWL</u> GEKRE I <u>FPPWL</u> GKK	4	<i>Tryptophyllin-14/ Phyllomedusa centralis</i>	80%	100%	14
Triptofilina 2	MDFLKKSLFVLVFLGLVSI SFCDEEKKQEDDEENERK EKREK <u>FPPWL</u> GEKREI <u>FPPLAW</u> RKKRS <u>FPPLAW</u> GEKR EI <u>FPPWL</u> GKK	3	<i>Tryptophyllin-14/ Phyllomedusa centralis</i>	80%	100%	14
Triptofilina 3	MDFLKKSLFVLVFLGLVSI SFCDEEKKQEDDEENERK EKREK <u>FPPWL</u> GEKREI <u>FPPWL</u> GEKREA <u>FPPWL</u> GEKRE I <u>FPPWL</u> GEKRG TGSRKRT	50	<i>Tryptophyllin-14/ Phyllomedusa centralis</i>	80%	100%	14
CRISP1	<u>MVLYSAALTDEQIAAVNTDLESVQKEIVDLVNNCRK</u> <u>VEPTACDMLLVEWNEAAETAKKVS AKCTMTHSDVSE</u> <u>RTISGNEKCGETLFSITSAATWKDAIGAF CNEKYNFK</u> <u>FGETPTGVTGHFTQTCWYKSYKMGCHARYCPSEGRIF</u> <u>FVCHQCPQGNINGGOYSVQKPWTPGEACGRCPNNCND</u> <u>GLCTNPCKHDDDY TTCQSLKNSCYVDAVKYGCKGSCQ</u> <u>CINNEII</u>	32	<i>Cysteine-rich secretory protein/ Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	99%	43%	6,00E- 48
CRISP2	<u>MWAF T LCLSSMVLYSAALTDEQIAAVDTDLESVQQKI</u> <u>VALVND CRRKVEPTACDMLLVEWNEAAETAKKVS AK</u> <u>CTMTHSDV SERTISGNVKCGESLFS TTSVAKWEDAIG</u> <u>AFCNEK?DFKFGDEPTGVTGHFTQTCWYKSYKMGCHA</u> <u>RYCPSEGR TFFVCHQCPQGNINGGOYSVQKAMDAW</u>	5	<i>Cysteine-rich secretory protein Ts-CRPYb/ Trimeresurus stejnegeri</i>	91%	49%	1,00E- 34
CRISP3	<u>MWAPT NLI GCYLAECPNGPAKYNVCHCCPGGNGSV</u> <u>NWPWEEGNACEACPNACENK LCTNPCPYQNDYNGCDK</u> <u>AKNRCSTEI SMKKN CAGSCLCTKGEIK</u>	19	<i>Cysteine-rich venom protein-like/ Chelonia mydas</i>	100%	53%	2,00E- 19
S100	<u>MAQPRQSPPTDMERSMEKIIITIFQRYAGKEGNQATMD</u> <u>LKEFEAFMNKELASFTKNQKDPQILQKMMNSVDGGID</u> <u>GRRDKELDFQEFNLIGGIMVACNDALAKCPT EKKNP</u> <u>VPATPPT EMEAAMESI IRVFQHFAGKKGDKNQLNYSE</u> <u>FEALMKTELKSF TDNQKDPNIVRKLME SVDGAVDGKR</u> <u>DHELNFOEFMNLIGGIMVACHEALMRHLKRV</u>	13	<i>S100-A11/Rana catesbeiana</i>	100%	72%	2,00E- 105
No hit (S-S) 1	MDFLKKSLFVLVFLGLVSI SFCDEEKRQDDDEDGLPH FRPQTGSGETAILRR <u>SKCIAMQCIRLFLRS</u>	1	—	—	—	—
No hit (S-S) 2	MKKS LFLVFLG FVSI SICDKEKREAEKDEEENVEEK EISEEGSEEKRNVMKR <u>IIKD IATCPRFGRSLKRCIHY</u> <u>KGPG</u>	2	—	—	—	—

No hit (S-S) 3	MSFLKKSFLVLVFLGLVVSFSICEEEKRE <u>ETKEEENEDK</u> <u>IEEESICSPDRGSPPCSLODNARD</u>	1	—	—	—	—
No hit (S-S) 4	MAFLRNLFSLYYFLDLVLSLSICEEEKRETEEEENDQE EDDKSYGSGRK <u>QCSETTPYTDI</u>	1	—	—	—	—
No hit (S-S) 5	MAFSKKSFLFLILFLGLISISLDCDEKRQDDDEASERE EKKEIHEMEKR <u>IRPLLFALKEKEKRKCDAITLMSTIY</u> <u>L</u>	1	—	—	—	—
No hit (S-S) 6	MDFLKKSFLVLVFLG?VSISFCDEEKREDDQGADHES EEDRETSSLRR <u>GLRYTVTGASCLTERL</u>	1	—	—	—	—
No hit (S-S) 7	MGFLEKSLFVLVFLGLVLSLSDKEERETENEEKNP EERSEKILEMYPLKR <u>SMPCAPNPYKKNRFGRMFFP</u> <u>VG</u>	1	—	—	—	—
No hit 1	MDFLKKSFLVLVFLGLVVSISFCDEEKRE <u>EDDQGADHES</u> <u>EEDRESKDEKALEEIKEMIQKNSLGITLRSTIISNSA</u> <u>NNGIKQM</u>	3	—	—	—	—
No hit 2	MAFLKKSLLLVLVFLGLVLSLSICEKEEKECEGADDED RYSEENEDDNQDEESEEEDEDVNEGEESEEEDEK KE <u>EQTEEEKKGKKYNPSYKN</u>	4	—	—	—	—
No hit 3	MAFLKKSLLFVLVFLGLVLSLSICEKEEKECEGADDED RYSEENEDDNQDEESEEEDEDVNEGEESEEE <u>DEDEK</u> <u>NEEPLRFFLFLSHSLS</u>	1	—	—	—	—
No hit 4	MSFLKKSFLVLVFLGLVLSLSICEEEKREEEHEGHKQE EK <u>RLEW</u>	1	—	—	—	—
No hit 5	MDFMKKSFLVLVFLGLVVSISFCDEEKQEDDEENERK EKRENSPWLGEKEKYSPLWKEKK	1	—	—	—	—
No hit 6	MDFLKKSFLVLVFLGLVVSISFCDEEKREDDQGADHES EEDRESKDEKALEEIKEMIQKNSLGNPEEHNYQQ	1	—	—	—	—
No hit 7	MSFLKKSFLVLVFLGLVLSLSICEEEKREEEHEGHKQE EK <u>RFGDTLGKATKLVSNIEETAGGI</u>	2	—	—	—	—
No hit 8	MDFLKKSFLVLVFLGLVVSISFCDEEKQDDDEENESE EK <u>RIHEEGNEEERRESAPSKWG</u>	4	—	—	—	—
No hit 9	MDLLKKSFLVVFLGLISIALCDEEKREDDDDDEDES EEEREIPEEGKQVEKR <u>RFRHLRHRHRHG</u>	2	—	—	—	—
No hit 10	MDFLKKSFLVLVFLGLVVSISFCDEEKREDDYGEEIKS EEER <u>GLGDSKPI TDISQVFGKK</u>	5	—	—	—	—
No hit 11	MDFLKKSFLVLVFLGLVVSISFCDEEKREDDHGEEHKS EEKR <u>GWGNSKPI TDVSQVFGKK</u>	2	—	—	—	—

No hit 12	MAFQKKSFLVLVFLALVPLSLCEEEKREEENEERQDD DQSEEKRN <u>LVSALIEGRKYLKNVLKN</u>	1	—	—	—	—
No hit 13	MDFLKKSLFLVLFLGFISISFCDEEKREDEQGEWIKR <u>EEDRESKDEKALEEIKEMIQKNHLV</u>	2	—	—	—	—
No hit 14	MDFLKKSLFLVLFLGFISISFCDEEKREDEDEEENKR <u>EEERENKDEKAILKSLRR</u>	1	—	—	—	—
No hit 15	MAFLKKSLFLVLVFLALVPLSICEEEKREGEIEKEQED DEQSEAKR <u>GLLSQLLGTVTGLLGNLGGGGLKKI</u>	1	—	—	—	—
No hit 16	MDFLKKSLFLVLFLSLVFSFSICEEDEKREDEEKGDES EEKR <u>EDIEEGSQEEKRQDDYYP</u> S	4	—	—	—	—
No hit 17	MDFLKKSLFLVLFLSLVFSFSICEEDEKREDEEKGDES EEKR <u>EDIEEGSLEEKRQDDYYP</u> S	10	—	—	—	—
No hit 18	M?FLKKSLFLVLFLGLVSIISFCDEEKREDDYGEIKS EEER <u>GLGAVLQNVTSFWFLH</u>	2	—	—	—	—

As estruturas nucleotídicas dos precursores foram analisadas objetivando-se desenhar oligonucleotídeos específicos, visando ensaios de PCR em tempo real. A grande dificuldade reside no fato de os precursores apresentarem grande similaridade entre si, o que torna inviável analisar os níveis de expressão gênica de alguns precursores caracterizados. Dessa maneira, foi possível o desenho de oligonucleotídeos específicos para os seguintes precursores listados na Tabela 5: Bradicininas 1, Dermaseptinas 1, Inibidor enzimático 1 e triptofilina 1. Além desses oligonucleotídeos que anelam especificamente em um determinado precursor gênico, foram desenhados oligonucleotídeos com o objetivo de analisar os níveis de expressão gênica de peptídeos que pertencem à mesma família. Sendo assim, foi desenhado um oligonucleotídeo específico que anela em todos os precursores de Filoseptinas, ou Dermaseptinas, ou bradicininas caracterizados.

Os oligonucleotídeos específicos foram utilizados em ensaios visando a determinação dos níveis de expressão gênica quando *P. azurea* é submetida a diferentes condições de estresse: biótico e estímulo elétrico.

Objetivando-se investigar os mecanismos moleculares que dirigem os processos de restauração após um evento de depleção do conteúdo das glândulas granulares em *P. azurea*, e supondo que tais mecanismos sejam mediados por hormônios, o transcriptoma gerado foi submetido a buscas de transcritos que contenham similaridade com os principais hormônios peptídicos conhecidos. Feito isto, foram identificados 10 precursores homólogos a diferentes hormônios (Tabela 6): Calcitonina, Gastrina, Hormônio liberador de hormônio do crescimento (GHRH ou VIP - peptídeo intestinal vasoativo), Insulina, Resistina, Somatostatina, Taquicinina, Timosina, Timopoetina e Visfatina. A Figura 6 demonstra o alinhamento do precursor da insulina caracterizado em *P. azurea* com aqueles já caracterizados em alguns outros animais, evidenciando a similaridade existente entre tais precursores.

Tabela 6. Lista dos precursores contendo similaridade a diferentes hormônios peptídicos caracterizados a partir do transcriptoma de *P. azurea*. Os precursores foram traduzidos *in silico*. As áreas sublinhadas indicam a região do peptídeo maduro.

Hormônio	Precursor	Número de reads	Similaridade/ organismo	Cobertura	Identidade	E-value
Calcitonina	MVVLKVSSVLTVLGLLLGQMYGSQGAPVRRALEP LPDRVTEAHRLRLALIRELTAEDMEASSGTAHKR <u>GCDTSTCATQRLADFLSHAGDGNSTSCPPMSGAN</u> <u>NSFGRRRSLHV</u>	2	<i>Skin calcitonin related peptide/ Phyllomedusa bicolor</i>	97%	73%	3,00E-12
Gastrina	MDKKICVTILLAMLATAVLCAPMAEPESARRDLL KKELIRSLDQLREVIQTQDQ <u>GWMDFGRRSSEE</u>	4	<i>Cholecystokinin-like/Calypte anna</i>	100%	92%	8,00E-04
GHRH/VIP	MHRLLYLVLLQFGLYVHCYLMHPNYSRDQTSKPS RNVNLPALKEGMDWLLDEPQGFVRLSEKRME R <u>HVDAIFTNTYRKFLGQISARRYLQNM</u> MGKRL EQLDGLGILYPSDGEISERTLRDTLATVLMNMLKNPEW RADESQ	1	<i>Growth hormone releasing hormone precursor/Xenopus laevis</i>	100%	100%	2,00E-22
Insulina	MALWIQCLPLAVLLMI FTPTTQ <u>ALANQHLCGPHL</u> <u>VEVLVLVCGDRGFYYYPK</u> VRRDLEQPSVNGPQGN ELDEMQIQSQDYQMRKR <u>GIVEQCCHSTCSLYELE</u> <u>NYCN</u>	1	<i>Insulin-2 precursor/Xenopus laevis</i>	100%	79%	2,00E-42
Visfatina	<u>EPELNILLATDSYKVTHYKQYPPNTSNVYSYFEC</u> <u>REKKTENSKFRKVYEE TVFYGLQYILKKYLNGK</u> <u>VVTKEKIQEAKVYREHFQDEVFNETGWN YILEK</u> <u>YDGHLP I EVKAVPEGSVI PRGNVLF TVENTDPEC</u> <u>YWL TNW I ETILVQTWYPI TVATNSREQKILAKY</u> <u>LLETSGSLTGLE YKLHDFGYRGVSSQETAGIGAS</u> <u>AHLVNFKGTDTVAGIGLIKRYYGTKDPVPGLLLV</u> <u>PARRTTVRLRPGKRTHGKRML</u>	9	<i>Visfatin isoform 2/ Sus scrofa</i>	92%	93%	6,00E-160
Resistina	MEDMVGATPGGNGGYGGVNSGGNGSGGVNPGGY GGSGGVSPGNGGSGGVSPGGYGGPG <u>EVSPGGNGG</u> <u>YGVGTTGGNTGGGSTTGKCTCKLNCVDVTKNGNT</u> <u>AKCEPGYTAVSCSCGLGCGSYDFKGTDTCSQCI</u> <u>GVDWTSARCKSNLSP</u>	25	<i>Resistin-like/Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	65%	53%	3,00E-14
Somatostatina	MQSCIAHRAL TLLFLVLAVSFI STAPIDPGNDQK REPSHPENEVLESGNLERRVMEDKER <u>SANS DPAL</u> <u>DLKQRKADCVNFFWKTYTPC</u>	3	<i>Somatostatin/Gallus gallus</i>	100%	68%	6,00E-09

Timopoetina	<u>MSEYAEDPSSLTKDEAEERTHSEYRCSTEPGEHR</u> <u>KDVYVQLYRQHLSRNRATPDFSSDEEKESTPVR</u> <u>GRGRPPGRKATKKTDPAEEGKNEPDITSLSNEA</u> <u>LKEELLKYGVKPGPIMGSTRKVYEQRLLKLKEQL</u> <u>EVVSSVAPPVADLSTADNKQNGNTDSAQYSDNDE</u> <u>PRTDLTFESREPLRSKPKALVTSRSKRLEQNEII</u> <u>ERTLTEEKREDRDILKEMFPYESSTPTGISASCR</u> <u>RPIKGAAGRPFNVKDYKDYKLEESYSKYVPKYQP</u> <u>VVEEKTAKSGRSIPWIWIKLFILLILAVLAFV</u> <u>YQAMEPNEGPNPFTKWLOGNQEFKDKN</u>	3	<i>Thymopoietin isoform X8/ Chrysemys picta bellii</i>	96%	55%	1,00E-105
Timosina	<u>MSDKPDMGEIEKFDKSKLKTETQEKNPLPSKET</u> <u>IEQEKQVSES</u>	1	<i>Thymosin beta-4-like/Ovis aries</i>	100%	93%	5,00E-19
Taquicinina	MKILVALAVVVLVSAQVFAAEFEHDDADLSESEQ KREASPESEDLTGLRIARQRKPK FDGI IGKRITQ EADPNG FYGLM GKRITQDDGYLYSLLGKRNN	1	<i>Ranatachykinin-B/ Rana catesbeiana</i>	100%	100%	1313

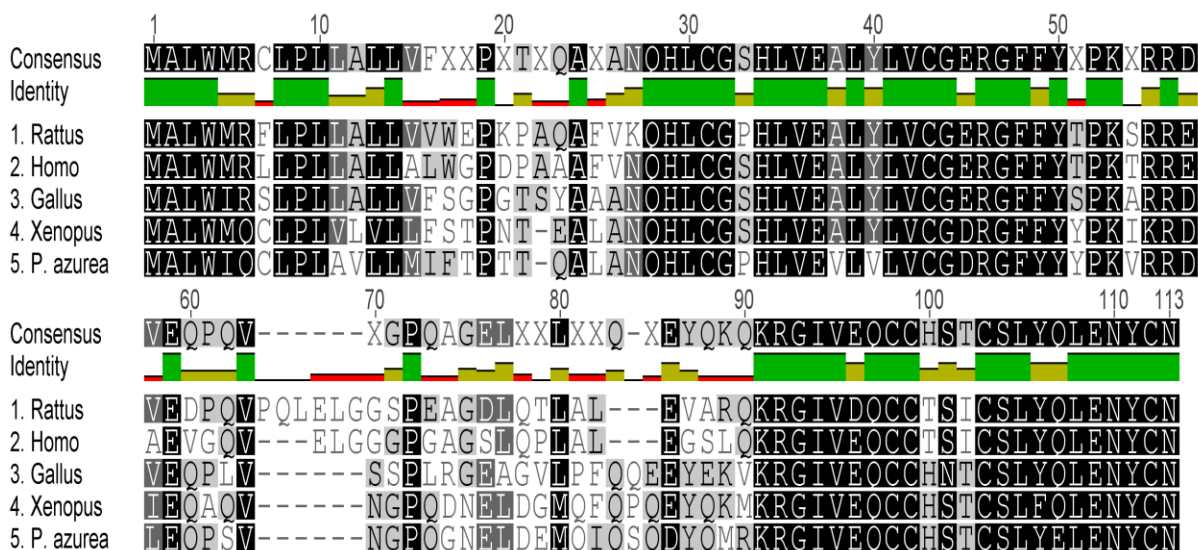


Figura 6. Alinhamento de precursores da insulina caracterizados em diferentes espécies.

Todos os transcritos homólogos a precursores de hormônios caracterizados foram analisados com o objetivo de desenhar oligonucleotídeos específicos visando ensaios de PCR em tempo real com a finalidade de determinar a taxa de transcrição de tais genes durante o processo de restauração do conteúdo glandular após um evento de depleção em *P. azurea* e quando esse anfíbio é submetido a diferentes condições de estresse.

6.2. PROTEÔMICA DA SECREÇÃO CUTÂNEA

A secreção cutânea de animais adultos da espécie *P. azurea* foi submetida a procedimentos de redução, alquilação, digestão enzimática com tripsina e, logo em seguida, à cromatografia em nano escala acoplada à espectrometria de massa (*Synapt G2 HDMSTM* - *Waters Co.*) com a qual os peptídeos identificados foram fragmentados gerando espectros de massa para sequenciamento *de novo* de peptídeos. A interpretação dos espectros foi realizada de maneira automática a partir da comparação dos espectros gerados com os dados presentes no banco de dados do transcriptoma do tecido cutâneo de *P. azurea*.

Dentre as centenas de moléculas presentes na secreção cutânea de *P. azurea*, apenas 20 peptídeos puderam ser identificados com essa técnica, dentre os quais, destaca-se a caracterização dos precursores NR 1, NR 6, NR 8, NR 12, NR 19, STD 1, IN 4, IN 12, SIS 7, CRISP 04 e Calcitonina (Tabela 07).

Tabela 7. Lista de peptídeos e proteínas identificados de maneira automática após nano LC-MSMS (*Synapt G2 – Waters Co.*) seguida de comparação com o banco de dados gerado a partir do transcriptoma do tecido cutâneo de *P. azurea*.

Nome	Sequência do precursor*	Repetição**	Cobertura sequenciada (%)	Score***
Psp1	MAFLKK <u>SLFLVLFGLVLSICEEEKRETE</u> <u>EEENDQEEDDKSEEKRFSLLLPSLVSGAVS</u> <u>LAKKLG</u>	3	72,22	12230,81
Psp3	MAFLKK <u>SLFLVLFGLVLSICEEEKRETE</u> <u>EKENEQEEDDKSEEKRFSLIPHAINAVSAI</u> <u>AKHFG</u>	3	69,23334	8012,465
NR19	MSFLKNS <u>LLLLVLFGLVFSICEEEKRENE</u> <u>EEENEDEIEEQSEEKRRIVELDPGFTPFRR</u> <u>P</u>	3	84,14999	7499,734
NR12	MAFQKK <u>SLFLVLFALVPLSLCEEKREEE</u> NEERQDDQSEEKRN <u>LVSALIEGRKYLKNV</u> LKN	3	27,51	1520,478
NR8	MSFLKKS <u>SLFLVFLGIVLSICEEEKREEE</u> <u>HEGHKQEEKRLFGLDTLGKATKLVSNIEETA</u> <u>GGII</u>	3	43,75	1734,719
Dsp2	MALLK <u>KISFSLYSLDWFPPSVK</u> KRREKM KMRRNKK <u>DDEQSEMKRALWKDVLKIGTVA</u> <u>LHAGKAAFCAAADTISQGS</u>	3	46,25	887,9419
STD1	MAFLKK <u>SLFLVLFGLFVSISFCDEEKRQDD</u> <u>DEANESEEKDIHEVEKRLRPAILVRVKGK</u> GLGK	3	66,15	1502,83
Dsp5	MAFLKKS <u>SLFLVFLGMVLSICEEEKRENE</u> DVEEQEDDEQSEMKR <u>GLWSTIKQKGEAAI</u> <u>AAAKAAGKAVLNSASEAIGE</u>	2	44,445	1587,131
Dsp6	MAFLKKS <u>SLFLVFLGMVLSICEEEKRENE</u> DEEQEDDEQSEMKR <u>GLWSTIKQKGEAAI</u> <u>AAAKAAGKAALGALGEQ</u>	2	35,715	1587,131
Dsp8	MAFLKKS <u>SLFLVFLGMVLSICEEEKRENE</u> <u>DEELQEDDEQSEMKRGLWSTIKNVGKEAAI</u> <u>AAGKAALGALGEQ</u>	2	58,9	1368,101
IN4	MK <u>TLISSALLFCILA</u> AVLWPVPEAEGATKP <u>KCPWFSSGCPSEQNFVCGTDGRSYMNECVM</u> <u>CTWNKNHGAKVKIEKRVIVLCS</u> EDYRKRKI NLMKNKPCAIQCTDMFQ	2	38,32	239,028
CRISP4	<u>MQGPHYFLFCMVHLVTAL</u> TDEEKKTIVETH <u>NLYRSQVDPTAADMKALRWDK</u> SLEDLATS	2	39,82	200,1483

	<u>AAKCIWDHNEERGHARGENLFIMSGSPLDVK</u> <u>MGMEDWHRELNYNFTTDTCEEDKMCGHYT</u> <u>QMVWAE[*]TERVGCGE[*]SFCEKLEGFDES[*]NMFI</u> <u>LVCN[*]YEPPGNFRGEKPYTPGEPCSSCPSTY</u> <u>ICRDSL[*]CVVDNEDSEHHPTRKPVATTEAST</u> <u>AQSGRQGTQGI</u>			
Calcitoinina	<u>MVVLK[*]VSSVLT[*]VLG[*]LLLG[*]QMYGS[*]QGAPVRR</u> <u>ALEPLPDRVTEAHRLRLALIRELTAEDMEA</u> <u>SSGTAHKR[*]GCDTSTCATQRLADFLSHAGDG</u> <u>NSPTSCPPMSGANSFGRRRRSLHV</u>	3	55,85	301,379
IN12	<u>MKTLISSALLFCVLAALWPVPEAEAIIEP</u> <u>KCSRYPSICTFGPNAVCGTDGKKYFNECTL</u> <u>CVINR[*]KNGKEVKIEKYGAC</u>	3	81,43333	926,1812
SIS7	<u>MGFLEK[*]SLFLV[*]FLGLV[*]LSL[*]ICDKEERETE</u> <u>NEEEKNPEER[*]SEGKILEMYPLK[*]RSMPCAPN</u> <u>PYKKNRFGRCMFFPVG</u>	2	33,55	364,1161
Fsp6	<u>MAFLK[*]SLFLV[*]FLGLV[*]LSL[*]IC[*]EEEKRETE</u> <u>EEENDQEEDDKSEEK[*]FLSLLPSLVSGAVS</u> <u>LAKN</u>	2	15,28	181,2587
Psp2	<u>MAFLK[*]SLFLV[*]FLGLV[*]LSL[*]IC[*]EEEKRETE</u> <u>EEENDQEEDDKSEEK[*]FLSLLPSLVSGAVS</u> <u>LAKN</u>	3	72,91666	11849,47
NR1	<u>MDFLK[*]SLFLV[*]FLGLV[*]SIS[*]FCDEEKREDD</u> <u>QGADHESEEDRESKDEKALEEIKEMIQKNS</u> <u>LGITLRSTIISNSANNGIKQM</u>	2	13,58	181,2587
Dsp7	<u>MAFLK[*]SLFLV[*]FLGMV[*]LSL[*]IC[*]EEEKRENE</u> <u>DEEEQEEDDEQSEMKRGLWSTIKQK[*]GKEAAI</u> <u>AAAKAAGKAAFRCPRGAISIK</u>	2	33,95	1587,131
Dsp1	<u>MAFLK[*]SLFLV[*]FLGLV[*]LSL[*]IC[*]EEEKRENE</u> <u>DEEKQEEDDEQSEMKRALWKDVLK[*]IGTVAL</u> <u>HAGKAAF[*]GAAADTISQGES</u>	2	22,78	907,5219

* Regiões em negrito e sublinhado representam os fragmentos do peptídeo identificado;

** Foram realizadas três repetições;

*** Quanto maior o valor do score, mais confiável será a interpretação do espectro de massa.

6.3. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS NAS GLÂNDULAS GRANULARES APÓS ESTÍMULO ELÉTRICO

Animais adultos da espécie *P. azurea* foram capturados no habitat natural e submetidos à extração da secreção cutânea com objetivo de avaliar a cinética da expressão dos genes de interesse utilizando as técnicas de PCR em tempo real e MALDI-*Imaging*. Após aplicação do estímulo, os anfíbios foram imediatamente submetidos aos procedimentos (tempo zero) ou permaneceram 24, 48 e 72 horas em cativeiro antes da realização destes. Os controles 1 e 2

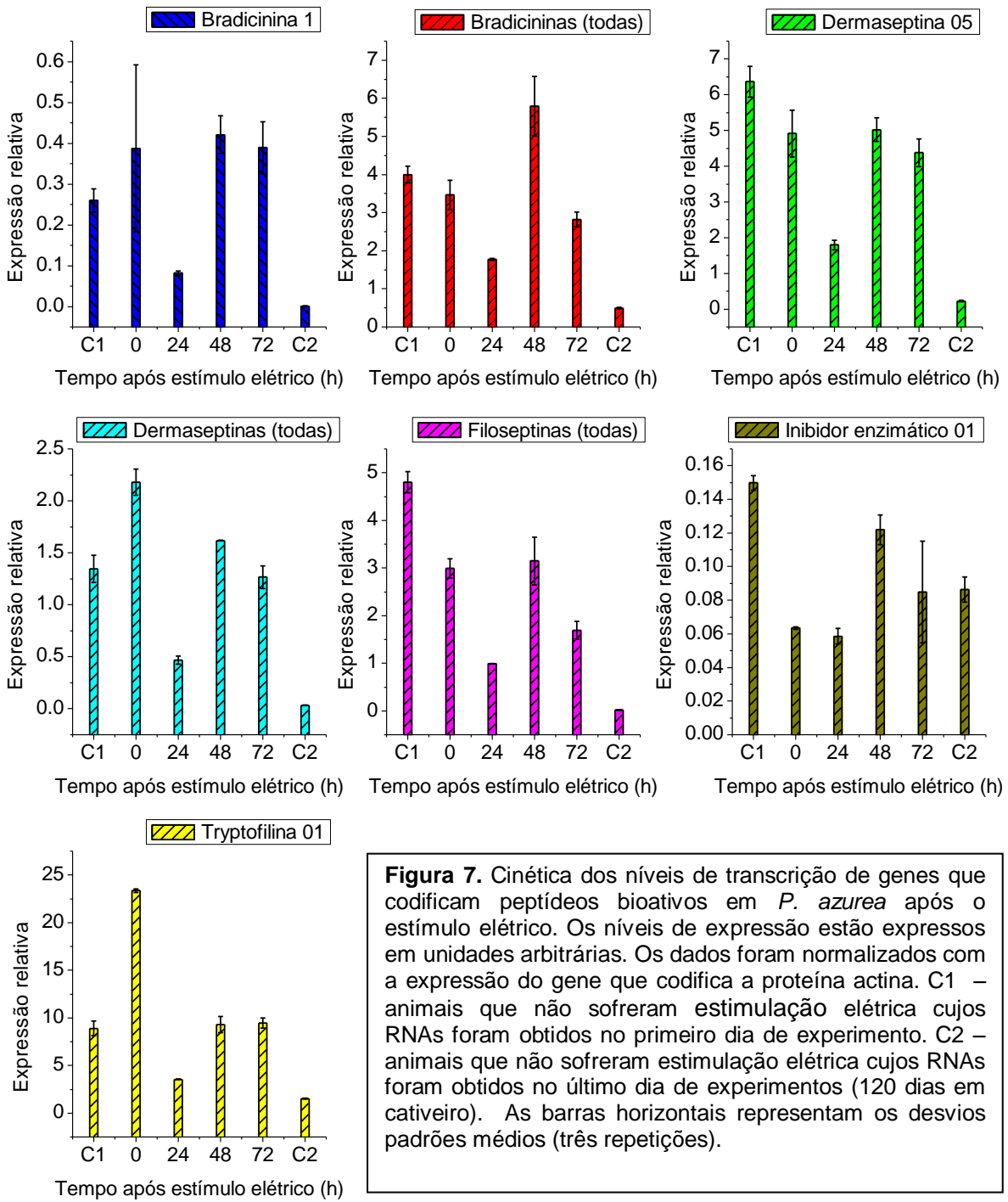
compreenderam anfíbios que não foram submetidos ao estímulo elétrico, cujos tecidos cutâneos foram isolados imediatamente após chegarem do campo e permaneceram 72 horas em cativeiro, respectivamente.

Nos experimentos de PCR em tempo real foram empregados oligonucleotídeos que anelam nos precursores que possuem a estrutura dos pré-pró-peptídeos comuns aos peptídeos já isolados a partir das secreções de anfíbios. Os resultados foram ajustados de acordo com a eficiência apresentada por cada par de oligonucleotídeo (Tabela 8). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de PCR em tempo real encontram-se no anexo I.

Tabela 8. Eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos sintetizados que anelam em precursores que codificam pré-pró-peptídeos de interesse.

Oligonucleotídeo	Eficiência de amplificação
Actina	100%
Bradicinina 1	70%
Bradicinina (todas)	88%
Dermaseptina 5	90%
Dermaseptina (todas)	60%
Inibidor 1	86%
Filoseptinas (todas)	94%
Triptofilina 1	98%

Como pode ser observado na Figura 7 os genes analisados apresentaram diferentes níveis de transcrição após a aplicação do estímulo elétrico. Apenas o precursor Triptofilina 1 apresentou níveis mais elevados de transcrição logo após o esvaziamento das glândulas. Todos os genes analisados apresentaram uma queda nos níveis de transcrição 24 horas após a aplicação do estímulo elétrico e, também, que estes foram sempre mais baixos no controle 2 quando comparados ao controle 1. Os precursores que codificam o inibidor enzimático 1 e a bradicinina apresentaram os menores valores de transcrição. Além disso, com exceção do precursor que codifica o inibidor enzimático 1, todos os precursores analisados apresentaram um padrão de transcrição semelhante ao longo dos tempos experimentais analisados.



Uma porção do tecido cutâneo dos mesmos anfíbios submetidos às análises de PCR em tempo real foi empregada nos experimentos de MALDI-*Imaging*. Após a aplicação do estímulo elétrico, os valores das áreas ocupadas pelos íons detectados no tecido cutâneo dorsal dos anfíbios (como exemplificado na Figura 13) foram mensurados de acordo com a proporção individual relativa dos íons presentes no anfíbio controle que apresentou um espectro de massa global com a menor intensidade. As proporções foram: 25%, 50% e 75% do valor da intensidade que cada íon apresentou no anfíbio controle, refletindo assim, seus respectivos níveis de restauração. Visando obter resultados mais acurados, apenas os íons que apresentaram os maiores valores de intensidade no espectro de massa global foram empregados nas análises dos resultados de MALDI-*Imaging* (Tabela 9).

Tabela 9. Lista de íons empregados nas análises de MALDI-*Imaging* após *P. azurea* ser submetida ao estímulo elétrico.

Massa média experimental [M+H] ⁺	Sequência do peptídeo maduro	Amidação C-terminal	Aduto	Massa teórica [M+H] ⁺	Massa média teórica [M+H] ⁺	Massa média teórica + Aduto
681	FPPWL	Sim	Na	658,3711	658,8039	680,7937
697	FPPWL	Sim	K	658,3711	658,8039	697,91,1
1087	—	—	—	—	—	—
1272	VHypPGFTPFVRVD	Sim	Na	1246,6992	1247,4595	1270,4493
1626	LPHALNAVSALAKHF	Sim	K	1587,9118	1588,8696	1626,8313
1827	SLLPHALNAVSALAKHF	Sim	K	1788,0278	1789,105	1827,0667
1965	—	—	—	—	—	—
1981	FLSLLPSIVSGAVSLAKKL	Sim	K	1942,2099	1943,3928+K	1981,3545
	FLSLIPAAISAVSALADHF	Sim	K	1942,0796	1943,2652	1981,2269
	FLSLIPHAINAVSALANHG	Sim	K	1944,0813	1945,2447	1983,2064
2009	FLSLLPSLVSGAVSLVKKL	Sim	K	1970,2412	1971,4461	2009,4078
2071	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	Sim	Na	2048,1803	2049,4372	2071,4264
2088	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	Sim	K	2048,1803	2049,4372	2087,3989
2138	FLSLIPHAINAVSTLVHFF	Sim	K	2115,1861	2116,4835	2138,4727
2154	FLSLIPHAINAVSTLVHFF	Sim	K	2115,1861	2116,4835	2154,4452
2449	GLWSTIKNVGKEAAIAAGK AALGAL	Sim	K	2409,397	2410,8304	2448,7921

Os valores das áreas ocupadas pelos íons analisados sugerem que o estímulo aplicado não foi suficiente para exaurir completamente o conteúdo das glândulas granulares. Além disto, aparentemente, houve um “consumo” de peptídeos entre os tempos experimentais 0 e 24 e entre 48 e 72. Observa-se ainda que, mesmo 72 horas após a aplicação do estímulo elétrico, as glândulas não se apresentaram totalmente restauradas (Figura 8). É importante ressaltar que, apesar dos dados de área ocupada por íons indicarem certa restituição glandular 48 horas após o estímulo elétrico, apenas três íons alcançaram 50% de intensidade nos três anfíbios que compõe a triplicata, quando comparados com os controles naquele momento (Tabela 10).

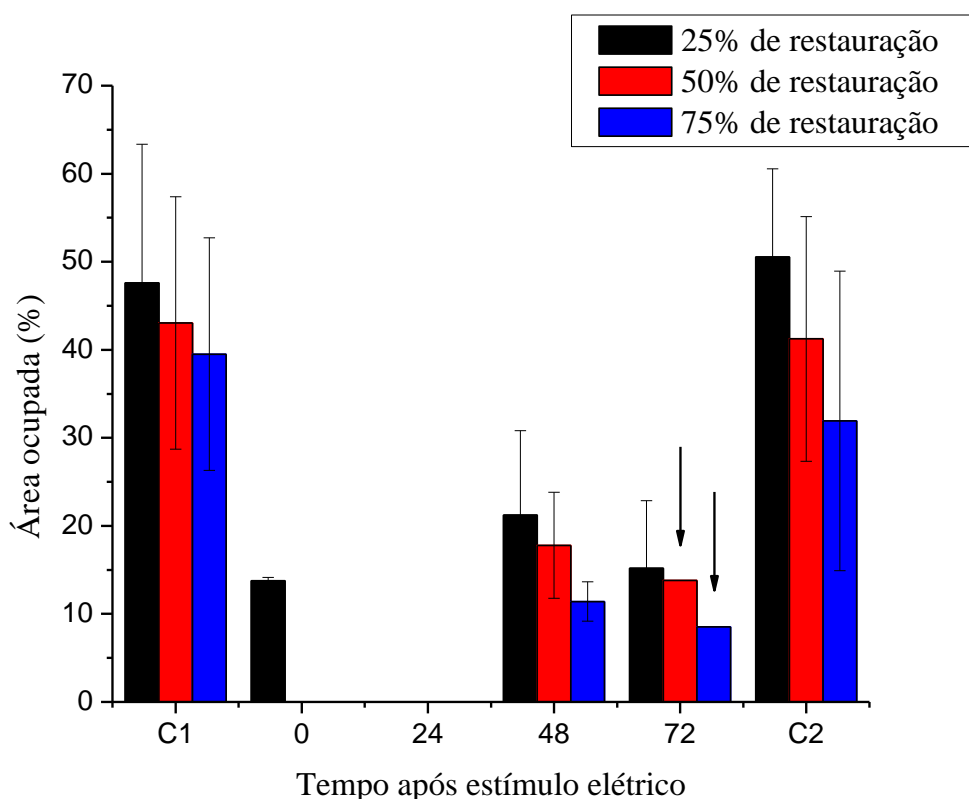


Figura 8. Determinação da área da pele de *P. azurea* ocupada por íons após o esvaziamento das glândulas granulares. C1 - animais que não sofreram estimulação elétrica cujos tecidos foram obtidos no primeiro dia do experimento. C2 – animais que não sofreram estimulação elétrica cujos tecidos foram obtidos no último dia do experimento (72 horas em cativeiro). As barras horizontais representam os desvios padrões médios (n=3). Setas: apenas um animal apresentou íons com valores de intensidades mensurados.

Tabela 10. Íons presentes no tecido cutâneo de *P. azurea* após a aplicação do estímulo elétrico. Os números sobrescritos em cada valor de íon indicam em quais anfíbios das triplicatas este foi observado.

Tempo após estímulo elétrico	Porcentagem de restauração		
	25%	50%	75%
C1*	Todos os íons	Todos os íons	Todos os íons
0	1273 ^{2,3} , 1965 ^{2,3} , 1981 ^{2,3} , 2010 ^{2,3} ;	1273 ^{2,3} , 2010 ^{2,3} ;	—
24	—	—	—
48	681 ² , 1088 ¹ , 1273 ^{2,3} , 1626 ¹ , 1695 ³ , 1827 ¹ , 1965 ^{1,2} , 1981 ^{1,2,3} , 2010 ^{1,2,3} , 2072 ¹ , 2088 ¹ , 2139 ¹ , 2155 ¹ , 2450 ¹ ;	2010 ^{1,2,3} , 1088 ¹ , 1273 ² , 1965 ^{1,2} , 1981 ^{1,2} ;	1088 ¹ , 1273 ² , 1965 ² , 2010 ¹ ;
72	1088 ^{1,2} , 2010 ¹ , 2072 ¹ , 2088 ¹ , 1626 ² ;	1626 ² ;	1626 ² ;
C2**	Todos os íons	Todos os íons	Todos os íons

* animais que não sofreram estimulação elétrica cujos tecidos foram obtidos no primeiro dia do experimento.

** animais que não sofreram estimulação elétrica cujos tecidos foram obtidos no último dia do experimento (72 horas em cativeiro).

Com o objetivo de buscar evidência a respeito dos mecanismos de regulação da restauração glandular em *P. azurea*, os oligonucleotídeos que anelam nos precursores que codificam hormônios peptídicos foram utilizados nos ensaios visando determinar a cinética da expressão desses genes após o estímulo elétrico cujos, resultados também foram ajustados de acordo com a eficiência apresentada por cada par de oligonucleotídeo (Tabela 11).

Tabela 11. Eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos sintetizados que anelam em precursores que codificam os hormônios de interesse.

Oligonucleotídeo	Eficiência de amplificação
Calcitonina	80%
Gastrina	70%
Insulina	70%
Resistina	90%
Somatostatina	80%
GHRH	60%

Os resultados indicam que os níveis de transcrição dos genes que codificam a calcitonina, a gastrina e a somatostatina foram mais elevados logo após a aplicação do estímulo elétrico (T=0) quando comparados com os demais tempos experimentais e com os controles (Figura 9). Os níveis de transcrição dos demais genes investigados permaneceram praticamente estáveis após a aplicação do estímulo elétrico, mesmo quando comparados com aqueles apresentados pelos controles.

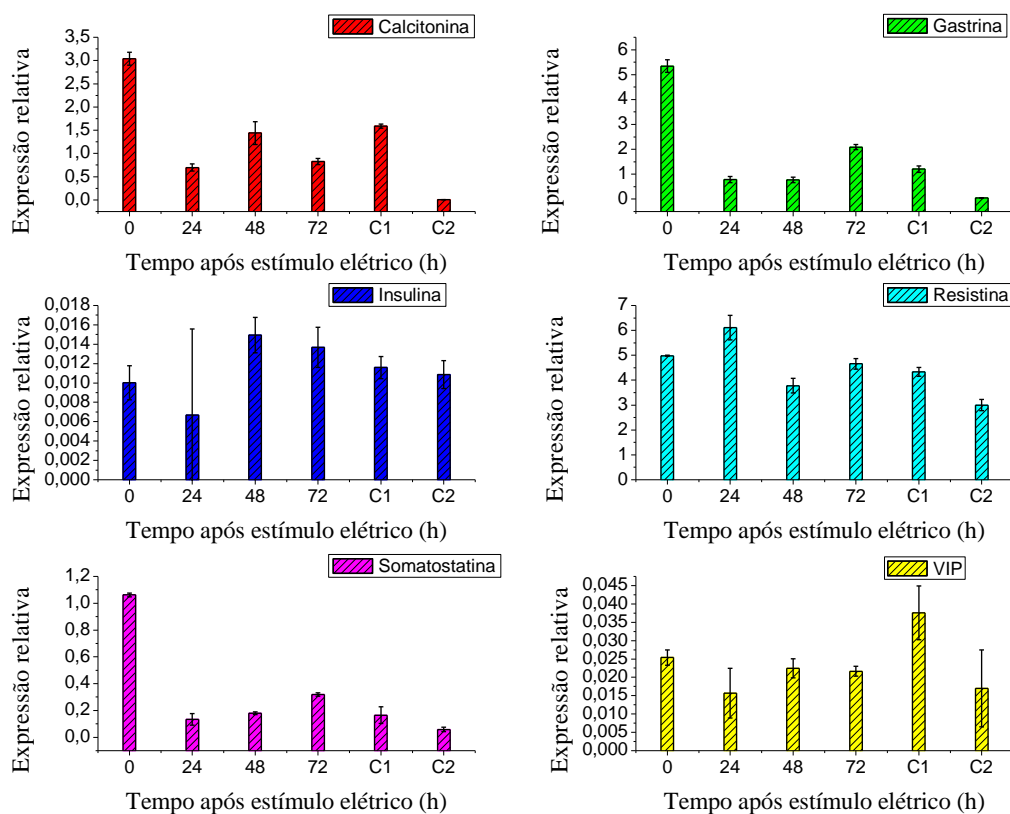


Figura 9. Cinética dos níveis de transcrição de genes que codificam precursores de hormônios em *P. azurea* após o estímulo elétrico. Os níveis de expressão estão expressos em unidades arbitrárias. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica a proteína actina. C1 – nível de transcrição dos genes em animais que não sofreram estimulação elétrica cujos RNAs foram obtidos no primeiro dia de experimento. C2 – nível de transcrição dos genes em animais que não sofreram estimulação elétrica, cujos RNAs foram obtidos no último dia de experimentos (120 dias em cativeiro). As barras horizontais representam os desvios padrões médios (três repetições).

6.4. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS NAS GLÂNDULAS GRANULARES APÓS ESTÍMULO BIÓTICO

Após a extração da secreção cutânea, anfíbios da espécie *P. azurea* foram submetidos ao contato cutâneo com bactérias Gram-negativa e Gram-positiva, as quais foram isoladas a partir do tecido cutâneo de *Phyllomedusa distincta*. Passadas 24 horas, os anfíbios foram submetidos aos procedimentos visando a determinação dos níveis de transcrição de genes de interesse e a obtenção de imagens por MALDI-*Imaging*.

A análise realizada com os oligonucleotídeos que anelam nos precursores que codificam pré-pró-peptídeos bioativos indica que a bactéria Gram-positiva promoveu uma indução maior da transcrição de quase todos os genes estudados quando comparada com aquela promovida pela presença da bactéria Gram-negativa ou controles (Figura 10). No que diz respeito à indução promovida pela bactéria Gram-negativa, apenas os níveis de transcrição dos genes que codificam bradicininas (todas) e inibidor enzimático 1 foram maiores do que aqueles apresentados pelo anfíbio controle. Além disto, os níveis de transcrição do gene que codifica o precursor Triptofilina 1 foram mais elevados nos anfíbios que sofreram apenas o estímulo elétrico do que naqueles que passaram por algum “tratamento”.

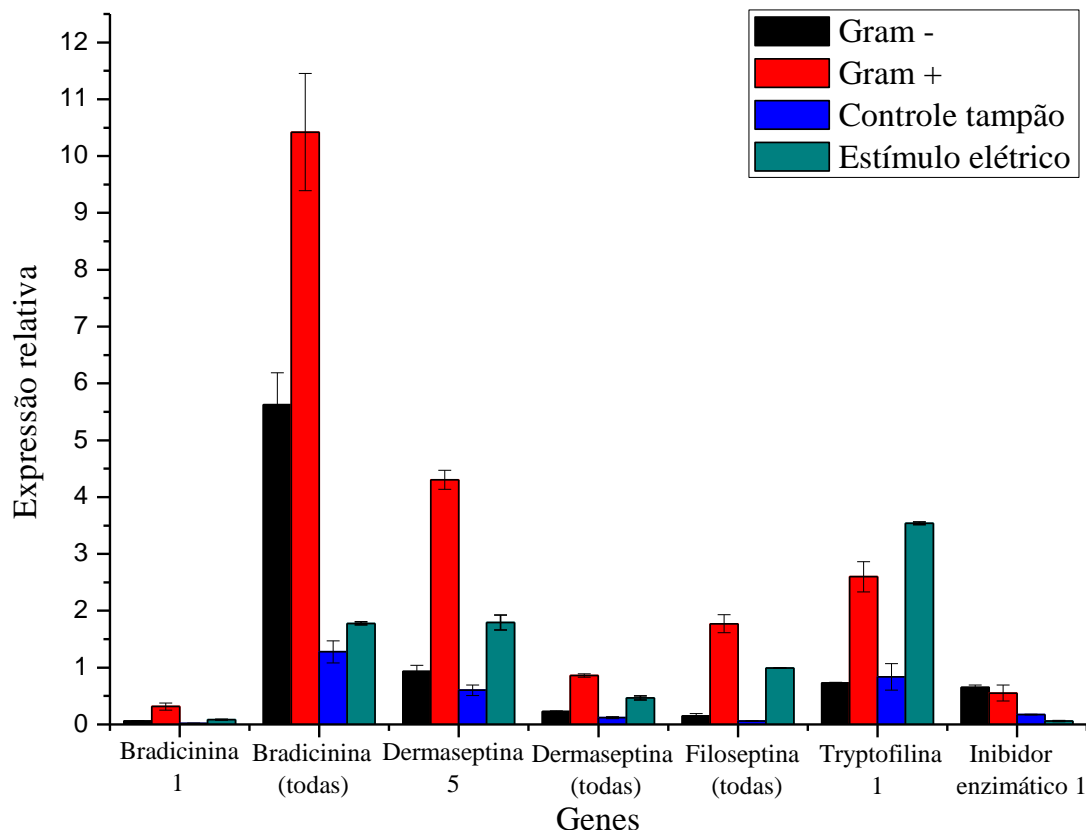


Figura 10. Níveis de transcrição de genes que codificam pré-pró-peptídeos em *P. azurea* após o contato com microrganismos. Os níveis de expressão estão expressos em unidades arbitrárias. Os animais ficaram expostos aos microrganismos por um período de 24 horas. Estímulo elétrico compreende animais que sofreram apenas o esvaziamento das glândulas e não foram expostos a nenhum outro tratamento. O controle tampão compreende animais que foram banhados apenas com a solução NaCl 0,6%. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica a proteína actina. As barras horizontais representam os desvios padrões médios (três repetições).

Uma fração do tecido cutâneo dorsal dos anfíbios submetidos ao experimento foi analisada em espectrômetro de massa, visando determinar o padrão de distribuição de íons localizados no tecido cutâneo, no que diz respeito à porcentagem de ocupação na pele. Os íons incluídos nas análises foram os mesmos que estão listados na Tabela 9. De acordo com os resultados, tanto os anfíbios submetidos ao contato com as bactérias, quanto aqueles do grupo controle, os quais foram banhados em solução salina apresentaram uma porcentagem

de ocupação de íons no tecido cutâneo muito semelhante e, ao mesmo tempo, superior aos dos anfíbios que sofreram apenas o estímulo elétrico (Figura 11) o que culminou com a detecção da maioria dos íons analisados com valores de intensidade iguais a 75% (Tabela 12).

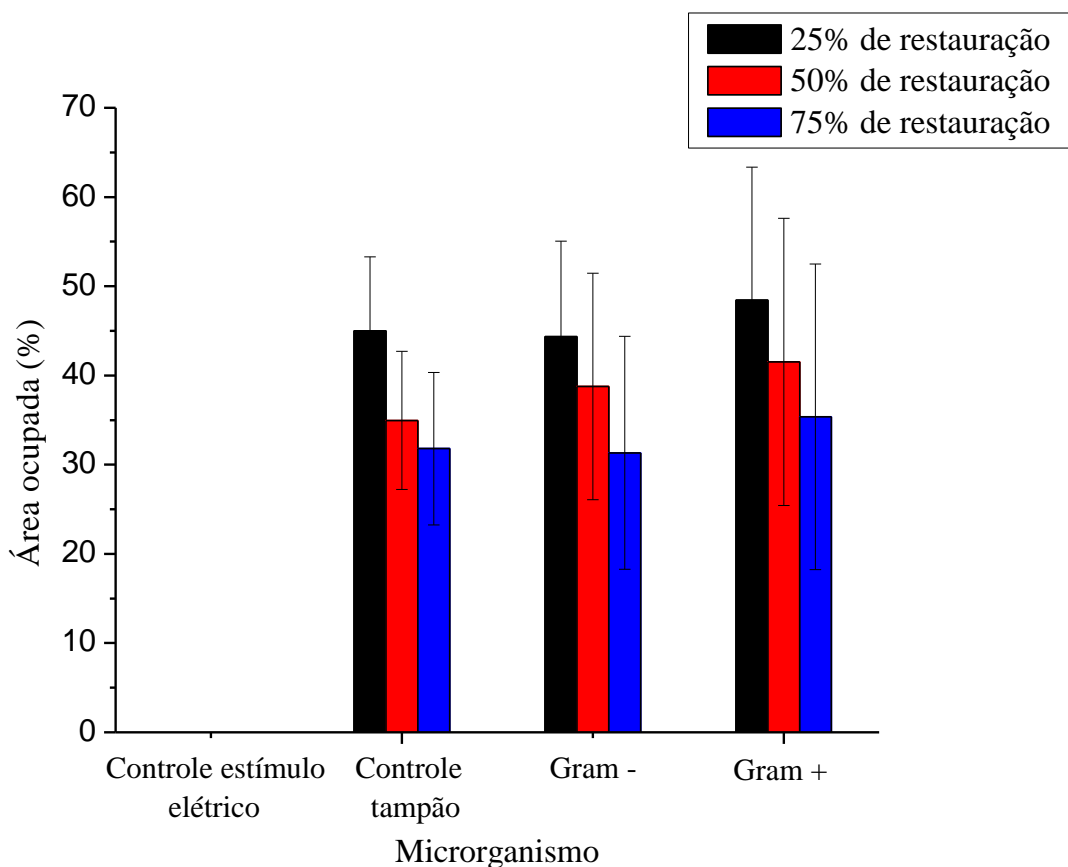


Figura 11. Área da pele de *P. azurea* ocupada por íons após o esvaziamento das glândulas granulares, seguido pela exposição a microrganismos por um período de 24 horas. O controle estímulo elétrico compreende animais que sofreram apenas o esvaziamento das glândulas e não foram expostos a nenhum outro tratamento, mas que permaneceram em ambiente não esterilizado. O controle tampão compreende animais que foram banhados apenas com a solução NaCl 0,6%.

Tabela 12. Íons presentes no tecido cutâneo de *P. azurea* após 24 horas de contato com os microrganismos. Os números sobrescritos em cada valor de íon indicam em quais anfíbios das triplicatas este foi observado.

Microrganismo	Porcentagem de restauração	Colunas	
		Colunas1	Colunas2
		25	50
Controle estímulo elétrico	—	—	—
Controle tampão	681 ^{1,2,3} , 697 ^{1,2,3} , 1088 ^{1,2,3} , 1273 ^{1,2,3} , 1626 ^{1,2,3} , 1827 ^{1,2,3} , 1965 ^{1,2,3} , 1981 ^{1,2,3} , 2010 ^{1,2,3} , 2072 ² , 2088 ² , 2139 ^{2,3} , 2155 ^{2,3} , 2450 ² ;	681 ^{1,2,3} , 697 ^{1,2,3} , 1088 ^{1,2,3} , 1273 ^{1,2,3} , 1626 ^{1,2,3} , 1827 ^{1,2,3} , 1965 ^{1,2,3} , 1981 ^{1,2,3} , 2010 ^{1,2,3} , 2072 ² , 2088 ² , 2139 ^{2,3} , 2155 ² , 2450 ² ;	681 ^{1,2,3} , 1088 ^{1,2,3} , 1273 ^{1,2,3} , 1626 ^{1,2,3} , 1827 ^{1,2,3} , 1965 ^{1,2,3} , 1981 ^{1,2,3} , 2010 ² , 2072 ² , 2088 ² , 2139 ² , 2155 ² , 2450 ² ;
Gram-negativas	681 ^{1,2,3} , 697 ³ , 1088 ^{1,2,3} , 1273 ^{1,2,3} , 1626 ^{1,2,3} , 1827 ^{1,2,3} , 1965 ^{1,2,3} , 1981 ^{1,2,3} , 2010 ^{1,2,3} , 2072 ^{1,2,3} , 2088 ^{1,2} , 2139 ^{1,2,3} , 2155 ^{1,2,3} , 2450 ^{1,2,3} ;	681 ^{1,3} , 1088 ^{1,2,3} , 1273 ^{2,3} , 1626 ^{1,2,3} , 1965 ^{1,2,3} , 1981 ² , 2010 ^{1,2,3} , 2139 ^{1,2} , 2155 ¹ , 2450 ² ;	1088 ^{1,2,3} , 1273 ^{2,3} , 1626 ^{1,3} , 2010 ^{1,2,3} , 1965 ^{1,2} , 1981 ² , 2072 ¹ , 2139 ¹ ;
Gram-positivas	681 ^{1,2,3} , 697 ¹ , 1088 ^{1,2,3} , 1273 ^{1,2,3} , 1626 ^{1,2,3} , 1827 ^{1,2,3} , 1965 ^{1,2,3} , 1981 ^{1,2,3} , 2010 ^{1,2,3} , 2072 ^{1,2,3} , 2088 ^{1,2} , 2139 ^{1,2,3} , 2155 ^{1,2,3} , 2450 ^{1,2,3} ;	681 ¹ , 697 ¹ , 1088 ^{1,2,3} , 1273 ^{1,2,3} , 1626 ^{1,2} , 1827 ^{1,2} , 1965 ^{1,2,3} , 1981 ^{1,2,3} , 2010 ^{1,2,3} , 2072 ^{1,2} , 2088 ^{1,2} , 2139 ^{1,2,3} , 2155 ^{1,2} , 2450 ^{1,2} ;	681 ¹ , 697 ¹ , 1088 ^{1,2,3} , 1273 ^{1,3} , 1626 ^{1,2} , 1827 ^{1,2} , 1965 ^{1,3} , 1981 ^{1,3} , 2010 ^{1,2,3} , 2072 ^{1,2} , 2088 ¹ , 2139 ^{1,2} , 2155 ¹ , 2450 ¹ ;

Os níveis de transcrição dos genes que codificam os hormônios peptídicos caracterizados em *P. azurea* também foram mensurados após o contato dos anfíbios com os microrganismos (Figura 12). Nos anfíbios que foram submetidos apenas ao estímulo elétrico, os níveis de transcrição dos hormônios analisados foram mais elevados do que os apresentados por anfíbios que entraram em contato com os microrganismos e por aqueles do grupo controle negativo, com exceção dos hormônios insulina e VIP. Quanto aos anfíbios que permaneceram em contato com bactéria Gram-negativa, os resultados sugerem uma redução nos níveis de transcrição dos genes que codificam a calcitonina, a gastrina e o VIP, e um aumento naquele que codifica a resistina, quando comparados ao controle negativo. Dentre os anfíbios que permaneceram em contato com bactéria Gram-positiva, houve um aumento nos níveis de transcrição apenas do gene que codifica a gastrina.

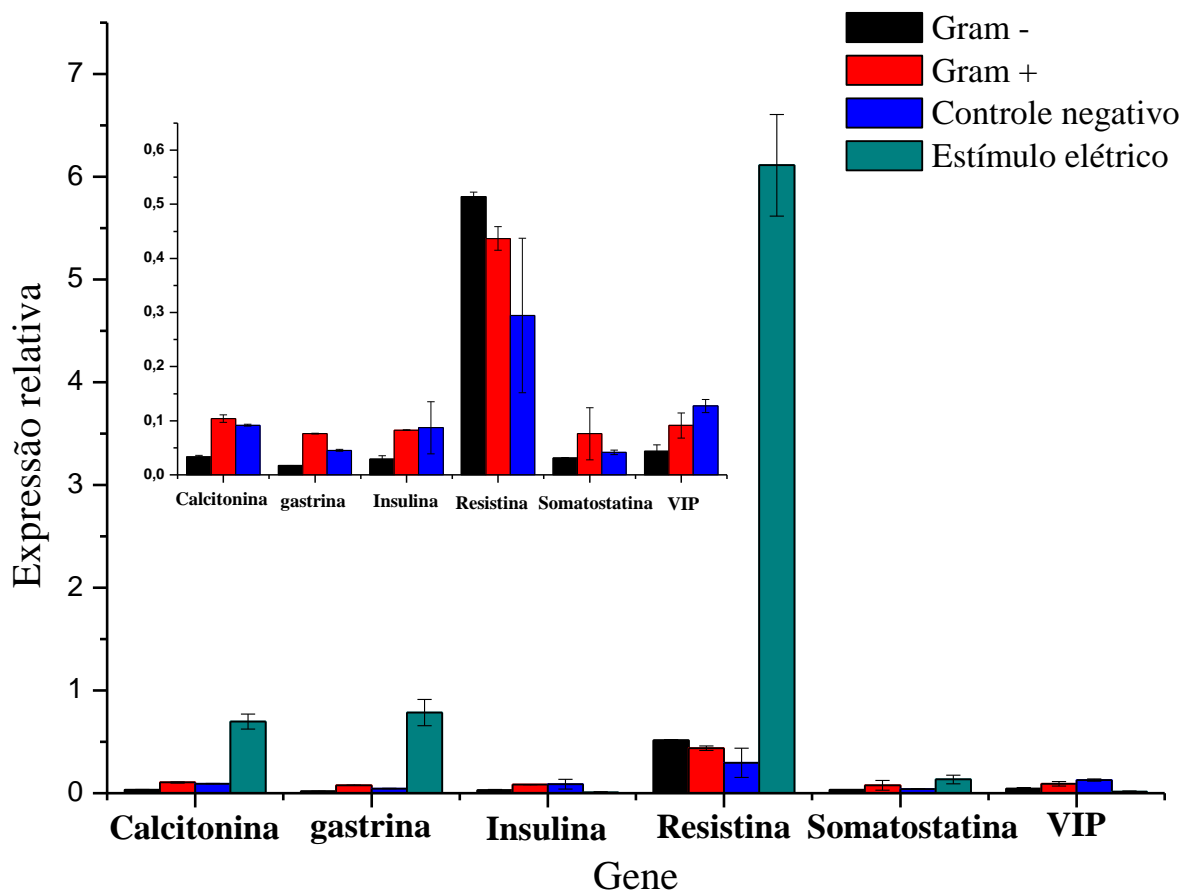


Figura 12. Níveis de transcrição de genes que codificam hormônios em *P. azurea* após o contato com microrganismos. Os níveis de expressão estão expressos em unidades arbitrárias. Os animais ficaram expostos por um período de 24 horas. Estímulo elétrico compreende animais que sofreram apenas o esvaziamento das glândulas e não foram expostos a nenhum outro tratamento, mas que permaneceram em ambiente não esterilizado. O controle negativo compreende animais que foram banhados apenas com a solução NaCl 0,6%. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica a proteína actina. As barras horizontais representam os desvios padrões médios (três repetições). O gráfico interno representa os resultados sem os dados alusivos ao estímulo elétrico.

6.5. MONITORAMENTO DO CONTEÚDO DA SECREÇÃO GLANDULAR de *P. azurea* DURANTE A METAMORFOSE

6.5.1. MALDI-IMAGING

Ninhos de *P. azurea* foram capturados e o desenvolvimento dos ovos ocorreu em laboratório. Anfíbios em diferentes estágios de metamorfose, incluindo animais adultos (capturados no campo), foram submetidos a experimento visando o mapeamento de íons situados no tecido cutâneo (MALDI-*Imaging*) com o objetivo de avaliar o padrão de maturação glandular, no que diz respeito à porcentagem da pele ocupada por peptídeos, ao conjunto de moléculas presentes em glândulas individuais e ao padrão de expressão molecular apresentado por diferentes glândulas espalhadas pelo tecido cutâneo. Dessa maneira, cada molécula identificada foi analisada quanto ao seu grau de colocalização com os demais íons presentes, permitindo assim, inferir sobre o padrão de expressão existente entre diferentes glândulas granulares. Foram analisados os estágios 37, 41, 43 (momento no qual o anfíbio abandona o hábito aquático e passa a viver em substrato firme), 44, 46 e adulto.

As aquisições realizadas a partir do tecido cutâneo de *P. azurea* em diferentes estágios de desenvolvimento permitiram o mapeamento de 129 íons (Tabela 13), numerados em ordem crescente de massa molecular, dentre os quais, 105 íons já tiveram sua estrutura primária caracterizada. Apesar de não ter sido possível a caracterização de todos os íons, o número daqueles cuja estrutura já foi elucidada já permite inferir se o padrão de colocalização apresentado nos experimentos representa alguma informação biológica importante. Para facilitar a visualização, a partir daqui, considera-se as ambiguidades Q/K e I/L resolvidas apenas para as estruturas que já tiveram seu precursor caracterizado.

Tabela 13. Peptídeos identificados nos experimentos de MALDI-*Imaging*, numerados em ordem crescente de massa molecular.

Íon	Massa Média	Peptídeo*	Modificação	Ionização com aduto	Caracterização do precursor	Massa média teórica	Apenas precursor
1	647	–	–	–	–	–	–
2	658	FPPWL	Amidação N-terminal	–	X	658,8039	–
3	662	–	–	–	–	–	–
4	674	FPPWE	Amidação N-terminal	–	–	674,7602	–
5	681	FPPWL	Amidação N-terminal	Na	X	680,79	–
6	691	FPPWF	Amidação N-terminal	–	–	692,8202	–
7	697	FPPWL	Amidação N-terminal	K	X	696,902	–
8	719	–	–	–	–	–	–
9	729	FPPLAW	–	–	X	730,8667	X
10	735	IPHAINA	–	–	X	735,8451	–
11	744	–	–	–	–	–	–
12	758	IPHAINA	–	Na	X	757,8349	–
13	762	–	–	–	–	–	–
14	773	IPHAINA	–	K	X	773,9434	–
15	785	–	–	–	–	–	–
16	803	YAFGYPS	–	–	X	804,8591	–
17	810	KPPWRL	3-hidroxiprolina/ Amidação N-terminal	–	–	811,46	–
18	839	VPPIGWF	–	Na	–	838,9611	–
19	853	VPPIGWF	–	K	–	855,0696	–
20	868	RPPVFRP	–	–	–	869,0302	–
21	883	VPPGFTPF	–	Na	X	883,9865	–
22	894	VSAIAKHF	Amidação N-terminal	K	X	894,0295	–
23	909	VSAIAKHF	Amidação N-terminal	Na	X	910,1381	–
24	940	RPPGFTPF	–	Na	X	941,0516	–
25	957	RPPGFTPF	–	K	X	9570,516	–

26	972	FPAPFLFL	-	Na	-	974,1524	-
27	981	RPPSWIPK	-	-	-	981,1659	-
28	997	RPPSWIPK	3-hidroxirolina	-	-	997,2084	-
29	1019	RPPSWIPK	-	K	-	1019,1276	-
30	1034	RPPSWIPK	3-hidroxirolina	K	-	1035,1701	-
31	1049	-	-	-	-	-	-
32	1088	-	-	-	-	-	-
33	1112	RPPGFTPFRR	3-hidroxirolina	Na	X	1113,2699	-
34	1128	RPPGFTPFRR	3-hidroxirolina	K	X	1129,3784	-
35	1146	VPPGFTPFRRQ	Transcriptoma	-	X	1145,3124	-
36	1164	VPPGFTPFRRQ	2-hidroxirolina	-	X	1162,3549	-
37	1214	IPHAINAVSAIA	-	K	X	1.215.466	-
38	1224	VMYSLRPV	Amidação N-terminal	-	-	1224,4901	-
39	1233	VPPGFTPFRLT	-	-	-	1232,4448	-
	1233	LRPAVLRPKGQ	-	-	-	1233,5102	-
	1233	VPPGFTPFRRQS	-	-	X	1233,3898	-
40	1242	AINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	-	-	1241,4567	-
41	1249	VPPGFTPFRRQS	2-hidroxirolina	-	X	1249,4323	-
42	1257	LRPAVIRPKGK	Amidação N-terminal	Na	-	1256,5445	-
43	1272	VPPGFTPFRRVD	2-hidroxirolina	Na	-	1270,4334	-
44	1281	AINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	K	X	1279,4184	-
45	1297	-	-	-	-	-	-
46	1336	RPPGFSPFRIY	-	-	X	1336,716	-
47	1350	RPPGFTPFRIY	-	-	X	1351,5692	-
48	1364	EEDFDLPWGKK	-	-	X	1364,4735	X
49	1386	EEDFDLPWGKK	-	Na	X	1386,463	X
50	1396	-	-	-	-	-	-
51	1401	HAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	Na	X	1400,5855	-
52	1437	RPPGFSPFRIY	-	-	-	1437,5426	-

53	1498	QQGEGGPYGGLSPLR	Ácido piroglutâmico N-terminal	-	X	1499,6222	-
54	1507	-	-	-	-	-	-
55	1519	LRPAILVRVKGKGL	Amidação N-terminal	-	X	1519,9385	-
56	1530	FLFFNFPHPLGR	-	K	-	1530,7006	-
57	1548	FLFFAFPHPLGR	-	-	-	1449,7141	-
58	1558	LRPAILVRVKGKGL	Amidação N-terminal	K	X	1557,9002	-
59	1588	IPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	-	X	1588,8696	-
60	1601	QDKPFWPPPIYPM	Ácido piroglutâmico N-terminal	-	-	1599,865	-
61	1610	IPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	Na	X	1610,8588	-
62	1626	IPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	K	X	1626,8313	-
63	1638	FLSLIPHAINAVSAIA	-	-	X	1637,9354	-
64	1644	SYLGHYGGPVQKLHS	Amidação N-terminal	-	-	1642,8389	-
65	1656	IPHAINAVSTLVHHF	Amidação N-terminal	-	X	1555,9159	-
66	1679	IPHAINAVSTLVHHF	Amidação N-terminal	Na	X	1677,905	-
67	1694	IPHAINAVSTLVHHF	Amidação N-terminal	K	X	1593,8776	-
68	1719	SLIPAAISAVSALANHF	Amidação N-terminal	K	X	1719,91	-
69	1734	QQGEGGPYGGLSPLRFS	Ácido piroglutâmico N-terminal	-	X	1733,8506	-
70	1749	TIKQKGKEAAIAAKAAG	-	Na	X	1750,0077	-
71	1757	QQGEGGPYGGLSPLRFS	-	Na	X	1755,8123	-
72	1765	TIKQKGKEAAIAAKAAG	-	K	X	1765,9802	-
73	1772	QQGEGGPYGGLSPLRFS	Ácido piroglutâmico N-terminal	K	X	1771,979	-
74	1788	SLIPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	-	X	1789,105	-
75	1811	SLIPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	Na	X	1811,0942	-
76	1820	TIKNVGKEAAIAAGKAALG	-	K	X	1822,1802	-
77	1827	SLIPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	K	X	1827,0667	-
78	1836	-	-	-	-	-	-
79	1863	-	-	-	-	-	-
80	1879	SLIPHAINAVSTLVHHF	Amidação N-terminal	Na	X	1878,1505	-

81	1894	SLIPHAINAVSTLVVHHF	Amidação N-terminal	K	X	1894,113	-
82	1924	WSTIKNVGKEAAIAAGKAA	-	K	X	1925,2887	-
83	1941	FLSLIPAAISAVSALANHF	Amidação N-terminal	-	X	1942,0883	-
84	1956	FLSLLPSLVSGAVSLVKIL	Amidação N-terminal	-	-	1956,4314	-
85	1965	FLSLLPSLVSGAVSLAKKL	Amidação N-terminal	Na	X	1965,382	-
	1965	FLSLIPAAISAVSALADHF	Amidação N-terminal	Na	-	1965,2544	-
86	1981	FLSLLPSLVSGAVSLAKKL	Amidação N-terminal	K	X	1981,3545	-
	1981	FLSLIPAAISAVSALADHF	Amidação N-terminal	K	-	1981,2269	-
87	1994	FLSLLPSLVSGAVSLVKIL	Amidação N-terminal	K	-	1994,5297	-
88	2013	FLSLLPTALNAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	-	-	2013,4016	-
89	2035	FLSLIPTAINAVSALAKHF	Amidação N-terminal	Na	-	2035,3914	-
90	2050	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	-	X	2049,4372	-
91	2062	GLWSTIKNVATAAGKAVLGAL	Amidação N-terminal	Na	-	2063,4032	-
92	2071	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	Na	X	2071,4264	-
93	2088	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	K	X	2087,3989	-
94	2100	-	-	-	-	-	-
95	2116	FLSLIPHAINAVSTLVVHHF	Amidação N-terminal		X	2116,4835	-
96	2139	FLSLIPHAINAVSTLVVHHF	Amidação N-terminal	Na	X	2138,4727	-
97	2155	FLSLIPHAINAVSTLVVHHF	Amidação N-terminal	K	X	2154,4452	-
98	2177	-	-	-	-	-	-
99	2241	WSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	-	X	2240,621	-
100	2262	WSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	Na	X	2262,6102	-
101	2279	WSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	K	X	2278,5827	-
102	2391	TIKQKGKEAAIAAAGAAGKAPSGAI	Amidação N-terminal	K	-	2389,7265	-
103	2411	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	-	X	2410,8304	-
104	2420	GLWSKIKAVAAAAGKAALGAVNEAL	Amidação N-terminal	K	X	2418,9027	X
105	2433	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	Na	X	2432,8202	-
106	2450	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	K	X	2448,7921	-
107	2560	-	-	-	-	-	-
108	2575	GLWKLLAKGAGKMLGHVASKILGPK	Amidação N-terminal	-	X	2574,2039	X

109	2613	GLWKLLAKGAGKMLGHVASKILGPK	Amidação N-terminal	K	X	2612,3022	X
110	2633	-	-	-	-	-	-
111	2648	WSTIKQKGKEAAIAAAKAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	Na	X	2647,1286	-
112	2663	WSTIKQKGKEAAIAAAKAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	K	X	2663,2371	-
113	2699	-	-	-	-	-	-
114	2794	GLWSTIKQKGKEAAIAAAKAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	-	X	2795,262	-
115	2817	GLWSTIKQKGKEAAIAAAKAAGQAALGAL	Amidação N-terminal	Na	X	2817,2512	-
116	2833	GLWSTIKQKGKEAAIAAAKAAGQAALGAL	Amidação N-terminal	K	X	2833,2237	-
117	2892	-	-	-	-	-	-
118	2908	GLWKSLLKNVGAAGKAALNAVTDMVNQ	-	K	-	2908,4479	-
119	2960	-	-	-	-	-	-
120	2983	-	-	-	-	-	-
121	2998	-	-	-	-	-	-
122	3122	-	-	-	-	-	-
123	3138	-	-	-	-	-	-
124	3151	ALWKDVLKKIGTVALHAGKAAFCAAADTIS Q	Amidação N-terminal	-	X	3152,6512	X
125	3262	GLWSTIKQKGKEAAIAAAKAAGKAVLNAAS EAL	Amidação N-terminal	Na	-	3261,7473	-
126	3276	GLWSTIKQKGKEAAIAAAKAAGKAVLNAAS EAL	Amidação N-terminal	K	-	3274,8	-
127	3292	GLWSTIKQKGKEAAIAAAKAAGKAVLNSAS EAI	Amidação N-terminal	K	X	3290,92	-
128	3377	ALWKDVLKKIGTVALHAGKAAFCAAADTIS QGGG	Amidação N-terminal	Na	X	3376,8366	-
129	3393	ALWKDVLKKIGTVALHAGKAAFCAAADTIS QGGG	Amidação N-terminal	K	X	3392,9451	-

* As ambiguidades Q/K e I/L estão resolvidas apenas para as estruturas que já tiveram seu precursor caracterizado

A área total ocupada pelos íons identificados a partir das aquisições de MALDI-*Imaging* foi calculada (Figura 13). Os íons puderam ser identificados apenas a partir do estágio 41. A partir desse estágio, os resultados demonstram um aumento gradual da área contendo íons em concentrações suficientes àquelas necessárias para que sejam detectados pelo equipamento. Observa-se que a área do tecido cutâneo ocupada por íons no indivíduo adulto é pouco maior do que a ocupada pelo animal jovem o qual já deu por finalizada a metamorfose.

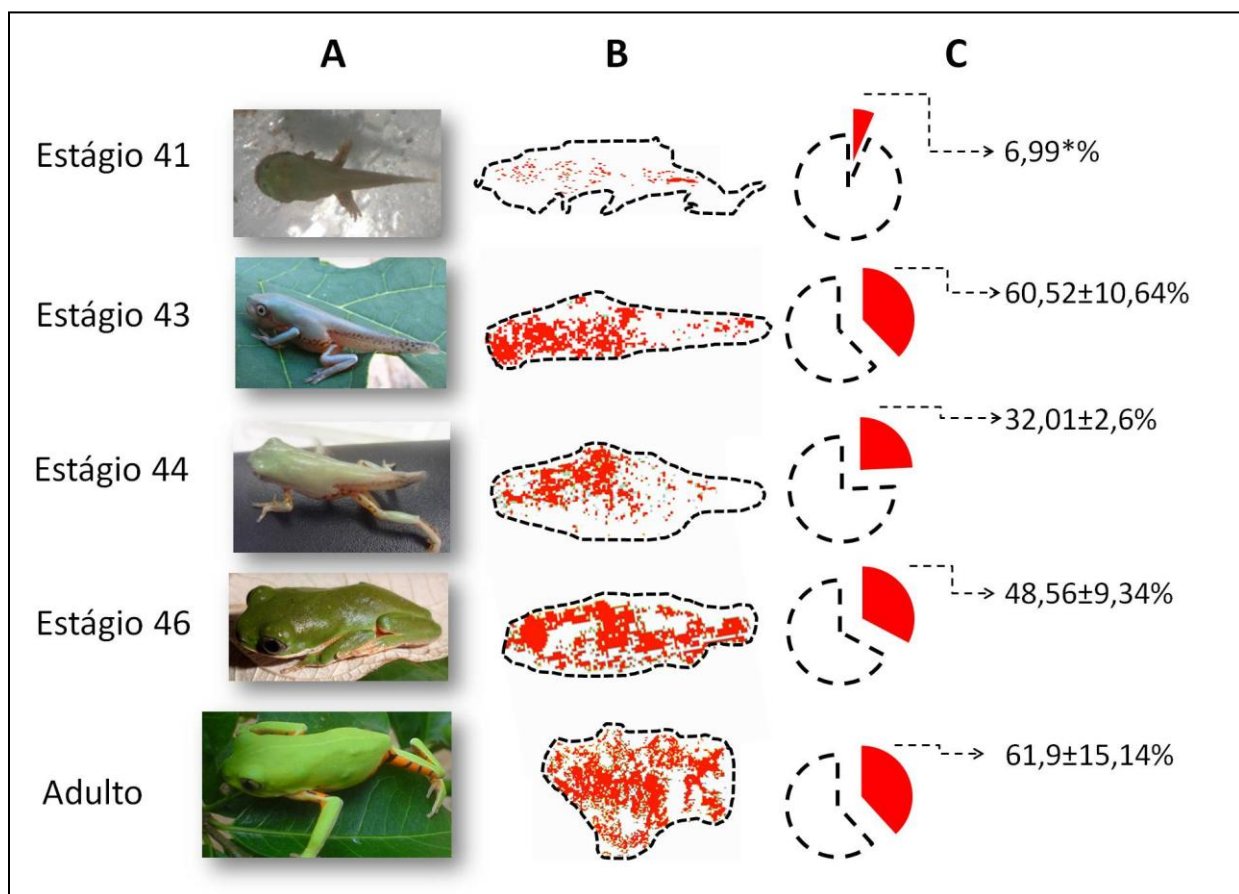


Figura 13. Porcentagem da área ocupada por íons identificados no tecido cutâneo de *P. azurea* em diferentes estágios de desenvolvimento utilizando a técnica de MALDI-*Imaging*. (A) Estágio de desenvolvimento; (B) distribuição espacial dos íons no tecido dorsal analisado; (C) porcentagem da pele ocupada por íons. A barra de cor indica a intensidade dos íons presentes na pele. O experimento foi realizado em triplicata. O sinal \pm representa o desvio padrão. *no tecido de apenas um dos anfíbios no estágio 41 de desenvolvimento foi possível a identificação de moléculas por MALDI-*Imaging*.

Dentre os estágios de desenvolvimento analisados, íons puderam ser identificados, utilizando a técnica de *MALDI-Imaging*, somente a partir do estágio 41. Ainda, assim, apenas o íon m/z 697 foi identificado nesse estágio de desenvolvimento (Figura 14) o qual representa o peptídeo FPPWL-NH₂ ligado ao íon potássio.

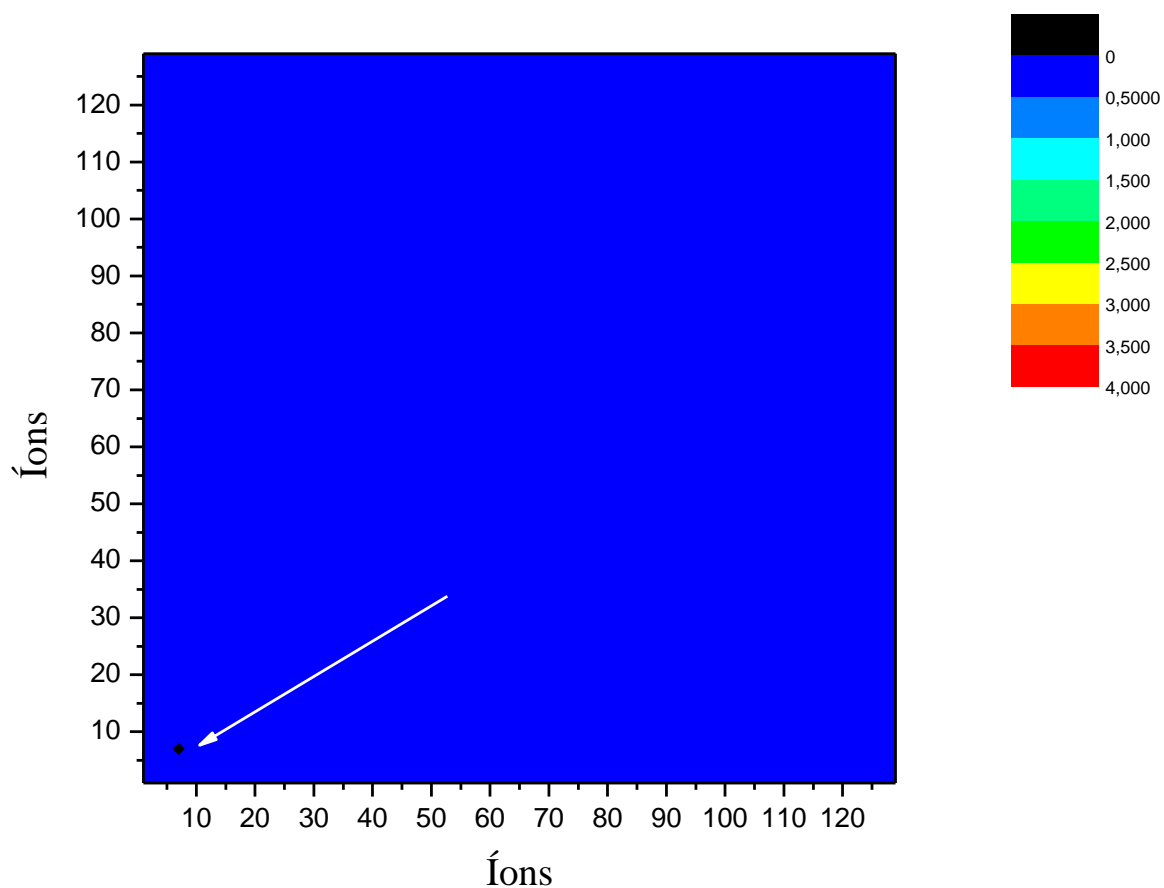


Figura 14. Intensidade de colocalização dos íons identificados a partir das aquisições de *MALDI-Imaging* em tecido dorsal de *P. azurea* no estágio 41 de desenvolvimento. A barra de cor determina o nível de colocalização apresentado por cada par de íons. A seta branca indica o único ponto na figura que representa uma colocalização identificada nesse estágio de desenvolvimento. Nesse estágio, foi possível a identificação de moléculas apenas em um tecido, dentre os três analisados.

A partir do estágio 43 de desenvolvimento (Figura 15), surgem diversos outros íons apresentando diferentes graus de colocalização no tecido cutâneo de *P. azurea*. Os íons

mapeados sempre exibiram colocalização com, pelo menos, outro íon presente nas análises. Os padrões de colocalização de íons caracterizados em anfíbios nos estágios 44 (Figura 16) e 46 (Figura 17) de desenvolvimento apresentam um número de íons que cresce à medida que a metamorfose avança.

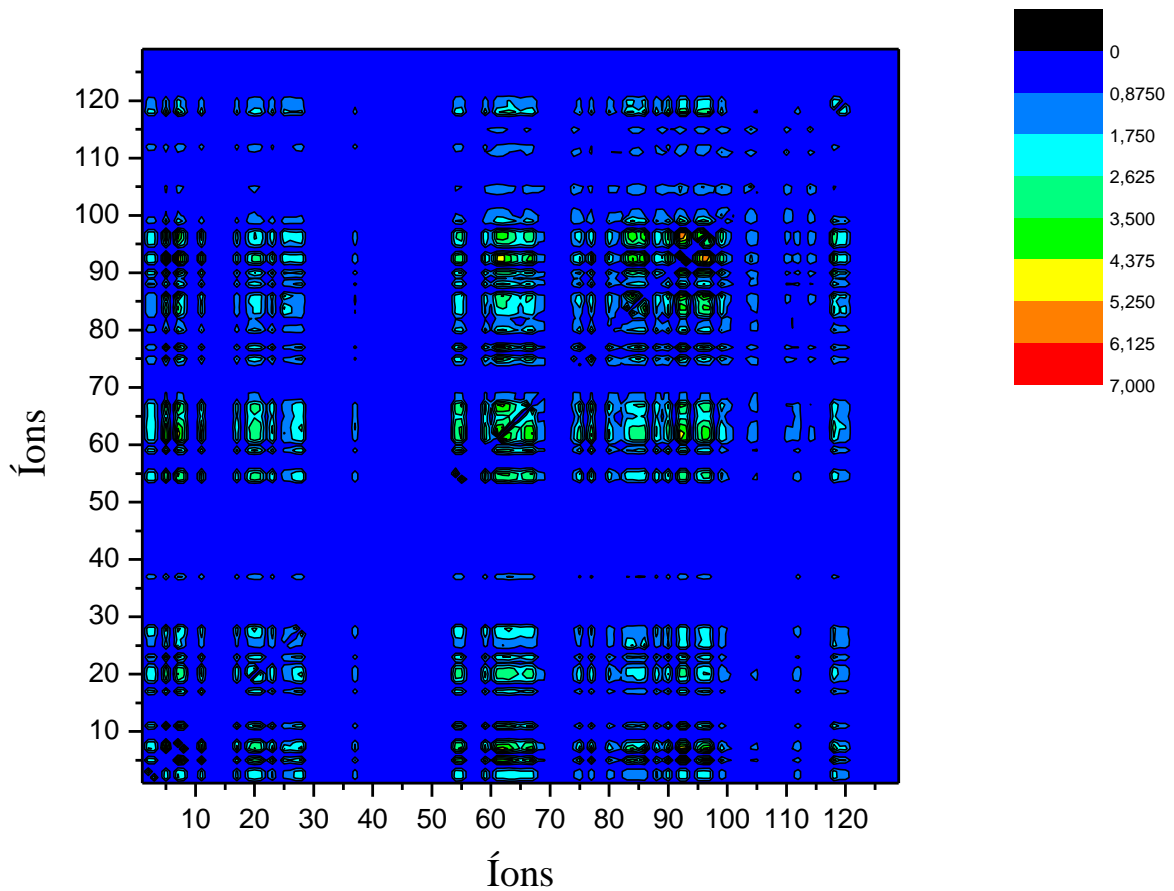


Figura 15. Intensidade de colocalização dos íons identificados a partir das aquisições de MALDI-*Imaging* em tecido dorsal de *P. azurea* no estágio 43 de desenvolvimento. Os resultados representam a média das aquisições realizadas a partir de três tecidos distintos. A barra de cor determina o nível de colocalização apresentado por cada par de íons.

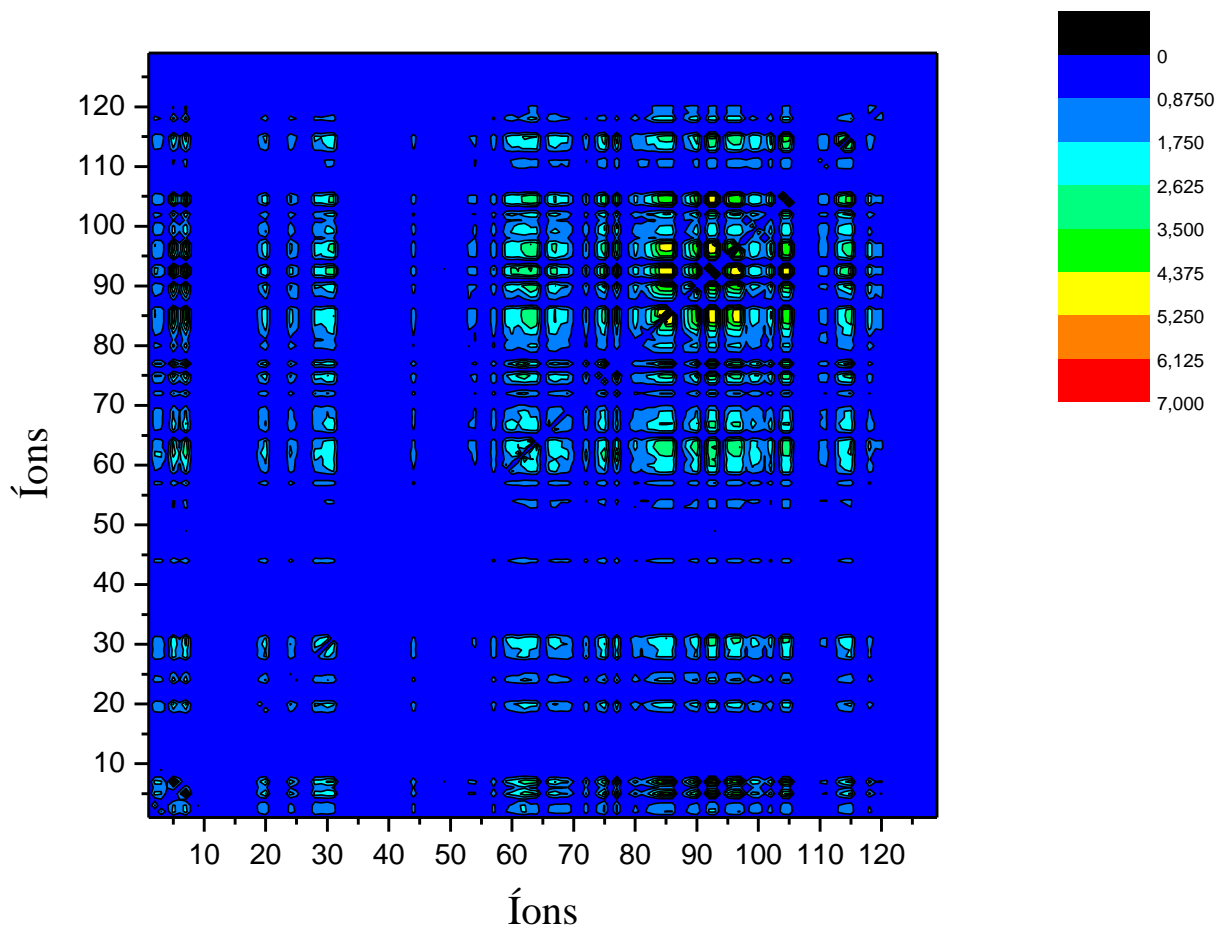


Figura 16. Intensidade de colocalização dos íons identificados a partir das aquisições de MALDI-*Imaging* em tecido dorsal de *P. azurea* no estágio 44 de desenvolvimento. Os resultados representam a média das aquisições realizadas a partir de três tecidos distintos. A barra de cor determina o nível de colocalização apresentado por cada par de íons.

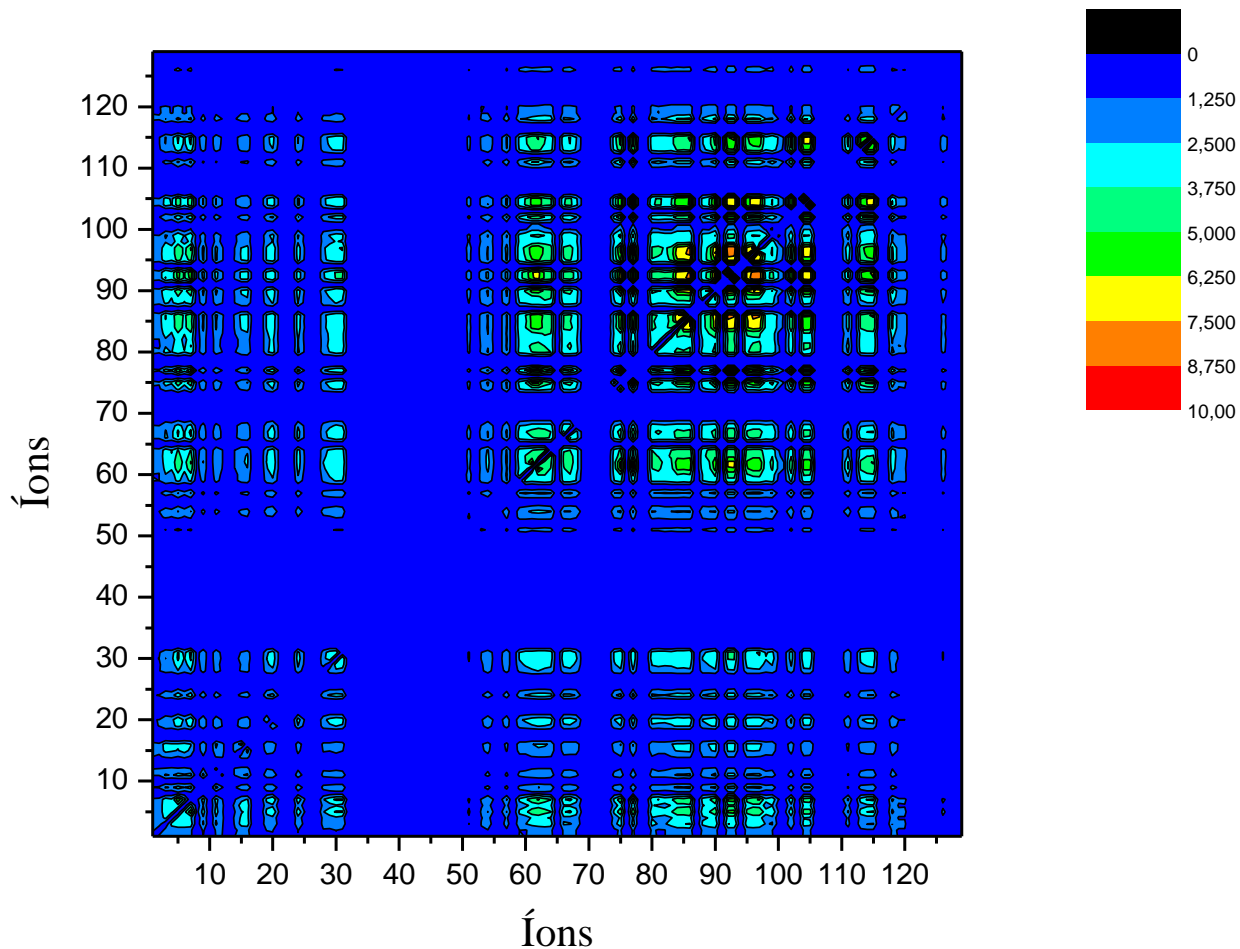


Figura 17. Intensidade de colocalização dos íons identificados a partir das aquisições de MALDI-*Imaging* em tecido dorsal de *P. azurea* no estágio 46 de desenvolvimento. Os resultados representam a média das aquisições realizadas a partir de três tecidos distintos. A barra de cor determina o nível de colocalização apresentado por cada par de íons.

O perfil de colocalização de íons apresentado a partir das aquisições realizadas em animais adultos de *P. azurea* (Figura 18) demonstra um padrão diferente daquele exibido pelos animais considerados jovens (estágio 46 de desenvolvimento). Isso pode ser evidenciado no perfil de colocalização de íons apresentado a partir das análises do animal adulto o qual apresenta um número maior de íons, os quais possuem níveis de colocalização mais elevados e, principalmente, pela ausência dos íons 33 a 50 nos anfíbios em metamorfose, os quais correspondem majoritariamente, de acordo com a Tabela 13, aos peptídeos relacionados às bradigininas.

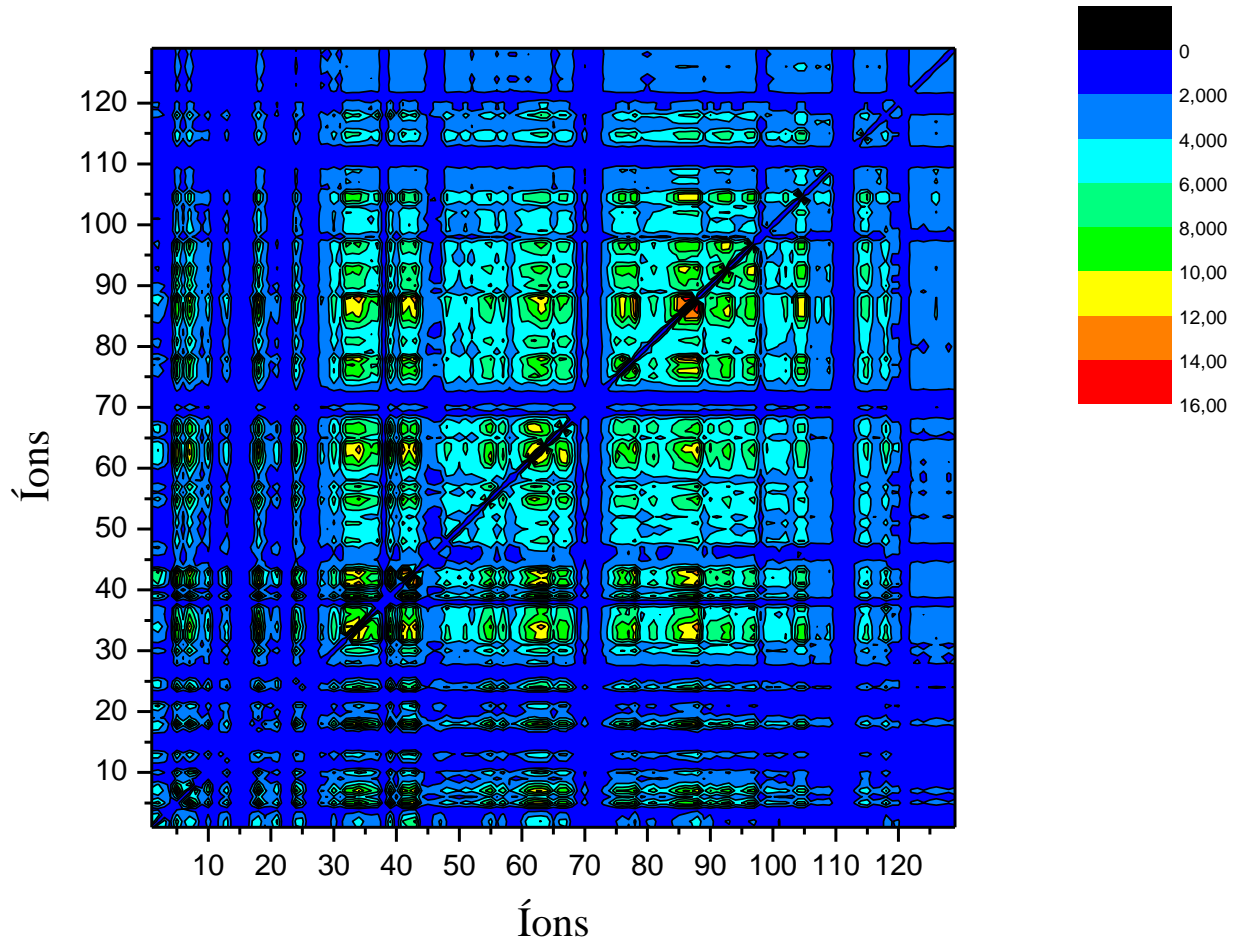


Figura 18. Intensidade de colocalização dos íons identificados a partir das aquisições de MALDI-*Imaging* em tecido dorsal de *P. azurea*, animais adultos. Os resultados representam a média das aquisições realizadas a partir de três tecidos distintos. A barra de cor determina o nível de colocalização apresentado por cada par de íons.

Os dados de MALDI-*Imaging* permitiram calcular, ainda, a porcentagem de ocupação de cada íon analisado nas glândulas ativas dos animais adultos da espécie *P. azurea*, ou seja, nas quais pelo menos um íon foi identificado e não em relação à área total dos tecidos que foram submetidos à análise. Dessa maneira, observa-se diante dos resultados (Tabela 14) que as glândulas possuem um conteúdo heterogêneo de peptídeos. Com exceção das filoseptinas e da triptofilina, as quais estão presentes em praticamente todas as glândulas ativas, os demais peptídeos encontram-se presentes apenas em uma parcela das glândulas granulares.

Tabela 14. Porcentagem média de ocupação dos peptídeos nas glândulas ativas localizadas no tecido cutâneo dorsal de *P. azurea* em fase adulta (n=3).

Íon	Massa	Peptídeo	Modificação	Ionização com aduto	Presença nas glândulas ativas (%)	Desvio (%)
1	647	-	-	-	18,11	11,14
2	658	FPPWL	Amidação N-terminal	-	25,76	16,55
3	662	-	-	-	14,94	8,90
4	674	FPPWE	Amidação N-terminal	-	17,22	10,51
5	681	FPPWL	Amidação N-terminal	Na	88,92	3,50
6	691	FPPWF	Amidação N-terminal	-	30,03	6,34
7	697	FPPWL	Amidação N-terminal	K	99,90	0,69
8	719	-	-	-	35,41	12,55
9	729	FPPLAW	-	-	21,22	3,17
10	735	IPHAINA	-	-	39,64	4,96
11	744	-	-	-	14,03	8,26
12	758	IPHAINA	-	Na	14,83	8,82
13	762	-	-	-	32,06	0,19
14	773	IPHAINA	-	K	14,03	8,26
15	785	-	-	-	-	-
16	803	YAFGYPS	-	-	-	-
17	810	KPPWRL	3-hidroxiprolina/Amidação N-terminal	-	14,24	9,01
18	839	VPPIGWF	-	Na	50,18	11,09
19	853	VPPIGWF	-	K	24,08	2,32
20	868	RPPVFRP	-	-	17,21	11,11
21	883	VPPGF'PF	-	Na	19,88	13,00
22	894	VSAIAKHF	Amidação N-terminal	Na	13,60	8,56
23	909	VSAIAKHF	Amidação N-terminal	Na	13,60	8,56

24	940	RPPGF ^T PF	–	Na	41,93	9,43
25	957	RPPGF ^T PF	–	K	20,55	13,47
26	972	FPAPFLFL	–	Na	13,60	8,56
27	981	RPPSWIPK	–	–	13,60	8,56
28	997	RPPSWIPK	3-hidroxirolina	–	31,12	1,94
29	1019	RPPSWIPK	–	K	25,16	1,36
30	1034	RPPSWIPK	3-hidroxirolina	K	38,21	2,33
31	1049	–	–	–	30,18	0,34
32	1088	–	–	–	81,94	1,36
33	1112	RPPGF ^T PFR	3-hidroxirolina	Na	61,80	4,06
34	1128	RPPGF ^T PFR	3-hidroxirolina	K	79,45	3,22
35	1146	VPPGF ^T PFRQ	Transcriptoma	–	52,87	2,43
36	1164	VPPGF ^T PFRQ	2-hidroxirolina	–	41,08	2,65
37	1214	IPHAINAVSAIA	–	K	42,61	5,48
38	1224	VMYSLPRPV	Amidação N-terminal	–	13,48	8,48
39	1233	VPPGF ^T PFR ^L T	–	–	43,23	6,95
40	1242	AINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	–	21,53	13,91
41	1249	VPPGF ^T PFRQS	2-hidroxirolina	–	66,10	6,62
42	1257	LRPAVIRPKGK	Amidação N-terminal	Na	48,95	5,56
43	1272	VPPGF ^T PFRVD	2-hidroxirolina	Na	77,61	2,48
44	1281	AINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	K	27,46	18,10
45	1297	–	–	–	15,11	9,37
46	1336	RPPGFSPFRIY	–	–	21,71	2,55
47	1350	RPPGF ^T PFRIY	–	–	17,29	11,17
48	1364	EEDFDLPWGKK	–	–	36,57	0,17
49	1386	EEDFDLPWGKK	–	Na	29,01	2,44
50	1396	–	–	–	23,26	4,40
51	1401	HAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	Na	34,48	0,03
52	1437	RPPGFSPFRIY	–	–	28,48	11,59

53	1498	QQGEGGPYGGLSPLR	Ácido piroglutâmico N-terminal	–	20,38	13,10
54	1507	–	–	–	29,38	7,01
55	1519	LRPAILVVRVKGKGL	Amidação N-terminal	–	46,86	2,11
56	1530	FLFFNFPHPLGR	–	K	43,37	9,26
57	1548	FLFFAFPHPLGR	–	–	26,85	9,32
58	1558	LRPAILVVRVKGKGL	Amidação N-terminal	K	33,94	0,20
59	1588	IPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	–	19,94	10,00
60	1601	QDKPFWPPPIYPM	Ácido piroglutâmico N-terminal	–	29,16	9,91
61	1610	IPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	Na	36,47	6,15
62	1626	IPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	K	79,80	8,61
63	1638	FLSLIPHAINAVSAIA	–	–	68,69	14,22
64	1644	SYLGHYGGPVQKLHS	Amidação N-terminal	–	59,30	7,27
65	1656	IPHAINAVSTLVHFF	Amidação N-terminal	–	38,37	5,61
66	1679	IPHAINAVSTLVHFF	Amidação N-terminal	Na	52,06	11,05
67	1694	IPHAINAVSTLVHFF	Amidação N-terminal	K	61,54	11,81
68	1719	SLIPAAISAVSALANHF	Amidação N-terminal	K	47,63	0,33
69	1734	QQGEGGPYGGLSPLRFS	Ácido piroglutâmico N-terminal	–	36,15	7,66
70	1749	TIKQKGKEAAIAAACAAG	–	Na	35,93	4,88
71	1757	QQGEGGPYGGLSPLRFS	–	Na	34,33	6,37
72	1765	TIKQKGKEAAIAAACAAG	–	K	21,89	14,43
73	1772	QQGEGGPYGGLSPLRFS	Ácido piroglutâmico N-terminal	K	36,49	5,09
74	1788	SLIPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	–	39,58	2,91
75	1811	SLIPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	Na	73,84	1,34
76	1820	TIKNVGKEAAIAAGKAALG	–	K	70,53	4,22
77	1827	SLIPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	K	85,98	0,59
78	1836	–	–	–	82,80	3,25
79	1863	–	–	–	30,15	9,52

80	1879	SLIPHAINAVSTLVHFF	Amidação N-terminal	Na	38,30	9,19
81	1894	SLIPHAINAVSTLVHFF	Amidação N-terminal	K	50,93	6,80
82	1924	WSTIKNVGKEAAIAAGKAA	–	K	37,16	5,46
83	1941	FLSLIPAAISAVSALANHF	Amidação N-terminal	–	43,02	1,16
84	1956	FLSLLPSLVSGAVSLVKIL	Amidação N-terminal	–	56,47	4,95
85	1965	FLSLLPSLVSGAVSLAKKL	Amidação N-terminal	Na	83,98	8,42
86	1981	FLSLLPSLVSGAVSLAKKL	Amidação N-terminal	K	90,22	4,01
87	1994	FLSLLPSLVSGAVSLVKIL	Amidação N-terminal	K	74,10	6,92
88	2013	FLSLLPTALNAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	–	87,97	4,41
89	2035	FLSLIPTAINAVSALAKHF	Amidação N-terminal	Na	70,86	16,51
90	2050	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	–	63,43	1,42
91	2062	GLWSTIKNVATAAGKAVLGAL	Amidação N-terminal	Na	61,39	2,87
92	2071	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	Na	94,91	3,60
93	2088	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	Amidação N-terminal	K	98,11	1,34
94	2100	–	–	–	49,26	1,90
95	2116	FLSLIPHAINAVSTLVHFF	Amidação N-terminal		51,25	0,51
96	2139	FLSLIPHAINAVSTLVHFF	Amidação N-terminal	Na	78,58	4,97
97	2155	FLSLIPHAINAVSTLVHFF	Amidação N-terminal	K	84,27	0,95
98	2177	–	–	–	28,86	9,34
99	2241	WSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	–	22,92	15,15
100	2262	WSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	Na	35,06	7,96
101	2279	WSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	K	41,48	6,03
102	2391	TIKQKGKEAAIAAAGAAGKAPSGAI	Amidação N-terminal	K	34,02	7,80
103	2411	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	–	46,03	0,99
104	2420	GLWSKIKAVAAAAGKAALGAVNEAL	Amidação N-terminal	K	44,95	2,03
105	2433	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	Na	52,45	3,25
106	2450	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	K	79,85	11,07
107	2560	–	–	–	16,36	9,30
108	2575	GLWKLLAKGAGKMLGHVASKILGPK	Amidação N-terminal	–	27,57	17,23
109	2613	GLWKLLAKGAGKMLGHVASKILGPK	Amidação N-terminal	K	23,39	14,28

110	2633	-	-	-	23,48	14,34
111	2648	WSTIKQKGKEAAIAAACAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	Na	9,50	4,36
112	2663	WSTIKQKGKEAAIAAACAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	K	4,03	1,79
113	2699	-	-	-	-	-
114	2794	GLWSTIKQKGKEAAIAAACAAGKAALGAL	Amidação N-terminal	-	12,34	6,46
115	2817	GLWSTIKQKGKEAAIAAACAAGQAALGAL	Amidação N-terminal	Na	25,88	11,61
116	2833	GLWSTIKQKGKEAAIAAACAAGQAALGAL	Amidação N-terminal	K	33,26	6,52
117	2892	-	-	-	22,84	13,88
118	2908	GLWKSLLKNVGVAAGKAALNAVTDMVNQ	-	K	26,37	16,38
119	2960	-	-	-	18,24	1,83
120	2983	-	-	-	18,24	1,83
121	2998	-	-	-	10,25	6,19
122	3122	-	-	-	24,22	2,26
123	3138	-	-	-	30,61	6,78
124	3151	ALWKDVLKKIGTVALHAGKAAFCAAADTISQ	Amidação N-terminal	-	23,10	1,46
125	3262	GLWSTIKQKGKEAAIAAACAAGKAVLNAASEAL	Amidação N-terminal	Na	23,37	1,66
126	3276	GLWSTIKQKGKEAAIAAACAAGKAVLNAASEAL	Amidação N-terminal	K	23,37	1,66
127	3292	GLWSTIKQKGKEAAIAAACAAGKAVLNSASEAI	Amidação N-terminal	K	23,37	1,66
128	3377	ALWKDVLKKIGTVALHAGKAAFCAAADTISQGGG	Amidação N-terminal	Na	23,84	1,99
129	3393	ALWKDVLKKIGTVALHAGKAAFCAAADTISQGGG	Amidação N-terminal	K	31,03	7,07

A média da porcentagem de colocação apresentada por cada par de íons investigados nos animais adultos foi igual a $21,4 \pm 19,8$, ao passo que o valor mínimo foi igual a zero e o máximo igual a 100% de colocação. Dessa maneira, a maioria dos peptídeos presentes na pele dos animais adultos analisados apresenta baixos níveis de colocação com os demais, indicando, mais uma vez, que nem todas as glândulas produzem o mesmo arsenal de moléculas indefinidamente, ao menos.

Ainda se tratando dos animais adultos, os íons cujas estruturas dos peptídeos já foram caracterizadas (Tabela 13) foram separados de acordo com as classes de peptídeos em tabelas nas quais os valores de porcentagem de colocação apresentados por eles são apresentados. Dessa maneira, as colocações apresentadas pelas filoseptinas, bradicininas, dermaseptinas, triptofilinas e demais peptídeos estão representadas, respectivamente, nas Tabelas 15-19.

Os resultados permitem inferir que apenas as bradicininas e as filoseptinas são razoavelmente bem localizadas. Além disto, observa-se que o produto de diferentes clivagens enzimáticas de um mesmo peptídeo que resultam em diferentes peptídeos truncados também não apresentam níveis altos de colocação.

Tabela 15. Porcentagem de colocalização apresentada por filoseptinas no tecido cutâneo dos animais adultos de *P. azurea*. Os valores que representam mais de 50% de colocalização apresentam-se em destaque.

Íon	Massa média	Sequência	Colocalização (%)																		
			IPHAINA	IPHAINA+Na	IPHAINAVSAIA+K	AINAVSAIAKHF	AINAVSAIAKHF+K	IPHAINAVSAIAKHF	IPHAINAVSAIAKHF+Na	IPHAINAVSAIAKHF+K	FLSLIPHAINAVSAIA	IPHAINAVSTLVHHF									
10	735	IPHAINA																			
12	758	IPHAINA+Na		11,03																	
37	1214	IPHAINAVSAIA+K		26,79	15,51																
40	1242	AINAVSAIAKHF		12,17	0,00	24,31															
44	1281	AINAVSAIAKHF+K		16,79	0,00	22,68	24,84														
59	1588	IPHAINAVSAIAKHF		15,87	4,08	21,82	17,73	21,08													
61	1610	IPHAINAVSAIAKHF+Na		30,28	10,63	39,24	18,47	22,57	21,70												
62	1626	IPHAINAVSAIAKHF+K		42,38	19,82	52,68	17,18	21,79	28,54	44,96											
63	1638	FLSLIPHAINAVSAIA		48,48	20,81	57,26	21,47	27,36	31,14	49,30	100,00										
65	1656	IPHAINAVSTLVHHF		49,11	20,76	65,08	25,72	29,47	26,73	51,04	69,51	78,79									
66	1679	IPHAINAVSTLVHHF+Na		29,22	6,96	34,96	14,13	18,48	14,23	33,26	36,12	41,00	50,98								
67	1694	IPHAINAVSTLVHHF+K		43,97	16,90	52,43	18,61	24,99	24,85	48,65	71,52	76,89	72,37								
68	1719	SLIPAAISAVSALANHF+K		42,93	17,85	52,06	18,56	24,80	26,57	49,70	82,73	87,59	68,99								
74	1788	SLIPHAINAVSAIAKHF		11,71	1,63	20,55	14,65	16,71	13,66	22,98	19,19	21,43	23,64								
75	1811	SLIPHAINAVSAIAKHF+Na		17,35	3,15	28,54	19,21	23,26	19,08	32,06	26,65	29,88	34,21								
77	1827	SLIPHAINAVSAIAKHF+K		31,65	12,23	52,42	23,96	30,58	23,91	44,81	51,33	56,40	63,75								
80	1879	SLIPHAINAVSTLVHHF+Na		18,45	7,81	34,38	16,18	19,12	18,13	31,43	32,94	35,37	39,03								
81	1894	SLIPHAINAVSTLVHHF+K		26,08	10,44	35,88	15,41	19,17	21,80	35,30	47,63	48,98	45,49								
83	1941	FLSLIPAAISAVSALANHF		19,05	6,89	35,17	18,64	22,00	23,85	35,91	38,18	40,61	40,90								
84	1956	FLSLLPSLVSGAVSLVKIL		21,04	5,78	37,98	23,54	27,10	23,86	37,21	35,48	39,32	44,89								
85	1965	FLSLLPSLVSGAVSLAKKL+N		29,16	9,29			31,45	25,63	44,84	42,52	48,43	56,64								

		a		44,04	24,59							
86	1981	FLSLLPSLVSGAVSLAKKL+K	34,39	12,15	53,95	25,96	32,66	25,50	49,02	55,14	60,86	67,09
87	1994	FLSLLPSLVSGAVSLVKIL+K	38,91	13,52	57,60	26,18	34,02	26,22	50,29	60,02	68,13	73,95
88	2013	FLSLLPTALNAVSAIAKHF	35,42	17,37	60,57	25,81	32,17	27,63	51,64	61,98	68,48	73,01
89	2035	FLSLIPTAINAVSALAKHF+N a	45,62	21,75	67,81	25,65	32,52	28,78	55,03	75,49	85,55	86,21
90	2050	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	23,79	9,12	30,56	18,39	22,61	19,29	30,44	34,28	36,99	42,83
92	2071	FLSLIPHAINAVSAIAKHF+N a	24,27	4,24	37,90	23,33	28,90	21,99	43,77	40,29	45,55	47,33
93	2088	FLSLIPHAINAVSAIAKHF+K	28,35	7,37	45,47	23,77	29,51	23,63	46,34	53,51	58,75	55,64
95	2116	FLSLIPHAINAVSTLVHFF	20,72	3,95	31,90	21,19	26,32	21,14	36,95	34,43	38,81	40,81
96	2139	FLSLIPHAINAVSTLVHFF+N a	23,48	6,22	36,37	22,28	26,22	22,36	38,79	38,05	42,73	44,70
97	2155	FLSLIPHAINAVSTLVHFF+K	28,47	7,95	44,93	22,54	28,18	22,51	45,56	50,79	55,13	55,70
66	1679	IPHAINAVSTLVHFF+Na										
67	1694	IPHAINAVSTLVHFF+K	45,15		IPHAINAVSTLVHFF+K							
68	1719	SLIPAAISAVSALANHF+K	39,36		75,44							
74	1788	SLIPHAINAVSAIAKHF	16,32		22,16	22,94						
75	1811	SLIPHAINAVSAIAKHF+Na	24,37		31,68	31,23	22,32					
77	1827	SLIPHAINAVSAIAKHF+K	40,63		52,73	50,83	22,39	36,25				
80	1879	SLIPHAINAVSTLVHFF+Na	25,76		36,00	35,83	20,11	25,92	33,54			
81	1894	SLIPHAINAVSTLVHFF+K	28,53		45,31	46,75	17,88	24,08	36,46	28,92		
83	1941	FLSLIPAAISAVSALANHF	26,30		38,74	40,28	21,39	28,57	35,16	31,17	32,77	FLSLIPAAISAVSALANHF
84	1956	FLSLLPSLVSGAVSLVKIL	30,62		39,31	38,19	22,94	32,37	45,25	30,16	31,17	35,18
85	1965	FLSLLPSLVSGAVSLAKKL+Na	36,65		46,57	45,02	23,43	35,48	60,71	32,91	34,98	36,47
86	1981	FLSLLPSLVSGAVSLAKKL+K	42,07		55,90	53,51	23,84	36,89	82,07	34,17	37,96	37,68
87	1994	FLSLLPSLVSGAVSLVKIL+K	44,46		60,15	58,10	23,62	36,62	82,04	34,69	39,55	37,47
88	2013	FLSLLPTALNAVSAIAKHF	42,89		60,58	59,74	23,80	36,72	84,47	35,43	40,01	39,10
												47,94

89	2035	FLSLIPTAINAVSALAKHF+Na	46,03	70,99	72,20	24,01	36,59	85,19	36,62	43,26	40,14	48,03
90	2050	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	26,72	35,89	33,39	16,51	24,50	37,81	26,23	28,24	26,90	29,50
92	2071	FLSLIPHAINAVSAIAKHF+Na	31,05	40,79	41,59	22,55	32,66	53,63	29,20	32,44	35,12	40,33
93	2088	FLSLIPHAINAVSAIAKHF+K	34,79	49,17	50,60	22,93	33,94	63,60	31,79	37,39	37,51	41,48
95	2116	FLSLIPHAINAVSTLVHFF	27,78	35,79	36,28	21,25	29,44	40,08	27,53	30,02	33,20	34,94
96	2139	FLSLIPHAINAVSTLVHFF+Na	29,70	39,11	39,97	20,48	29,01	42,00	29,46	31,72	34,34	35,13
97	2155	FLSLIPHAINAVSTLVHFF+K	36,37	49,35	49,19	22,10	33,25	61,68	32,26	37,58	37,06	40,39

85	1965	FLSLLPSLVSGAVSLAKKL+Na	FLSLLPSLVSGAVSLAKKL+Na										
86	1981	FLSLLPSLVSGAVSLAKKL+K	65,59	FLSLLPSLVSGAVSLAKKL+K									
87	1994	FLSLLPSLVSGAVSLVKIL+K	66,56	100,00	FLSLLPSLVSGAVSLVKIL+K								
88	2013	FLSLLPTALNAVSAIAKHF	65,56	100,00	100,00	FLSLLPTALNAVSAIAKHF							
89	2035	FLSLIPTAINAVSALAKHF+Na	67,24	99,75	111,72	100,00	FLSLIPTAINAVSALAKHF+Na						
90	2050	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	37,27	41,51	42,00	40,44	41,20	FLSLIPHAINAVSAIAKHF					
92	2071	FLSLIPHAINAVSAIAKHF+Na	50,52	61,30	61,28	58,81	59,29	30,08	FLSLIPHAINAVSAIAKHF+Na				
93	2088	FLSLIPHAINAVSAIAKHF+K	52,21	73,78	74,67	70,03	72,13	34,38	99,00	FLSLIPHAINAVSAIAKHF+K			
95	2116	FLSLIPHAINAVSTLVHFF	40,49	44,37	44,16	42,70	42,03	30,62	43,52	45,62	FLSLIPHAINAVSTLVHFF		
96	2139	FLSLIPHAINAVSTLVHFF+Na	41,81	47,37	47,66	45,42	45,65	33,54	44,41	49,15	42,28	FLS . . LVHFF+Na	
97	2155	FLSLIPHAINAVSTLVHFF+K	50,83	68,64	69,11	64,64	65,51	36,68	59,84	78,55	45,96	50,72 F . . HF+K	

Tabela 16. Porcentagem de colocalização apresentada por peptídeos relacionados a bradicininas no tecido cutâneo dos animais adultos de *P. azurea*. Os valores que representam mais de 50% de colocalização apresentam-se em destaque.

Íon	Massa média	Sequência	Colocalização (%)								
			VPPIGWF+Na		VPPIGWF+K		VPPGFTPF+Na		RPPGFTPF+K		RPPSWIPK
18	839	VPPIGWF+Na	VPPIGWF+Na								
19	853	VPPIGWF+K	33,77	VPPIGWF+K							
20	868	RPPVFRP	21,09	9,65	RPPVFRP						
21	883	VPPGFTPF+Na	41,47	15,18	27,00	VPPGFTPF+Na					
24	940	RPPGFTPF+Na	71,74	31,77	17,23	34,58	RPPGFTPF+Na				
25	957	RPPGFTPF+K	36,83	12,36	17,69	35,68	32,43	RPPGFTPF+K			
28	997	RPPSWIPK	32,12	22,69	5,88	11,07	29,18	9,21	RPPSWIPK		
29	1019	RPPSWIPK+K	25,81	20,33	3,58	5,26	24,50	5,23	18,19	RPPSWIPK+K	
30	1034	RPPSWIPK+K	60,71	30,95	13,47	23,93	49,94	23,20	28,76	27,21	RPPSWIPK+K
33	1112	RPPGFTPFR+Na	83,49	28,47	15,44	29,50	60,35	27,40	31,08	25,09	54,70
34	1128	RPPGFTPFR+K	99,20	31,18	18,68	38,82	68,91	36,07	32,73	25,45	59,16
35	1146	VPPGFTPFRQ	79,66	28,11	14,79	28,04	59,21	25,14	26,34	25,04	53,60
36	1164	VPPGFTPFRQ	68,72	25,89	12,49	25,57	54,43	23,03	24,89	22,84	48,19
39	1233	VPPGFTPFRLT	78,13	32,22	21,28	40,12	61,99	37,02	35,16	24,55	54,78
41	1249	VPPGFTPFRQS	91,10	32,76	20,06	40,45	68,33	37,87	38,85	25,37	58,79
43	1272	VPPGFTPFRVD+Na	97,99	34,85	28,07	55,24	69,87	44,43	33,43	25,49	61,82
46	1336	RPPGFSPFRIY	21,87	8,33	13,50	21,41	17,65	18,15	9,70	3,54	15,15
47	1350	RPPGFTPFRY	31,57	13,02	15,04	29,69	27,70	25,02	15,33	4,61	20,71
52	1437	RPPGFSPFRIY	28,57	18,17	6,30	11,63	25,03	9,82	20,22	17,75	28,00

33	1112	RPPGFTPFR+Na	RPPGFTPFR+Na									
34	1128	RPPGFTPFR+K	91,05	RPPGFTPFR+K								
35	1146	VPPGFTPFRQ	75,10	81,72	VPPGFTPFRQ							
36	1164	VPPGFTPFRQ	61,70	70,00	65,28	VPPGFTPFRQ						
39	1233	VPPGFTPFRLT	74,65	81,36	63,64	55,23	VPPGFTPFRLT					
41	1249	VPPGFTPFRQS	87,51	100,00	73,98	64,23	90,41	VPPGFTPFRQS				
43	1272	VPPGFTPFRVD+Na	83,08	100,00	76,44	64,13	88,37	99,33	VPPGFTPFRVD+Na			
46	1336	RPPGFSPFRIY	21,39	23,78	16,19	15,66	27,79	27,88	28,55	RPPGFSPFRIY		
47	1350	RPPGFTPFRIY	24,96	31,15	19,56	19,13	36,99	37,15	37,78	22,87	RPPGFTPFRIY	
52	1437	RPPGFSPFRIY	30,46	31,66	25,78	24,32	31,30	33,19	30,61	12,66	16,03	PPGFSPFRIY

Tabela 17. Porcentagem de colocalização apresentada por dermaseptinas no tecido cutâneo dos animais adultos de *P. azurea*. Os valores que representam mais de 50% de colocalização apresentam-se em destaque.

Íon	Massa média	Sequência	Colocalização (%)							
			TIKQKGKEAAIAAKAAG+Na		TIKQKGKEAAIAAKAAG+K		TIKQKGKEAAIAAKAAG+K		TIKQKGKEAAIAAKAAG+K	
70	1749	TIKQKGKEAAIAAKAAG+Na	TIKQKGKEAAIAAKAAG+Na							
72	1765	TIKQKGKEAAIAAKAAG+K	4,13 TIKQKGKEAAIAAKAAG+K							
76	1820	TIKQKGKEAAIAAKAAG+K	7,49 5,62 TIKQKGKEAAIAAKAAG+K							
82	1924	WSTIKNVGKEAAIAAGKAA+K	7,51 6,23 54,86 WSTIKNVGKEAAIAAGKAA+K							
91	2062	GLWSTIKNVATAAGKAVLGAL+Na	7,40 4,34 49,13 42,58 GLWSTIKNVATAAGKAVLGAL+Na							
100	2262	WSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL+Na	5,91 4,38 13,88 13,82 15,52 WSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL+Na							
101	2279	WSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL+K	6,39 5,29 39,12 38,59 35,11 17,00 WSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL+K							
102	2391	TIKQKGKEAAIAAKAAGKAPSGAI+K	6,20 4,85 41,98 40,81 33,01 8,96 33,31 TIKQKGKEAAIAAKAAGKAPSGAI+K							
103	2411	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	5,48 4,76 31,63 32,30 29,98 9,44 25,83 26,89							
104	2420	GLWSKIKAVAAAAGKAALGAVNEAL+K	5,12 3,64 39,32 30,65 36,61 9,65 26,86 27,72							
105	2433	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL+Na	0,00 0,00 28,40 22,41 28,61 0,00 18,23 20,49							
106	2450	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL+K	8,23 4,90 54,33 41,50 49,02 15,37 35,64 34,79							
109	2613	GLWKLLAKGAGKMLGHVASKILGPK+K	0,00 0,00 20,89 16,61 20,40 0,00 14,56 16,26							
111	2648	WSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL+Na	0,00 0,00 24,95 19,50 23,92 0,00 16,55 18,86							
112	2663	WSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL+K	0,00 0,00 28,29 21,88 26,80 0,00 17,77 21,04							
114	2794	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL	4,91 3,67 8,13 8,49 5,84 5,74 7,75 8,46							
116	2833	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL+K	0,00 0,00 19,28 17,22 18,90 0,00 15,34 17,06							
118	2908	GLWKSLLKNVGVAAGKAALNAVTDVNVQ+K	8,03 4,84 48,10 39,89 43,71 12,20 32,92 35,47							
125	3262	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNAASEAL+Na	0,00 0,00 19,78 15,82 19,50 0,00 14,36 16,06							
126	3276	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNAASEAL+K	0,00 0,00 22,12 17,20 21,98 0,00 14,36 16,91							
127	3292	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNSASEAI+K	0,00 0,00 18,19 14,65 17,89 0,00 12,61 14,73							
128	3377	ALWKDVLKIGTVALHAGKAAFCAAADTISQGGG+Na	0,00 0,00 22,75 17,99 22,10 0,00 15,58 17,62							
129	3393	ALWKDVLKIGTVALHAGKAAFCAAADTISQGGG+K	0,00 0,00 26,12 20,19 25,14 0,00 16,78 19,83							

103	2411	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL																		GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL
104	2420	GLWSKIKAVAAAAGKAALGAVNEAL+K	29,55																	GLWSKIKAVAAAAGKAALGAVNEAL+K
105	2433	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL+Na	21,24	30,21																GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL+Na
106	2450	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL+K	31,99	53,77	32,83															GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL+K
109	2613	GLWKLLAKGAGKMLGHVASKILGPK+K	17,99	24,57	24,29	26,02														GLWKLLAKGAGKMLGHVASKILGPK+K
111	2648	WSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL+Na	19,43	28,35	28,12	30,72	26,20													WSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL+Na
112	2663	WSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL+K	19,73	30,66	29,50	35,63	26,42	31,46												
114	2794	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL	7,47	5,93	0,00	7,58	0,00	0,00												
116	2833	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL+K	15,45	18,98	19,69	19,79	15,71	17,29												
118	2908	GLWKSLLKNVGVAAGKAALNAVTDVNVQ+K	31,02	45,69	30,86	59,93	23,46	27,63												
125	3262	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNAASEAL+Na	18,04	23,41	23,04	24,76	22,06	23,59												
126	3276	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNAASEAL+K	18,34	27,25	25,88	28,82	24,05	26,89												
127	3292	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNSASEAI+K	16,61	22,04	21,60	22,61	20,83	22,17												
128	3377	ALWKDVLKKIGTVALHAGKAAFCAAADTISQGG+Na	19,54	27,48	26,83	28,60	24,31	27,07												
129	3393	ALWKDVLKKIGTVALHAGKAAFCAAADTISQGG+K	19,91	30,24	29,10	33,23	25,12	29,19												
112	2663	WSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL+K																		WSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL+K
114	2794	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL																		GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL
116	2833	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL+K	17,98																	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL+K
118	2908	GLWKSLLKNVGVAAGKAALNAVTDVNVQ+K	30,19	7,95	21,04															GLWKSLLKNVGVAAGKAALNAVTDVNVQ+K
125	3262	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNAASEAL+Na	23,92	0,00	16,69	23,61														GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNAASEAL+Na
126	3276	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNAASEAL+K	28,67	0,00	16,90	26,81	24,15													GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNAASEAL+K
127	3292	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNSASEAI+K	22,83	0,00	15,23	21,82	21,67	23,41												GLWSTIKQKGKEAAIAA...GKAVLNSASEAI+K
128	3377	ALWKDVLKKIGTVALHAGKAAFCAAADTISQGG+Na	27,93	0,00	17,89	26,97	23,88	26,52	22,55											ALWKDVLKKIG...AAADTISQGG+Na
129	3393	ALWKDVLKKIGTVALHAGKAAFCAAADTISQGG+K	32,47	0,00	18,67	30,56	24,37	28,84	22,99	28,73										

Tabela 18. Porcentagem de colocalização apresentada por triptofilinas no tecido cutâneo dos animais adultos de *P. azurea*. Os valores que representam mais de 50% de colocalização apresentam-se em destaque.

Íon	Massa média	Sequência	Colocalização (%)										
			FPPWL	FPPWE	FPPWL+Na	FPPWF	FPPWL+K	FPPLAW					
2	658	FPPWL	FPPWL										
4	674	FPPWE	11,51	FPPWE									
5	681	FPPWL+Na	52,78	12,42	FPPWL+Na								
6	691	FPPWF	25,50	15,13	43,72	FPPWF							
7	697	FPPWL+K	44,97	9,94	100,00	41,51	FPPWL+K						
9	729	FPPLAW	0,00	0,00	18,84	15,43	19,02	FPPLAW					
17	810	KPPWRL	30,42	4,45	26,39	10,59	23,46	0,00					

Tabela 19. Porcentagem de colocalização apresentada por demais peptídeos no tecido cutâneo dos animais adultos de *P. azurea*. Os valores que representam mais de 50% de colocalização apresentam-se em destaque.

Íon	Massa média	Peptídeo	Colocalização												
			1224	1257	1364	1386	1519	1530	1548	1558	1601	1644	1734	1757	1772
2	658	FPPWL	2,60	52,27	14,10	7,38	21,58	34,83	13,26	25,89	10,08	45,22	6,73	3,10	2,36
4	674	FPPWE	0,54	12,05	2,45	2,37	4,19	4,67	2,12	3,23	2,45	8,11	1,76	0,51	0,43
5	681	FPPWL+Na	3,65	79,03	42,69	34,33	54,85	68,90	39,21	57,68	38,83	85,80	42,36	25,37	3,59
6	691	FPPWF	1,00	37,35	16,30	12,46	23,93	30,74	14,19	25,53	13,30	32,22	19,18	13,69	0,79
7	697	FPPWL+K	3,58	72,78	41,98	34,58	56,94	73,25	39,79	59,07	37,73	90,81	45,88	27,00	3,66
9	729	FPPLAW	0,00	16,12	15,14	12,03	16,52	17,28	11,46	16,53	11,18	15,83	16,17	13,36	0,00
10	735	IPHAINA	1,90	39,80	21,44	19,55	34,86	43,50	24,88	35,47	20,85	53,09	27,99	17,88	1,84
12	758	IPHAINA+Na	1,83	23,54	9,32	4,68	12,22	18,22	9,11	15,02	7,02	20,84	4,33	2,27	1,79
14	773	IPHAINA+K	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	803	YAFGYPS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	810	KPPWRL	2,23	25,77	9,67	3,62	13,28	20,85	9,24	16,68	6,78	23,32	3,76	2,26	2,01
18	839	VPPIGWF+Na	3,74	75,75	40,69	34,49	59,23	76,85	37,30	62,59	32,91	84,84	46,62	27,35	4,04
19	853	VPPIGWF+K	1,68	31,96	20,73	14,59	27,42	32,02	18,69	29,13	16,86	29,40	20,47	16,51	1,60
20	868	RPPVFRP	2,54	26,28	7,74	5,94	11,44	15,17	7,85	12,47	7,52	21,07	5,88	2,83	1,77

21	883	VPPGFTPF+Na	3,60	44,96	13,56	9,58	22,76	33,27	14,81	26,31	12,15	42,66	9,88	5,00	3,26
22	894	VSAIAKHF+Na	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	909	VSAIAKHF+Na	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	940	RPPGFTPF+Na	3,49	55,08	32,62	27,03	50,20	64,15	32,60	53,07	27,95	63,96	36,61	24,03	3,47
25	957	RPPGFTPF+K	2,68	34,28	11,62	8,76	20,49	29,61	15,77	23,47	11,32	42,68	8,92	4,02	2,50
26	972	FPAPFLFL+Na	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
27	981	RPPSWIPK	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	997	RPPSWIPK	3,39	29,78	27,99	18,24	29,48	35,19	18,45	30,07	18,06	32,04	22,26	17,13	2,87
29	1019	RPPSWIPK+K	1,24	24,29	20,41	16,76	24,51	25,16	18,89	25,36	18,95	23,82	21,27	16,29	1,24
30	1034	RPPSWIPK	3,62	54,68	35,22	29,18	46,31	52,71	33,46	49,53	31,08	55,15	35,79	24,07	3,44
33	1112	RPPGFTPFR+Na	4,01	68,70	47,84	41,45	59,97	68,50	40,05	58,73	37,89	83,15	45,94	27,21	4,35
34	1128	RPPGFTPFR+K	3,99	75,94	47,40	40,37	62,23	78,43	40,29	63,67	36,99	96,58	48,70	28,35	4,26
35	1146	VPPGFTPFRQ	3,06	62,45	38,22	34,98	55,08	63,69	36,07	53,77	32,73	71,01	44,07	26,83	3,49
36	1164	VPPGFTPFRQ	3,57	50,60	33,78	30,82	50,13	58,75	33,05	50,15	29,00	61,29	40,29	25,57	3,78
37	1214	IPHAINAVSAIA+K	3,94	52,77	49,78	36,64	45,43	51,23	31,92	45,60	32,08	67,52	32,05	19,53	4,20
38	1224	VMYYSLPRPV	100,0	3,50	3,74	2,91	3,93	4,16	3,11	3,95	3,72	3,91	2,75	2,36	2,13
39	1233	VPPGFTPFRLT	4,46	74,19	48,85	38,07	56,64	68,84	38,60	58,90	35,16	83,79	38,38	24,29	4,63
40	1242	AINAVSAIAKHF	0,00	23,56	23,26	19,23	22,49	22,27	14,84	20,50	14,38	25,72	20,08	15,14	0,00
41	1249	VPPGFTPFRQS	4,40	77,10	52,95	41,10	62,59	79,79	40,61	64,33	37,28	97,77	45,31	27,29	4,65
42	1257	LRPAVIRPKGK+Na	3,50	100,00	40,70	34,10	49,42	58,42	34,44	50,81	32,25	75,84	35,38	22,08	3,53
43	1272	VPPGFTPFRVD+Na	3,94	100,0	45,93	38,05	59,22	76,15	39,43	62,37	36,03	98,16	42,70	25,56	4,23
44	1281	AINAVSAIAKHF+K	0,00	30,57	23,93	20,34	26,72	28,33	17,74	25,71	17,27	29,47	27,60	19,94	0,00
46	1336	RPPGFSPFRIY	3,56	24,74	18,37	13,00	16,56	20,25	13,82	18,11	13,25	27,67	9,46	4,41	3,42
47	1350	RPPGFTPFRY	4,20	29,53	19,13	11,08	21,46	31,18	14,08	26,02	13,01	33,84	8,83	4,88	4,02
48	1364	EEDFDLPWGKK	3,74	40,70	100,0	36,88	41,53	42,32	30,92	40,57	33,03	52,08	31,44	20,71	3,94
49	1386	EEDFDLPWGKK+Na	2,91	34,10	36,88	100,00	36,02	33,44	28,52	34,11	31,23	42,48	28,70	17,87	3,31
51	1401	HAINAVSAIAKHF+Na	3,20	35,90	41,10	38,83	41,84	41,05	30,75	38,89	31,30	49,48	32,81	20,80	3,53
52	1437	RPPGFSPFRIY	3,47	26,84	29,74	22,42	30,09	30,89	25,96	34,06	29,68	33,14	22,12	14,18	3,30
53	1498	QQGEGGPGYGLSPLR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
55	1519	LRPAILVRVKGKL	3,93	49,42	41,53	36,02	100,0	60,62	37,89	54,40	34,46	59,68	41,03	26,66	4,19
56	1530	FLFFNFPHPLGR+K	4,16	58,42	42,32	33,44	60,62	100,0	37,61	63,49	32,79	72,34	46,01	28,95	4,33

57	1548	FLFFAFPHPLGR	3,11	34,44	30,92	28,52	37,89	37,61	100,0	40,38	33,08	42,26	28,59	18,24	3,39
58	1558	LRPAILVRVKGKGL+K	3,95	50,81	40,57	34,11	54,40	63,49	40,38	100,0	37,64	60,36	40,60	26,14	4,29
59	1588	IPHAINAVSAIAKHF	2,61	25,45	23,27	17,57	28,83	32,78	18,71	28,53	17,66	26,50	25,24	19,87	2,36
60	1601	QDKPFWPPPIYPM	3,72	32,25	33,03	31,23	34,46	32,79	33,08	37,64	100,0	39,39	27,49	16,97	3,79
61	1610	IPHAINAVSAIAKHF+Na	3,52	42,81	37,56	33,72	43,62	45,27	38,68	47,58	41,72	52,34	34,37	20,64	3,80
62	1626	IPHAINAVSAIAKHF+K	4,34	59,18	44,08	33,45	57,32	74,19	37,68	58,22	35,92	75,92	41,46	25,81	4,36
63	1638	FLSLIPHAINAVSAIA	4,31	65,38	47,39	36,48	61,46	82,42	39,86	63,83	37,54	85,88	46,84	28,38	4,43
64	1644	SYLGHYGGPVQKLHS	3,91	75,84	52,08	42,48	59,68	72,34	42,26	60,36	39,39	100,0	43,71	25,68	4,19
65	1656	IPHAINAVSTLVHFF	4,07	72,65	51,53	42,77	58,11	68,41	41,92	58,39	38,70	100,00	41,64	25,10	4,20
66	1679	IPHAINAVSTLVHFF+Na	3,09	39,23	29,53	29,15	33,81	35,69	27,06	33,49	27,47	52,08	29,70	17,73	3,06
67	1694	IPHAINAVSTLVHFF+K	4,19	57,52	44,46	36,78	55,86	64,91	40,31	55,89	38,58	76,08	41,19	25,11	4,19
68	1719	SLIPAAISAVSALANHF+K	4,23	55,62	45,34	36,50	57,54	70,22	39,92	59,29	39,02	73,91	41,61	25,61	4,32
69	1734	QQGEGGPGGLSPLRFS	2,75	35,38	31,44	28,70	41,03	46,01	28,59	40,60	27,49	43,71	100,0	28,35	3,00
70	1749	TIKQKGEAAIAAKAAG+Na	2,57	5,46	10,01	7,13	6,77	7,16	4,71	6,12	6,53	9,54	4,99	3,00	2,39
71	1757	QQGEGGPGGLSPLRFS+Na	2,36	22,08	20,71	17,87	26,66	28,95	18,24	26,14	16,97	25,68	28,35	100,0	2,84
72	1765	TIKQKGEAAIAAKAAG+K	2,35	4,19	6,22	5,64	5,97	6,23	4,82	5,48	5,52	6,52	5,02	3,52	2,61
73	1772	QQGEGGPGGLSPLRFS+K	2,13	3,53	3,94	3,31	4,19	4,33	3,39	4,29	3,79	4,19	3,00	2,84	100,0
74	1788	SLIPHAINAVSAIAKHF	1,99	20,20	23,53	23,21	22,79	20,81	19,81	22,77	21,05	23,81	19,26	13,16	2,23
75	1811	SLIPHAINAVSAIAKHF+Na	2,46	32,20	30,22	28,78	30,53	28,88	26,65	31,46	28,41	34,63	27,16	17,85	2,43
76	1820	TIKNVGKEAAIAAGKAALG+K	3,31	48,03	42,38	35,96	48,33	54,22	33,63	46,98	35,83	59,14	46,42	26,43	3,47
77	1827	SLIPHAINAVSAIAKHF+K	3,02	67,54	43,19	38,11	46,19	50,12	33,05	45,84	35,22	68,52	39,02	21,88	2,95
80	1879	SLIPHAINAVSTLVHFF+Na	3,08	30,90	34,19	28,26	31,82	31,86	27,42	32,15	28,30	39,08	26,33	17,22	3,14
81	1894	SLIPHAINAVSTLVHFF+K	3,54	35,36	35,09	28,28	39,91	42,74	30,72	38,82	30,65	45,95	33,44	21,12	3,53
82	1924	WSTIKNVGKEAAIAAGKAA+K	3,83	40,26	39,35	31,17	47,38	54,46	33,43	47,39	33,66	54,09	42,71	25,85	3,93
83	1941	FLSLIPAAISAVSALANHF	3,77	32,30	37,24	29,91	36,61	36,74	30,10	37,97	33,61	40,46	30,30	20,38	3,98
84	1956	FLSLLPSLVSGAVSLVKIL	3,44	41,67	37,22	33,27	38,59	37,98	30,08	37,72	32,62	45,51	33,47	21,61	3,75
85	1965	FLSLLPSLVSGAVSLAKKL+Na	3,31	55,49	40,22	35,88	43,74	46,53	33,90	45,06	35,45	58,12	38,42	23,55	3,60
86	1981	FLSLLPSLVSGAVSLAKKL+K	2,86	69,87	45,12	39,94	48,68	53,48	35,46	49,19	38,15	72,57	43,66	23,80	3,14
87	1994	FLSLLPSLVSGAVSLVKIL+K	2,80	72,42	46,38	40,08	51,29	59,35	36,17	52,28	37,67	80,40	45,94	24,79	3,07
88	2013	FLSLLPTALNAVSAIAKHF	3,98	76,54	48,19	41,24	54,50	62,61	38,36	56,24	39,15	78,46	45,05	24,93	4,25
89	2035	FLSLIPTAINAVSALAKHF+Na	4,23	83,55	51,04	42,72	60,91	76,91	41,22	65,19	40,18	93,91	47,65	26,33	4,54

90	2050	FLSLIPHAINAVSAIAKHF	2,25	41,76	29,00	23,15	30,03	32,15	25,68	31,25	25,17	43,14	26,19	18,18	2,06
91	2062	GLWSTIKNVATAAGKAVLGAL+Na	2,97	53,40	41,44	31,01	41,90	47,78	32,29	43,96	34,01	61,85	35,58	22,07	2,91
92	2071	FLSLIPHAINAVSAIAKHF+Na	2,00	43,06	36,84	34,35	38,78	39,14	30,02	39,10	36,07	50,14	36,53	20,50	2,34
93	2088	FLSLIPHAINAVSAIAKHF+K	2,18	51,28	42,05	36,49	42,96	46,02	32,33	42,88	38,39	60,60	39,12	21,02	2,23
95	2116	FLSLIPHAINAVSTLVHFF	1,91	36,07	34,63	30,49	34,18	33,44	27,84	34,45	31,84	41,27	31,43	19,88	2,36
96	2139	FLSLIPHAINAVSTLVHFF+Na	2,41	38,53	36,20	29,16	35,17	36,70	28,71	36,43	31,75	45,17	32,17	19,91	2,59
97	2155	FLSLIPHAINAVSTLVHFF+K	2,44	51,13	41,53	35,77	41,85	43,89	32,45	42,03	38,38	59,68	37,63	20,47	2,44
99	2241	WSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
100	2262	WSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL+Na	3,02	17,49	13,12	11,61	14,04	15,12	12,95	14,79	13,06	21,75	10,00	4,22	2,96
101	2279	WSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL+K	3,26	32,91	32,52	28,18	37,38	39,35	30,93	37,85	29,72	46,12	33,29	21,21	3,47
102	2391	TIKQKGKEAAIAAKAAGKAPSGAI+K	3,23	29,30	32,18	25,99	37,01	40,66	25,92	36,98	26,08	38,08	36,13	24,61	3,64
103	2411	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL	3,87	33,96	31,76	25,81	36,46	38,76	27,93	38,28	27,26	38,67	24,12	16,42	4,05
104	2420	GLWSKIKAVAAAAGKAALGAVNEAL+K	2,48	38,24	36,31	32,81	34,85	33,45	27,69	35,42	31,33	42,10	30,30	18,11	2,56
105	2433	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL+Na	0,00	25,53	25,00	21,59	24,83	23,69	19,17	24,23	20,57	27,39	22,53	15,44	0,00
106	2450	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL+K	2,95	52,15	45,57	39,73	43,58	45,34	32,53	44,00	37,42	59,16	37,97	21,04	2,97
108	2575	GLWKLLAKGAGKMLGHVASKILGPK	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
109	2613	GLWKLLAKGAGKMLGHVASKILGPK+K	0,00	21,18	21,34	19,77	20,65	18,77	15,32	19,06	15,75	22,54	17,62	12,55	0,00
111	2648	WSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL+Na	0,00	24,82	23,83	21,32	23,49	22,36	16,81	21,89	17,25	26,10	21,32	14,87	0,00
112	2663	WSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL+K	0,00	27,58	25,28	22,14	25,24	25,31	17,46	24,01	17,95	28,72	24,23	16,76	0,00
114	2794	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAALGAL	2,68	5,14	8,14	6,36	7,25	7,64	5,56	7,22	7,03	8,11	5,54	3,35	2,74
115	2817	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL+Na	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
116	2833	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL+K	0,00	14,92	18,04	15,08	17,77	16,87	14,83	17,74	14,86	18,54	15,80	11,87	0,00
118	2908	GLWKSLLKNVGAAGKAALNAVTDMVNQ+K	2,86	40,09	42,57	35,74	40,12	41,25	29,85	39,92	34,19	49,25	34,21	21,14	3,08
124	3151	ALWKDVLKKGITVALHAGKAAFCAAADTISQ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
125	3262	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNAASEAL+Na	0,00	18,83	21,19	19,08	19,76	17,90	14,97	18,58	15,23	21,76	16,16	11,68	0,00
126	3276	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNAASEAL+K	0,00	22,21	23,36	20,66	21,59	20,30	15,33	20,36	16,09	24,18	18,40	12,85	0,00
127	3292	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGKAVLNSASEAI+K	0,00	18,23	20,03	18,33	18,46	16,71	13,69	17,16	13,73	20,58	15,23	10,97	0,00
128	3377	ALWKDVLKKGITVALHAGKAAFCAAADTISQGGGS+Na	0,00	22,44	23,21	20,96	22,34	20,78	16,48	21,14	16,93	24,26	19,16	13,40	0,00
129	3393	ALWKDVLKKGITVALHAGKAAFCAAADTISQGGGS+K	0,00	25,02	24,92	21,89	24,32	23,86	17,29	23,16	17,86	26,74	21,91	15,22	0,00

6.5.2. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS)

Anfíbios da espécie *P. azurea* em diferentes estágios de desenvolvimento foram submetidos aos métodos de obtenção da secreção cutânea por meio da estimulação elétrica. A intensidade e duração do estímulo, a quantidade de água *Milli-Q* utilizada para coletar a secreção, assim como, o volume de amostra analisado foram os mesmos para todos os animais, com exceção das secreções pertencentes aos animais adultos, para as quais, utilizou-se a mesma concentração de peptídeos apresentada nas secreções dos anfíbios no estágio 46 (33 µg). As secreções cutâneas de três animais pertencentes a cada estágio de desenvolvimento analisado (estágios 37, 41, 43, 44, 46 e adulto) foram submetidas à cromatografia líquida ultrarrápida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) com o objetivo de avaliar o conteúdo das secreções com relação à riqueza de frações e à presença diferencial de íons.

Quanto as análises cromatográficas realizadas com secreções de anfíbios pertencentes ao estágio 37 de desenvolvimento, foram identificadas apenas três frações (Figura 19A), as quais não apresentaram nenhum íon. Apenas a partir do estágio 41 de desenvolvimento os cromatogramas apresentaram frações eluídas em diferentes tempos de retenção, embora, a intensidade destas tenha sido relativamente baixa (Figura 19B). A partir do estágio 43 de desenvolvimento, momento no qual os anfíbios abandonam o habitat aquático e passam a viver em substrato firme, observa-se um súbito aumento do conteúdo da secreção glandular, tanto no que diz respeito à intensidade, quanto ao número de frações cromatográficas presentes (Figura 19C-E). Quanto aos anfíbios adultos, as análises foram realizadas utilizando secreções de anuros capturados no habitat natural. Os cromatogramas gerados a partir de secreções dos animais adultos apresentam um perfil cromatográfico diferente daqueles exibidos por *P. azurea* nos últimos estágios de metamorfose (Figura 19F).

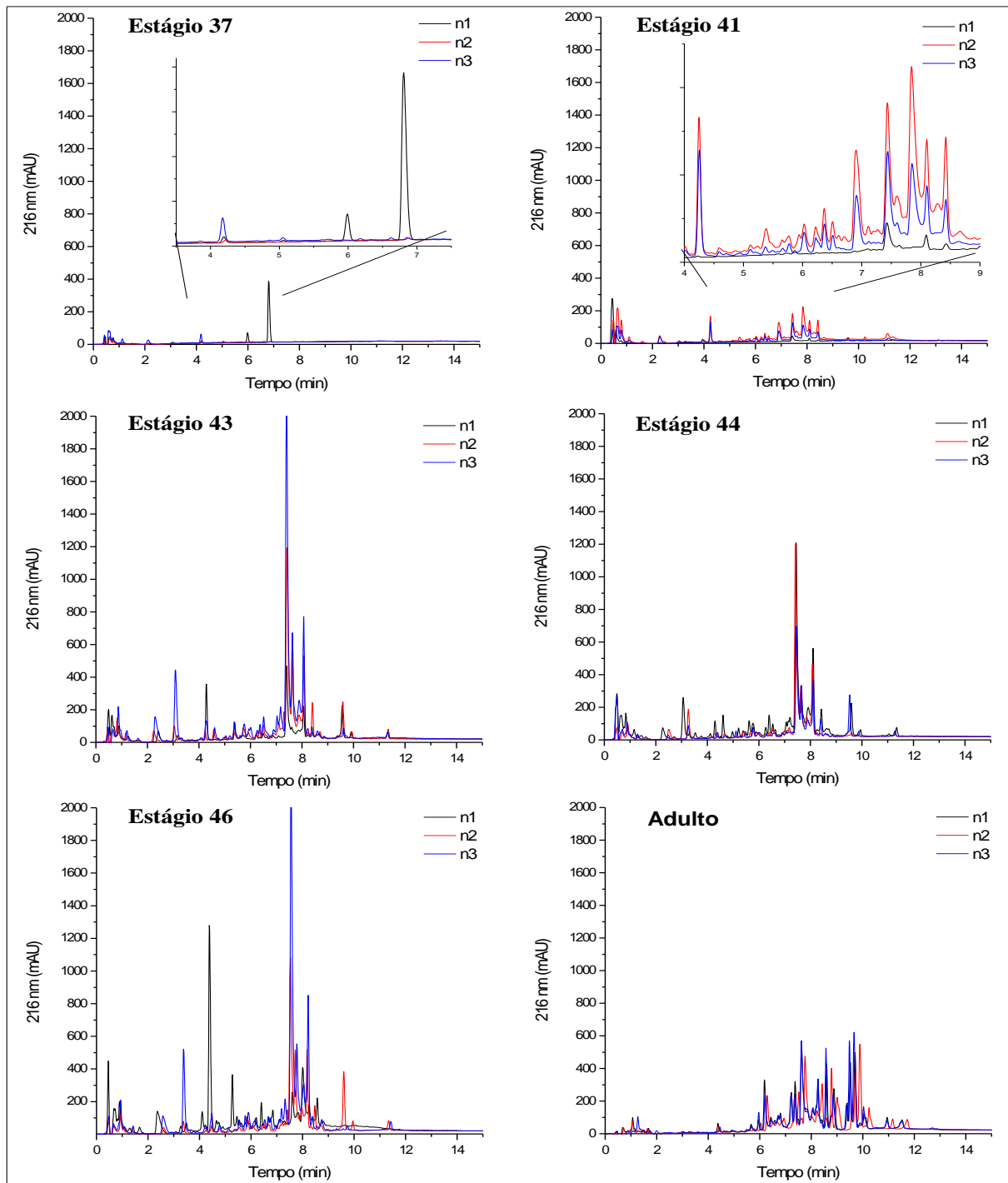


Figura 19. Análise das secreções cutâneas de *P. azurea* em diferentes estágios de desenvolvimento por cromatografia líquida ultrarrápida em fase reversa. Nos cromatogramas referentes a cada estágio de desenvolvimento estão representadas as análises de três animais diferentes (n1, n2 e n3), identificadas pelas diferentes cores.

Observa-se que a secreção cutânea de um dos anfíbios pertencentes ao estágio 41 de desenvolvimento (n=1) apresentou um cromatograma cujas intensidades e o número de frações foram menores do que os demais. Dessa maneira, as duas frações principais foram analisadas quanto ao seu conteúdo por espectrometria de massa, nas quais, em ambas, verificou-se a presença do íon m/z 658,371, cuja estrutura primária do peptídeo (FPPWL-NH₂) foi determinada após interpretação do espectro de fragmentação obtido pelo método CID (Figura 20).

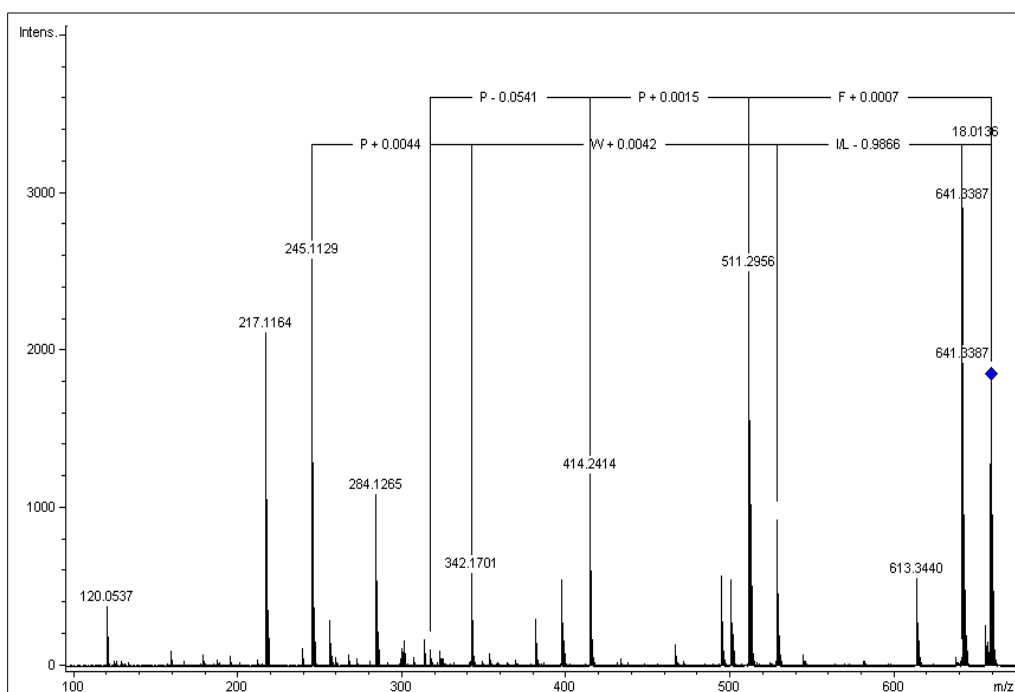


Figura 20. Interpretação do espectro de fragmentação do íon 568,37 gerado a partir das análises em espectrômetro de massa micrOTOF-Q II no modo fragmentação CID.

A presença de um mesmo peptídeo eluído em duas frações cromatográficas com tempos de retenção diferentes sugeriria, por exemplo, alguma mudança de configuração (ou seja, um peptídeo que assume mais de uma estrutura conformacional) ou a presença de dois

peptídeos contendo a mesma sequência de aminoácidos dentre os quais uma das estruturas apresentaria pelo menos um resíduo de D-aminoácido, o que resultaria em dois peptídeos com características físico-químicas diferentes, porém, exatamente com a mesma massa. A presença de D-aminoácidos é comumente descrita em peptídeos isolados a partir da secreção de anfíbios anuros. Dessa maneira, para testar essa hipótese, foi realizada a síntese manual de três estruturas peptídicas homólogas ao peptídeo caracterizado: uma contendo apenas L-aminoácidos, uma contendo D-aminoácido na segunda posição e uma contendo D-aminoácido na terceira posição. Foi realizada, então, uma análise cromatográfica para determinar o tempo de retenção de cada um dos peptídeos sintéticos e compará-los com o daquele apresentado pelo peptídeo nativo.

A Figura 21 apresenta os cromatogramas gerados a partir das análises realizadas com os peptídeos sintéticos e o peptídeo natural. Os resultados demonstram que, como esperado, o peptídeo natural apresentou as duas frações cromatográficas (Figura 21-A); o peptídeo sintético que possui apenas L-aminoácidos apresentou-se em duas frações com tempos de retenção semelhantes ao apresentado pelo peptídeo natural (Figura 21-C); o perfil cromatográfico do peptídeo sintético que possui D-aminoácido na segunda posição apresentou apenas uma fração (Figura 21-B), enquanto, aquele que contém D-aminoácido na terceira posição apresentou duas frações cromatográficas, de maneira semelhante ao que ocorre com o peptídeo natural, apresentando, no entanto, tempos de retenção diferentes (Figura 21-D).

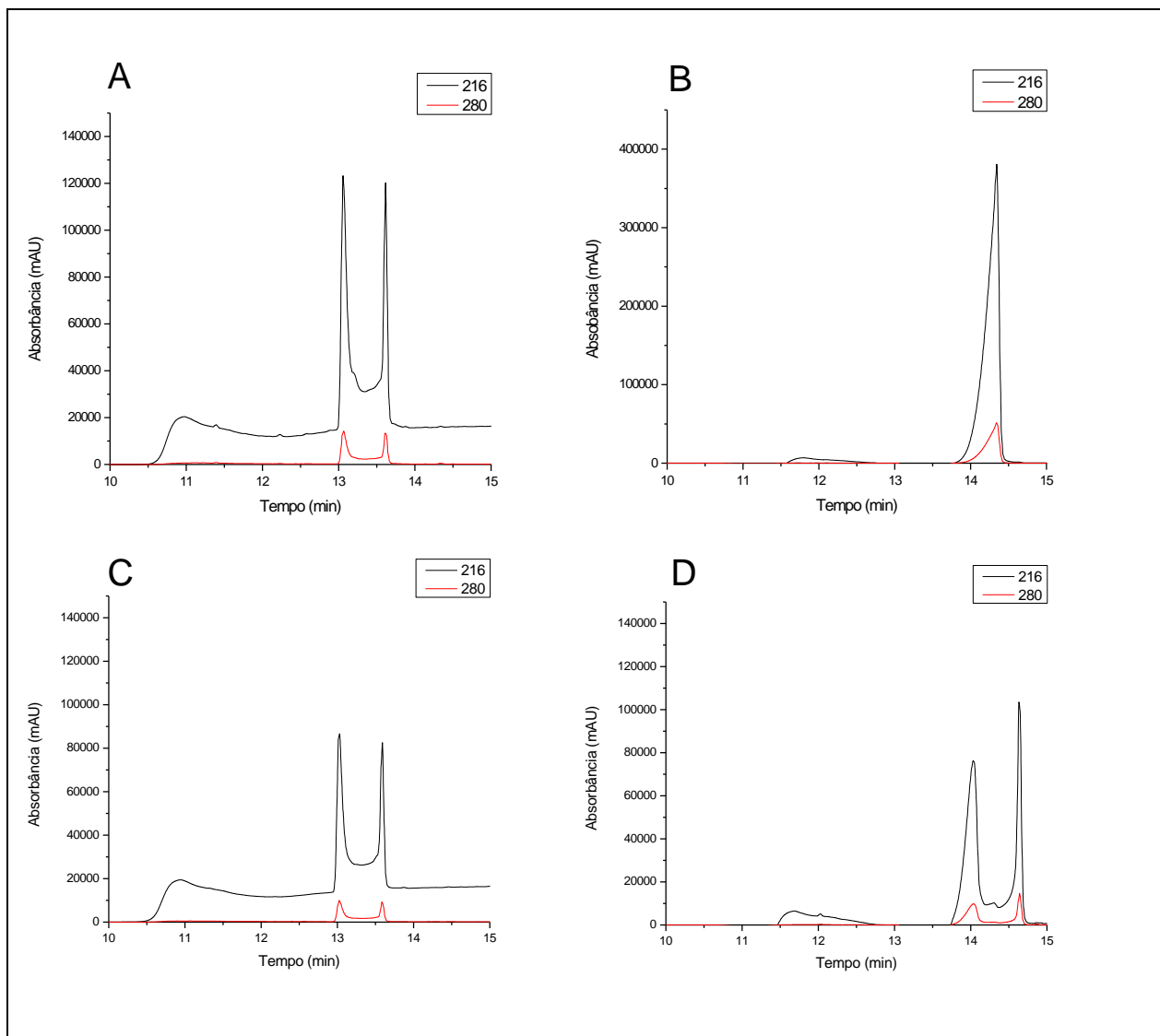


Figura 21. Análise por cromatografia líquida ultra-rápida em fase reversa dos peptídeos FPPWL-NH₂ (A) natural, (B) sintético contendo D-aminoácido na segunda posição, (C), sintéticos contendo apenas L-aminoácidos e (D) sintéticos contendo D-aminoácido na terceira posição.

Dessa maneira, os resultados permitem inferir que o peptídeo natural apresenta apenas L-aminoácidos em sua estrutura e que, aparentemente, possui a característica de mudança de configuração, o que o levaria a ser eluído em duas frações com tempos de retenção distintos. Tal mudança de configuração envolve, necessariamente, a interação entre os resíduos de

aminoácidos Fenilalanina e Prolina, já que a substituição por uma D-Prolina no peptídeo sintético modificou tal característica, de maneira que, apenas uma fração cromatográfica pôde ser observada.

6.5.3. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS NAS GLÂNDULAS GRANULARES DURANTE A METAMORFOSE

Foi realizada uma análise visando determinar os níveis de transcrição de genes que codificam peptídeos bioativos presentes nas glândulas granulares de *P. azurea* durante a metamorfose (estágios 37, 41, 43, 44, 46 e adulto). Para isto, ensaios de PCR em tempo real foram realizados utilizando um par de oligonucleotídeos que anela na região conservada do peptídeo sinal dos precursores que codificam pré-pró-peptídeos antimicrobianos em *P. azurea*, cuja eficiência de amplificação foi igual a 89,4%. Os resultados apresentados na Figura 22 demonstram que aqueles anfíbios nos estágios mais prematuros da metamorfose apresentaram níveis de transcrição mais elevados, os quais foram reduzindo gradativamente até que se alcançassem os estágios mais avançados.

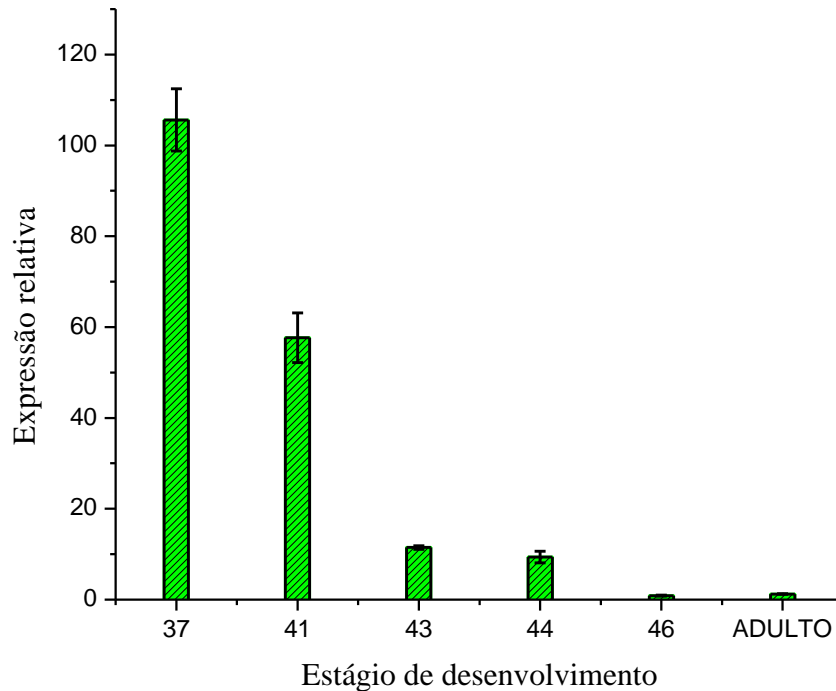


Figura 22. Níveis de transcrição de genes que codificam precursores que contém a região conservada do peptídeo sinal de pré-pró-peptídeos antimicrobianos em *P. azurea*. Os níveis de transcrição estão expressos em unidades arbitrárias. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica a proteína actina. Os estágios de desenvolvimento foram determinados de acordo com Gosner (Figura 1). As barras horizontais representam os desvios padrões médios (três repetições).

6.6. EXPRESSÃO DIFERENCIAL NAS GLÂNDULAS GRANULARES DORSAIS E INGUINAIS DE *P. nattereri*

6.6.1. MAPEAMENTO DE ÍONS POR MALDI-IMAGING

Os tecidos que compreendem as glândulas granulares dorsais e as glândulas inguinais de *P. nattereri* foram isolados e fixados separadamente em placa de MALDI visando os experimentos de MALDI-*Imaging* com o objetivo de comparar o perfil de distribuição dos íons presentes em ambos os tecidos. A Figura 23 apresenta o mapeamento de íons obtido a partir das aquisições realizadas no tecido cutâneo dorsal do anfíbio. Observa-se que os íons

correlacionados aos peptídeos com atividade antimicrobiana (m/z 3208 e m/z 3180) apresentam alta intensidade quando comparados aos demais, principalmente, aqueles relacionados às bradicininas que foram identificados (m/z 1060 e m/z 1290).

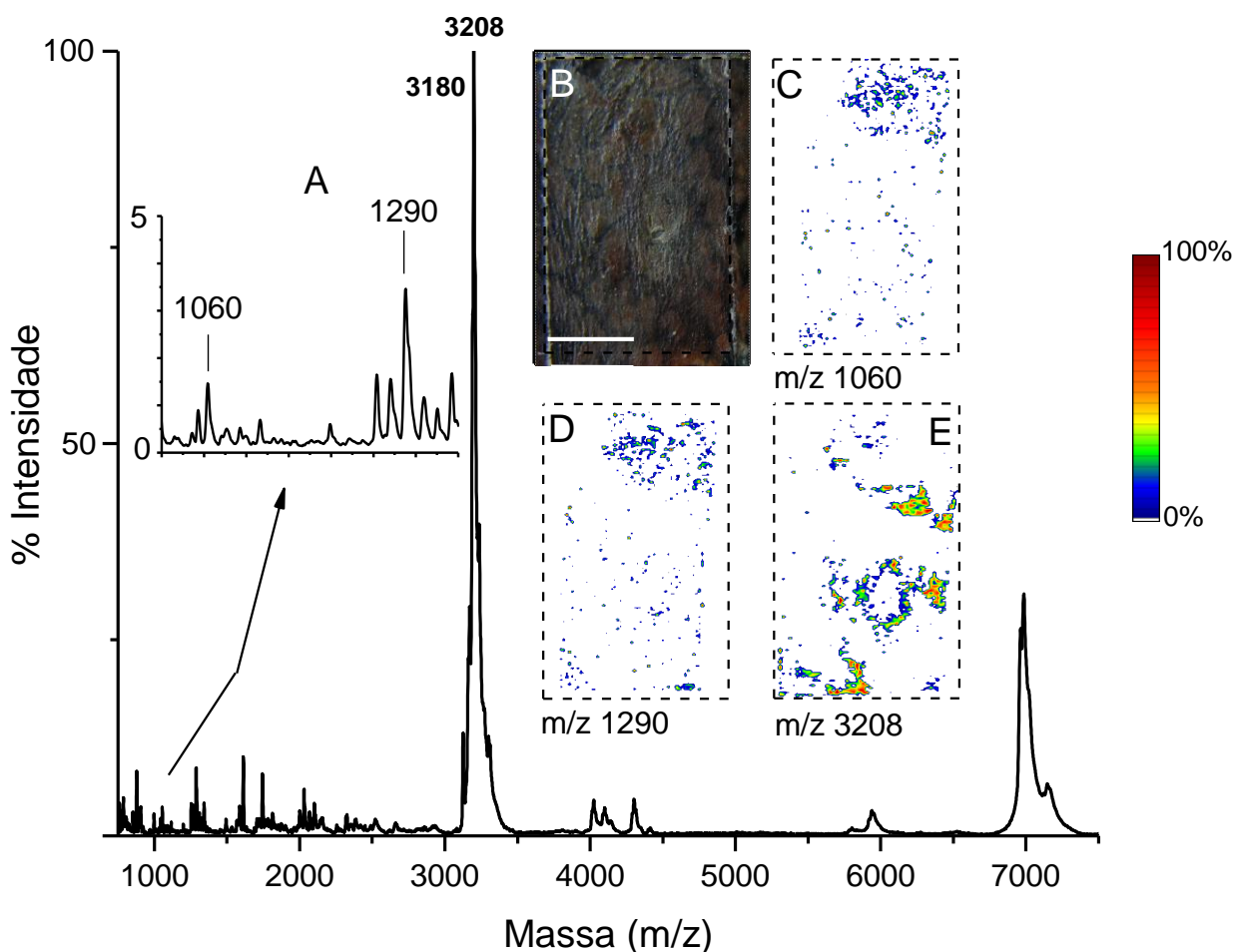


Figura 23. Espectro de massa global obtido a partir das aquisições de MALDI-*Imaging* realizadas com o tecido cutâneo dorsal de *P. nattereri*. (A) Detalhe do espectro de massa demonstrando a região dos íons das bradicininas. (B) Fotografia do tecido submetido às análises. As linhas pontilhadas correspondem à área do tecido que foi analisada e a barra corresponde a 12,5 mm. (C-E) Imagens correspondentes aos íons $[M+H]^+$ da Bradicina, (Val1, Thr6)-Bradicina e nattererina 2, respectivamente.

Os resultados obtidos a partir das análises realizadas utilizando as glândulas inguinais de *P. nattereri* estão apresentados na Figura 24. Nota-se que os íons correlacionados aos peptídeos com atividade antimicrobiana (m/z 3208 e m/z 3180) também apresentam alta intensidade quando comparados aos demais, no entanto, aqueles relacionados às bradicininas (m/z 1060 e m/z 1290) possuem uma intensidade maior quando comparados aos resultados obtidos a partir do tecido cutâneo dorsal.

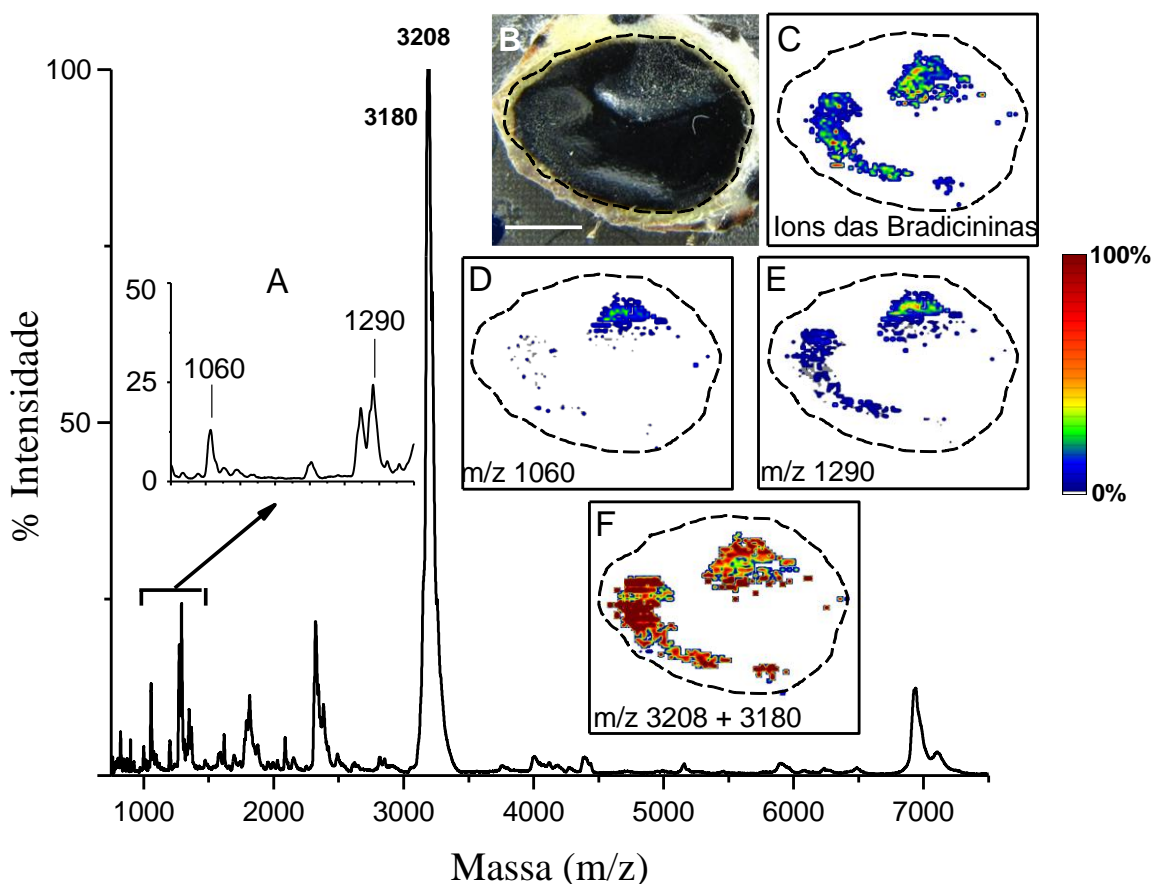


Figura 24. Espectro de massa global obtido a partir das aquisições de MALDI-Imaging realizadas com a glândula inguinal de *P. nattereri*. (A) Detalhe do espectro de massa demonstrando a região dos íons das bradicininas. (B) Fotografia da glândula submetida às análises. As linhas pontilhadas correspondem à área do tecido que foi analisada e a barra corresponde a 3,3 mm. (C-E) Imagens correspondentes aos íons $[M+H]^+$ da Bradicininina, (Val1, Thr6)-Brdicininina e nattererina 1 e 2, respectivamente.

6.6.2. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA

Os tecidos de *P. nattereri* contendo as glândulas granulares dorsais e aqueles contendo as glândulas inguinais foram empregados nos ensaios para a construção de duas bibliotecas de cDNA. Após pulverização dos tecidos em nitrogênio líquido, estes foram submetidos às extrações de RNA total, a partir dos quais os cDNAs foram sintetizados. Quatro conjuntos de oligonucleotídeos degenerados (Tabela 3) foram empregados nas reações de RT-PCR utilizando como molde os cDNAs procedentes de ambos os tecidos investigados. A clonagem dos fragmentos de interesse amplificados, a posterior transfecção em bactérias e a consequente recuperação dos plasmídeos tornaram possível o sequenciamento de 192 clones gerados a partir das glândulas granulares dorsais e 192 das glândulas inguinais.

A tradução *in silico* dos nucleotídeos permitiu a determinação de 20 sequências distintas contendo as características estruturais dos precursores que codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios: peptídeos sinal, região acídica, sítios de reconhecimento para endopeptidases e peptídeo maduro. No entanto, dentre estes, somente na biblioteca construída a partir das glândulas inguinais foi possível identificar apenas dois que codificam estruturas, as quais compartilham similaridade com moléculas já conhecidas, ambos codificando peptídeos relacionados a bradicininas. Não foi possível caracterizar os precursores que codificam as nattererinas.

Os precursores foram nomeados de BBN1 (Figuras 25) e BKL1 (Figura 26). Observa-se que o precursor BBN1 codifica três peptídeos relacionados a bradicininas (duas cópias da (Val1, Thr6)-Bradicinina-SPA e uma da Bradicinina), além de um peptídeo que possui similaridade a peptídeos opióides. Esse precursor possui regiões com sequências desconhecidas de aminoácidos e sítios de reconhecimento de endopeptidases inseridos entre

os peptídeos ativos identificados, os quais tornam possível a liberação destes no lúmen das glândulas, ao passo que o precursor BKL1 codifica apenas uma cópia do peptídeo Bradicinina.

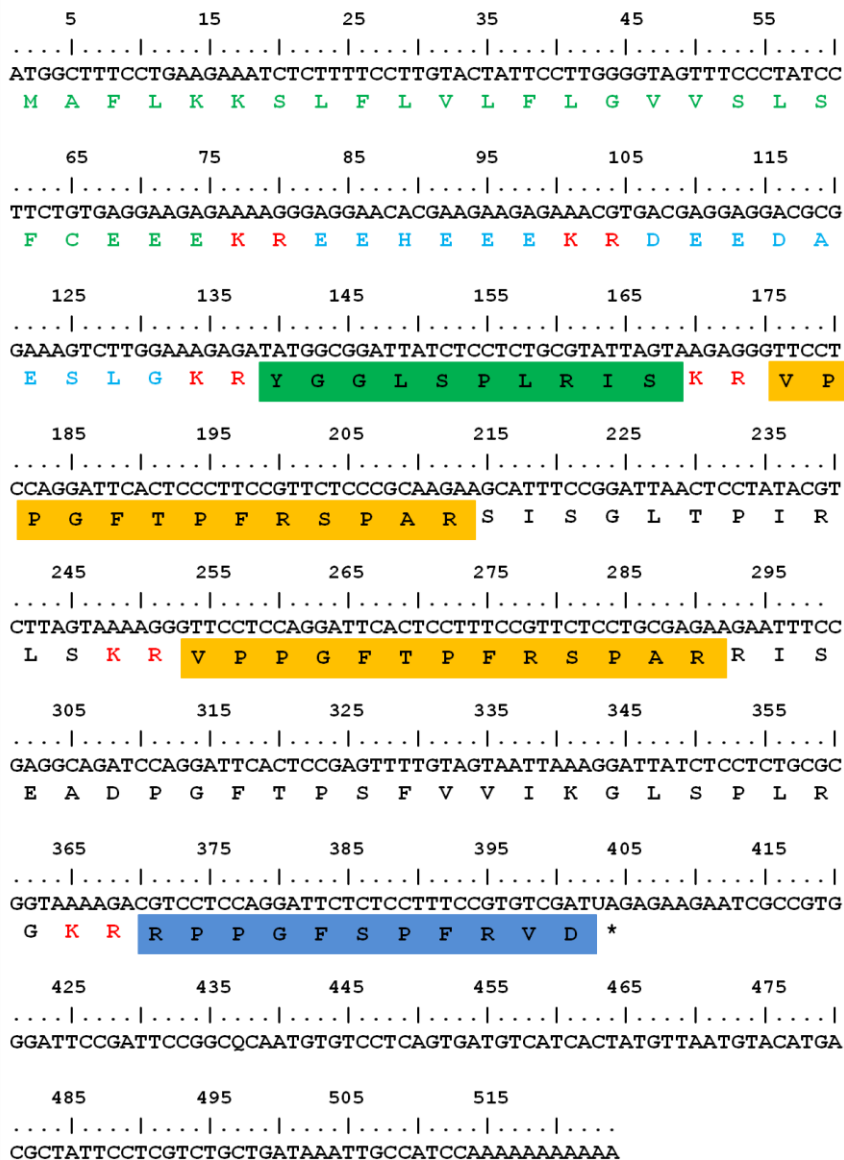


Figura 25. Estrutura do precursor BBN1 o qual codifica (Val1, Thr6)-Bradicinina-SPA e Bradicinina caracterizados em *P. nattereri*. A sequência de aminoácidos predita evidencia (verde) peptídeo sinal, (azul) região acídica, (vermelho) sítios de clivagem enzimática; (caixa verde) peptídeo opióide, (caixa laranja) peptídeo (Val1, Thr6)-Bradicinina-SPA e (caixa azul) peptídeo Bradicinina. O asterisco indica o códon de terminação.

```

      5          15          25          35          45          55
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATGGCTTTCCTGAAAAAATCGCTTTTCTTGATTATTCTCGGGGTAGTTCCTATCC
M A F L K K S L F L V L F L G V V S L S

      65          75          85          95          105         115
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTCTGTGAGGAAGAGGAAAGGGAGGAACACGGAAGAAGAGAAACGTGAAGCGGAAGCCGCG
F C E E E E R E E H E E E K R E A E A A

      125         135         145         155         165         175
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GAAAGTGCAGAAAACCTGATAAGCAAGAGGGTTCCTCCGGGATTCACCTTTCCGTGTC
E S A E N L I S K R V P P G F T P F R V

      185         195         205         215         225         235
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GATTAGAGAAGAAATCGCCGCTTGATTCTGACCCATGTGTCTCAGTGATGTCATCACTA
D *

      245         255         265
....|....|....|....|....|....|...
TATTAAAGTCTATGACACATCCTAAAAA

```

Figura 26. Estrutura de cDNA codificando Bradicinina, (Val1, Thr6)-Bradicinina caracterizados em *P. nattereri*. A sequência de aminoácidos predita evidencia (verde) peptídeo sinal, (azul) região acídica, (vermelho) sítios de clivagem enzimática; (caixa laranja) peptídeo (Val1, Thr6)-Bradicinina-VD. O asterisco indica o códon de terminação.

6.6.3. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM BRADICININAS NAS GLÂNDULAS GRANULARES DORSAIS E NAS GLÂNDULAS INGUINAIS

Visando investigar os níveis de transcrição das bradicininas nas glândulas granulares dorsais e nas glândulas inguinais, dois oligonucleotídeos foram sintetizados com base nas sequências nucleotídicas dos precursores que codificam as bradicininas, caracterizados a partir da biblioteca de cDNA construída utilizando o RNA extraído das glândulas granulares (Anexo I).

Desta maneira, os oligonucleotídeos foram empregados em ensaios de PCR em tempo real utilizando como molde cDNAs obtidos a partir de ambos os tecidos. Os ensaios para a determinação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos apresentaram como resultado valores próximos à 100% de eficiência. Os resultados demonstram que o precursor BBN1 foi quase 30000 vezes mais transcrito nas glândulas inguiniais do que nas glândulas granulares dorsais e também cerca de 30000 vezes mais expresso que o precursor BKL1 nas glândulas inguiniais, ao passo que, os níveis de transcrição de ambos os genes foram semelhantes nas glândulas granulares dorsais (Figura 27).

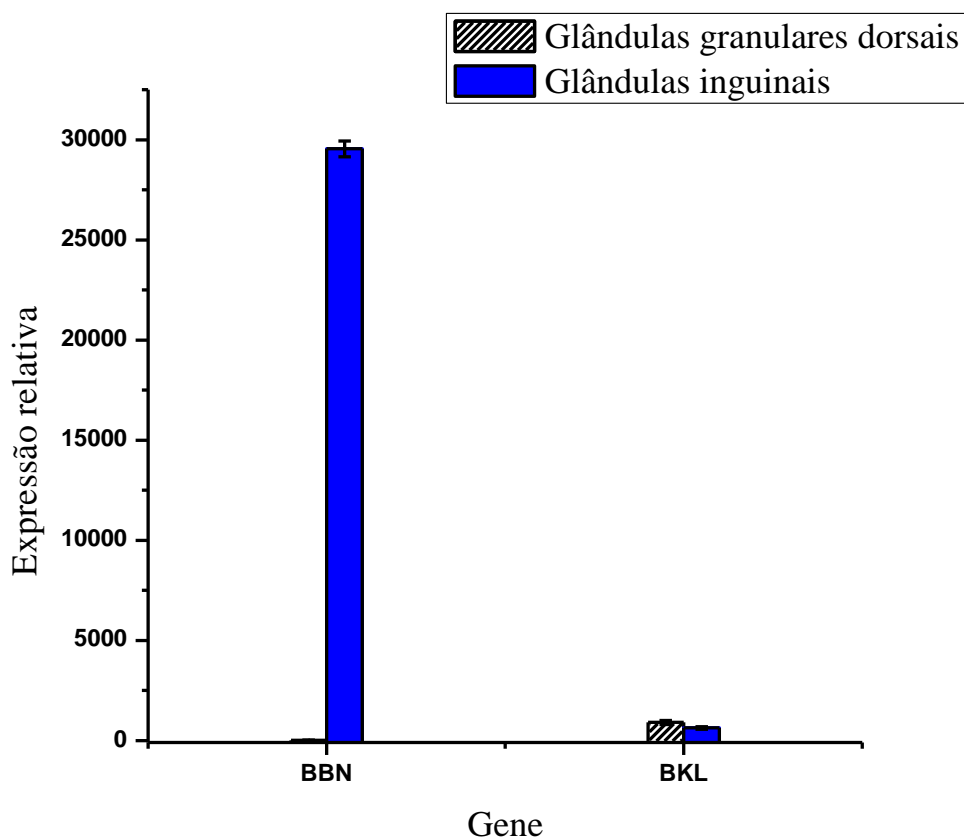


Figura 27. Expressão relativa dos precursores BBN e BKL nas glândulas granulares dorsais e inguiniais de *P. nattereri*. Os níveis de transcrição estão expressos em unidades arbitrárias. Os dados foram normalizados com a expressão do gene que codifica a proteína actina. As barras horizontais representam os desvios padrões médios (três repetições).

7. DISCUSSÃO

7.1. SECREÇÃO CUTÂNEA DE *P. azurea*

O estudo envolvendo a caracterização dos componentes da secreção de anfíbios é considerado importante devido ao potencial biotecnológico que tais moléculas possuem. Dessa maneira, transcriptomas e proteomas têm sido montados a partir do material biológico de diferentes espécies de anfíbios. Quanto àqueles, o sequenciamento de Sanger era a técnica disponível e a que tornou possível a obtenção dos transcriptomas disponíveis na literatura, até o recente surgimento dos sequenciadores automáticos de última geração, conhecidos como pirosequenciamento. Dessa maneira, a área do conhecimento em questão encontra-se em um momento de transição devido às características e aos tipos de resultados distintos que podem ser alcançados utilizando as diferentes técnicas de determinação de sequências nucleotídicas.

O ponto de partida para a realização dos experimentos envolvendo *P. azurea* foi a obtenção do transcriptoma do tecido cutâneo, utilizando para tal o pirosequenciamento 454. Dentre os 615 mil fragmentos sequenciados foi possível caracterizar 85 precursores distintos, os quais compartilham a estrutura conservada dos pré-pró-peptídeos bioativos caracterizados em anfíbios, além de 14 inibidores enzimáticos e 10 precursores de hormônios peptídicos. A fim de comparação, em um trabalho recentemente publicado, o método de sequenciamento de Sanger foi utilizado para montar o transcriptoma de *Phyllomedusa nordestina*, um anfíbio que também pertence ao grupo Hypochondrialis (portanto, muito semelhante à *P. azurea*). Neste, foram identificados 45 precursores distintos (Neiva *et al.*, 2013) contendo a estrutura conservada dos pré-pró-peptídeos bioativos caracterizados em anfíbios.

Dessa maneira, o pirosequenciamento 454 mostrou-se satisfatório para o objetivo proposto e vantajoso quando comparado ao método de Sanger no que diz respeito ao número de precursores distintos identificados que compartilham a estrutura conservada daqueles que

codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios, sem levar em consideração os diferentes desafios inerentes ao processamento das amostras que cada técnica requer.

Além dos precursores que codificam peptídeos cujas atividades são conhecidas na literatura, foram identificadas 28 sequências contendo a estrutura de pré-pró-peptídeos de anfíbios anuros, cujo peptídeo maduro não apresenta similaridade com aqueles encontrados nos bancos de dados. Dessa maneira, imprescindivelmente, o potencial biotecnológico inerente a essas moléculas deve ser investigado.

A tentativa de montagem do transcriptoma utilizando o genoma de referência disponível, construído a partir de *Xenopus laevis*, não se mostrou satisfatória. Isto se deu, provavelmente, porque esse anfíbio pertence a um grupo evolutivamente distante ao das Phyllomedusas. Além do mais, apenas seis peptídeos antimicrobianos foram descritos em sua secreção. Diante do reconhecido potencial biotecnológico inerente aos peptídeos isolados das secreções de anfíbios e da admitida riqueza de moléculas presentes nas secreções de Phyllomedusas, faz-se necessário um projeto visando o sequenciamento do genoma de um anfíbio pertencente esse grupo.

Foi testada a possibilidade de montar um proteoma da secreção cutânea de *P. azurea* de maneira automatizada. Observa-se que tal tentativa mostrou-se ineficiente, pelo menos da maneira pela qual foi proposta, o que pode ser deduzido pelo baixo número de peptídeos caracterizados (Tabela 7). No entanto, o experimento permitiu identificar 11 peptídeos inéditos na secreção cutânea de *P. azurea*, cujos precursores foram identificados, até o momento, apenas no transcriptoma gerado nesse trabalho. Dentre estes, destacam-se aqueles que codificam peptídeos que não possuem qualquer similaridade com estruturas depositadas nos bancos de dados abertos à comunidade científica (NR 1, NR 6, NR 8, NR 13, NR 21). Tais peptídeos devem ser submetidos a testes de caracterização da atividade biológica.

Sendo assim, o método empregado na caracterização automatizada de peptídeos que compõe a secreção de *P. azurea* pode ser otimizado e utilizado de maneira complementar às técnicas mais frequentemente utilizadas, objetivando-se uma maior cobertura na determinação de estruturas que compõe tal secreção, auxiliando na validação dos dados apresentados no transcriptoma do anfíbio em questão.

7.2. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS NAS GLÂNDULAS GRANULARES DE *P. azurea* APÓS ESTÍMULO ELÉTRICO

Anfíbios da espécie *P. azurea* foram submetidos ao estímulo elétrico com o objetivo de esvaziar o conteúdo peptídico de suas glândulas granulares. Após isto, eles permaneceram em cativeiro não esterilizado durante tempos pré-definidos, quando então, seus tecidos cutâneos foram empregados em experimentos de PCR em tempo real e MALDI-*Imaging*, com a finalidade de determinar o padrão de restauração do conteúdo glandular.

Os gráficos que apresentam os níveis de transcrição dos genes analisados permitem inferir que aqueles que codificam as triptofilinas, a dermaseptina 5, as filoseptinas e as bradigininas são os mais expressos no tecido cutâneo de *P. azurea*. Ao passo que, o que codifica o inibidor enzimático está entre os menos transcritos. Porém, vale ressaltar que conclusões acerca dos resultados referentes ao oligonucleotídeo que anela em todas as dermaseptinas devem ser analisadas com cautela, já que a eficiência deste foi de apenas 60% (Tabela 8). Observa-se que, com exceção do inibidor enzimático, existe um padrão na variação da transcrição dos genes após a aplicação do estímulo elétrico. Isto sugere que, provavelmente, a maioria desses genes pode estar, ao menos em tais condições, sobre o controle de um mesmo promotor gênico.

Os resultados obtidos nos experimentos de MALDI-*Imaging*, demonstrados na Figura 8, sugerem que, embora o estímulo elétrico aplicado não tenha promovido o esvaziamento completo do conteúdo das glândulas granulares, já que alguns peptídeos ainda foram identificados no tecido cutâneo de dois anfíbios no “tempo zero” (Tabela 10), ele satisfaz o objetivo do experimento o qual era causar um estresse nos anfíbios promovido pela ausência de peptídeos nas glândulas granulares. Isto é reforçado pelo fato de, 24 horas após a aplicação do estímulo, haver menos de 25% dos íons analisados no tecido cutâneo dos anfíbios submetidos ao experimento. Além do mais, mesmo 72 horas após a aplicação do estímulo elétrico, o conteúdo das glândulas granulares dos anfíbios não foi totalmente restaurado, ainda quando comparado com os controles.

Os resultados sugerem que houve uma redução no conteúdo das glândulas granulares dos anfíbios 24 horas após a aplicação do estímulo elétrico, quando comparados com aqueles do “tempo zero”. O mesmo aconteceu 72 horas após aplicação do estímulo, quando comparado com 48 horas. Isto pode ser explicado pelo fato de os anfíbios terem sido acondicionados em ambiente não estéril após o esvaziamento das glândulas granulares, dede que, foi demonstrado que a presença de microrganismos estimula o envio do conteúdo glandular para a superfície do tecido cutâneo em anfíbios (Simmaco *et al.*, 1998).

Por outro lado, no que diz respeito aos resultados obtidos nos experimentos de PCR em tempo real, apenas o gene da Triptofilina 1 apresentou níveis elevados de transcrição logo após o esvaziamento das glândulas, apresentando um padrão um pouco diferente dos demais genes. Como a presença de microrganismos pode induzir a síntese de peptídeos para a secreção cutânea (Simmaco *et al.*, 1998), o aumento da transcrição dos precursores que codificam peptídeos antimicrobianos seria esperado. Provavelmente, a quantidade de microrganismos presentes no ambiente não tenha sido suficiente para causar tal resposta. Como nos experimentos envolvendo microrganismos, no qual foram utilizadas bactérias em

grandes concentrações, são observados aumentos nos níveis de transcrição e na quantidade de peptídeos presentes no tecido cutâneo de *P. azurea*, é possível que os níveis de expressão de peptídeos da secreção cutânea seja proporcional à concentração de microrganismos presente no tecido.

O motivo pelo qual houve um aumento nos níveis de transcrição do precursor das triptofilinas no “tempo zero” foi inesperado, já que estas não possuem atividade antimicrobiana (dados não demonstrados). Dessa maneira, como a função desse grupo de peptídeos ainda não é bem estabelecida, se faz necessário que experimentos complementares sejam realizados a fim de tentar elucidar o papel desse grupo de moléculas em anfíbios. Além do mais, resta descobrir porque após a aplicação do estímulo elétrico não foi possível identificar a presença da triptofilina nos tecidos dos anfíbios, apesar de os níveis de transcrição do gene que a codifica ter apresentado os mais altos níveis de transcrição, quando comparado aos demais genes analisados.

Os anfíbios que não sofreram estimulação elétrica e permaneceram em cativeiro por 72 horas (Controle 2) apresentaram níveis de transcrição cujos valores foram menores do que aqueles que compunham os demais grupos experimentais (Figura 7). Os experimentos de MALDI-*Imaging* sugerem que após as 72 horas em cativeiro a área do tecido cutâneo coberta por peptídeos foi semelhante ao do anfíbio controle 1 (Figura 8), além disto, todos os íons analisados possuíram intensidade igual a, pelo menos, 75%. Dessa maneira, porque as glândulas granulares apresentaram-se carregadas de peptídeos, a transcrição de seus precursores apresentou-se com níveis menores do que nos demais anfíbios.

Os dados apenas não permitem inferir sobre o porquê de os anfíbios que não permaneceram em cativeiro e não sofreram a estimulação elétrica (Controle 1) terem

apresentado níveis tão elevados de transcrição dos precursores analisados. O experimento deve ser repetido para confirmar esse dado.

Os mecanismos que controlam a transcrição, a síntese e o processamento dos diferentes peptídeos que compõem a secreção cutânea de anfíbios anuros ainda são pouco, ou quase nada, conhecidos. Os resultados apresentados na Tabela 10 permitem inferir que, ao menos no que diz respeito aos mecanismos de tradução, a expressão de peptídeos, ou envio destes para a superfície cutânea, parece ser heterogênea e direcionada. Isto porque após o completo esvaziamento das glândulas granulares, 48 horas após a aplicação do estímulo elétrico, apenas os íons das filoseptinas alcançam 25 ou 50% de intensidade, em pelo menos dois anfíbios que compõem a triplicata. Além do mais, mesmo 72 horas após a aplicação do estímulo elétrico, a síntese dessa classe de peptídeos, aparentemente, é favorecida.

Presumindo que todos os precursores analisados, cujos níveis de transcrição apresentaram valores aproximados, foram traduzidos e enviados para as glândulas cutâneas, por que principalmente as filoseptinas alcançaram valores de restauração entre 50% e 75%, 48 horas após a aplicação do estímulo elétrico? Uma hipótese a ser testada seria a existência de um mecanismo controlado de envio de peptídeos para a superfície do tecido cutâneo do anfíbio.

Na tentativa de buscar evidências acerca dos mecanismos que controlam a expressão de peptídeos da secreção cutânea em *P. azurea*, os precursores dos hormônios peptídicos que foram caracterizados nas análises do transcriptoma desse anfíbio (Tabela 6) foram submetidos aos experimentos de PCR em tempo real após a aplicação do estímulo elétrico. Os baixos níveis de transcrição apresentados na Figura 9 indicam um padrão de expressão comum aos genes que codificam peptídeos hormônios.

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos de MALDI-*Imaging*, os hormônios calcitonina, gastrina e somatostatina podem estar envolvidos nos mecanismos de expressão dos peptídeos que compõe as glândulas granulares. Tais precursores exibiram níveis de transcrição com valores mais altos no “tempo zero”, quando as glândulas apresentaram-se vazias, e valores mais baixos no controle 2, o qual apresentou todos os íons com intensidade de, pelo menos 75%. Essas inferências são corroboradas pelo fato de os anfíbios do controle 2 terem apresentado baixos níveis de transcrição dos precursores que codificam os peptídeos bioativos, cujos valores foram menores do que os demais grupos experimentais. Conclusões acerca dos resultados referentes ao oligonucleotídeo GHRH devem ser analisadas com cautela, já que a eficiência deste foi de apenas 60% (Tabela 11).

A calcitonina, a gastrina e somatostatina são hormônios que, além de outros órgãos, agem no sistema gastrointestinal de diversos animais, cuja função principal é regular a secreção de ácido clorídrico produzido pelas células parietais do estômago (Schubert, 2007). A gastrina é um estimulante direto da secreção gástrica e também age indiretamente estimulando a excreção de histaminas, as principais indutoras da secreção gástrica (Erdogan *et al.*, 2006). A somatostatina é o principal inibidor da secreção gástrica porque impede a excreção da gastrina e da histamina. Sua liberação é induzida pelos hormônios peptídicos colecistoquinina, pelo peptídeo natriurético e pelo ácido nítrico (Schubert, 2007). Outras ações fisiológicas causadas pela somatostatina no sistema gastrointestinal podem ser visualizadas na Tabela 20.

Tabela 20. Ações fisiológicas causadas pela somatostatina no sistema gastrointestinal – adaptado de Low (2004).

Órgão	Ação da somatostatina
Ilhotas pancreáticas	Inibição da secreção de insulina e de glucagon;
Estômago	Inibição da secreção gástrica e de histaminas;
Intestino delgado	Inibição da degranulação, inibição da secreção de interleucinas e do peptídeo relacionado ao glucagon;
Colón	Modula a relaxação descendente e estimula o transporte de íons.

É sugerido que a calcitonina, no sistema gastrointestinal, aja principalmente como neurotransmissor, e não como hormônio circulante, uma vez que, não foi detectada nenhuma célula produtora desse peptídeo nos organismos estudados (Evangelista, 2009). Foi observado que a calcitonina possui um papel de proteção ao epitélio estomacal que se faz por meio da indução da excreção de somatostatina (Inui *et al.*, 1991) e promoção da vasodilatação local (Holzer *et al.*, 1990). Em outros órgãos, possui uma função hormonal com respostas das mais diversas, como ao estímulo sensorial, cardiovascular e vasodilatação. Além disto, no sistema respiratório é capaz de promover a constrição da musculatura lisa que envolve os alvéolos pulmonares (Pinto *et al.*, 1996).

É interessante a semelhança existente entre o tecido cutâneo de anfíbios e o sistema gastrointestinal dos animais. Ambos estão expostos constantemente a microrganismos exógenos, possuem uma microbiota residente, participam do controle de captação de água e produzem peptídeos antimicrobianos. No intestino, são principalmente as células de Paneth localizadas no intestino delgado que sintetizam e excretam proteínas e peptídeos antimicrobianos, estes, conhecidos como defensinas (Ouellette, 1997). Os mecanismos de defesa empregados por essa classe de moléculas compartilham muitas características com aqueles relacionados a peptídeos sintetizados pelas glândulas granulares de anfíbios, entre elas:

- 1) As defensinas formam uma classe de peptídeos pequenos (29-45 resíduos de aminoácidos) e catiônicos;
- 2) Os genes que codificam as defensinas em humanos e camundongos possuem dois éxons e estão dispostos de maneira agrupada em um mesmo cromossomo, sugerindo que todas as defensinas possuem um gene ancestral comum (Ouellette *et al.*, 1989; Linzmeier *et al.*, 1999);

- 3) Os genes das defensinas transcrevem pré-pró-peptídeos, os quais possuem sítios de reconhecimento à tripsina que realizam clivagens pós traducionais para gerar o peptídeo maduro (Ghosh *et al.*, 2002);
- 4) Ensaio *in vitro* demonstram que as defensinas isoladas em sistemas gastrointestinais possuem atividade antimicrobiana testada contra diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Hamanaka *et al.*, 2001; Salzman *et al.*, 2003);
- 5) O mecanismo de ação das defensinas seria mediado pela formação seletiva de poros que transpõe as membranas bacterianas (White *et al.*, 1995);
- 6) Foi demonstrado que a presença de microrganismos estimula a transcrição dos genes que codificam as defensinas (Takahashi *et al.*, 2001).

Além das semelhanças citadas, o presente trabalho descreve a presença de transcritos no tecido cutâneo de *P. azurea* que codificam a insulina, o VIP, a somatostatina, a gastrina e a calcitonina, os quais são hormônios característicos do sistema gastrointestinal de animais. Apesar de os níveis de transcrição do gene que codifica a insulina terem sido extremamente baixos, o que poderia refletir em uma expressão basal sem significado biológico, não existem relatos da transcrição desse gene em tecidos cutâneos, até o momento.

Embora a função dessas moléculas no tecido cutâneo de *P. azurea*, e por sua vez, nas glândulas granulares, não possa ser esclarecido ainda, a semelhança entre esse órgão e o sistema gastrointestinal de animais pode ser importante no direcionamento de futuros experimentos que têm por objetivo investigar os mecanismos que controlam o funcionamento das glândulas granulares presentes em anfíbios anuros, assim como, o papel dos hormônios caracterizados aqui.

7.3. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PEPTÍDEOS NAS GLÂNDULAS GRANULARES DE *P. azurea* APÓS ESTÍMULO BIÓTICO

Após a extração da secreção cutânea, anfíbios da espécie *P. azurea* foram submetidos ao contato cutâneo com bactérias Gram-negativa e Gram-positiva por um período de 24 horas, quando então os procedimentos visando a determinação dos níveis de transcrição de genes de interesse por PCR em tempo real e a obtenção de imagens por MALDI-*Imaging* foram realizados.

Observa-se na Figura 10 que os precursores que codificam peptídeos da secreção cutânea apresentaram níveis maiores de transcrição nos anfíbios que foram submetidos ao contato com bactéria Gram-positiva, principalmente no que diz respeito aos precursores que codificam as bradigininas (todas), Dermaseptina 05, dermaseptinas (todas) e filoseptinas (todas). Em parte, isto pode ser explicado porque, nos experimentos que envolvem a caracterização da atividade antimicrobiana, essas classes de moléculas, geralmente, apresentam valores de MIC (concentração mínima inibitória) maiores quando testadas contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas (Leite *et al.*, 2005; Magalhaes *et al.*, 2008). No entanto, os dados presentes na literatura não permitem explicar os altos níveis de transcrição das bradiginina (todas), devido ao fato de não haver relatos de atividade antimicrobiana para essa classe de moléculas.

Os resultados sugerem, ainda, que a transcrição dos genes que codificam os peptídeos bioativos que compõe a secreção cutânea de *P. azurea* pode ser modulada de acordo com o ambiente em que ele se encontra. Isto é evidenciado pelo fato de o precursor da Tryptofilina 1 ter sido aquele que apresentou os maiores níveis de transcrição 24 horas após os anfíbios terem sofrido apenas o estímulo elétrico, ao passo que, a exposição dos anfíbios aos

microrganismos pelo mesmo período de tempo promoveu um padrão de expressão diferente, no qual os precursores que apresentaram os níveis de transcrição mais elevados foram, principalmente, aqueles que codificam peptídeos antimicrobianos (Figura 10).

Além disto, o mapeamento dos íons presentes no tecido cutâneo dorsal desses animais permitiu observar que a exposição dos anfíbios ao microrganismo Gram-positivo induziu não apenas um aumento nos níveis de transcrição, mas também, nas taxas de processamento e estocagem de peptídeos das glândulas granulares. Praticamente todos os íons analisados apresentaram valores expressivos de intensidade, diferente do que ocorreu 24 horas após os anfíbios serem submetidos apenas ao estímulo elétrico, quando nenhum íon analisado apresentou, pelo menos, 25% de intensidade, quando comparados aos controles que não permaneceram em cativeiro (Figura 8 e Tabela 10).

Estas inferências corroboram com a hipótese de que a grande diversidade de peptídeos antimicrobianos que compõe as secreções cutâneas de anfíbios surgiu a partir de uma molécula ancestral comum a qual sofreu modificações no decorrer da evolução de acordo com os microrganismos que habitavam o ambiente em que tais anfíbios viviam (Vanhoye *et al.*, 2003).

Ainda a respeito dos resultados obtidos nos experimentos de *MALDI-Imaging*, observa-se que praticamente todos os íons analisados foram identificados com intensidade de 75% no tecido cutâneo dos anfíbios que compuseram o controle tampão (Tabela 12), ao passo que, nenhum deles foi identificado com intensidade de, pelo menos, 25% nos anfíbios que sofreram apenas o estímulo elétrico (Tabela 10). Paradoxalmente, aqueles foram capazes de estocar peptídeos nas glândulas granulares em quantidades, embora, tenham apresentado uma taxa menor de transcrição dos precursores analisados, quando comparados aos que foram submetidos, apenas, ao estímulo elétrico (Figura 10).

Quanto aos peptídeos presentes na pele dos anfíbios do grupo controle, sugere-se que, como os experimentos visando a determinação da cinética de restauração do conteúdo glandular em *P. azurea* foram realizados em ambiente não esterilizado, os peptídeos presentes nas glândulas granulares 24 horas após o estímulo elétrico podem ter sido enviados à superfície do tecido cutâneo devido à presença de microrganismos, esvaziando-as. Como o controle tampão compreendeu anfíbios que permaneceram em ambiente esterilizado, os peptídeos sintetizados até aquele momento permaneceram estocados nas glândulas granulares. Isto explicaria, também, o fato de o controle tampão ter apresentado uma taxa menor de transcrição dos precursores analisados, quando comparado aos anfíbios que sofreram apenas o estímulo elétrico e permaneceram em ambiente não esterilizado. Novos experimentos devem ser realizados para avaliar essa proposição.

O mesmo raciocínio pode ser adotado para os resultados obtidos a partir das análises realizadas com os anfíbios, os quais foram submetidos ao contato com a bactéria Gram-negativa. Como tais bactérias foram isoladas do tecido cutâneo de um anfíbio pertencente ao grupo das Phyllomedusas, a cepa de bactéria Gram-negativa pode ter estimulado menos o sistema imune inato por existir uma possibilidade de esta fazer parte da microbiota normal do anfíbio, por exemplo. Dessa maneira, seria interessante investigar os níveis de expressão de genes que codificam peptídeos nas glândulas granulares de anfíbios quando estes são expostos a uma variedade maior de microrganismos, tanto residentes, quanto exógenos.

Quanto aos genes que codificam os hormônios analisados, observa-se que a presença dos microrganismos promoveu uma redução nos seus níveis de transcrição, com exceção dos precursores que codificam a insulina e o VIP, quando comparado aos anfíbios que sofreram apenas o estímulo elétrico. Conjurando com a hipótese de que tais hormônios podem estar envolvidos nos mecanismos que regulam a expressão de peptídeos para a secreção cutânea de *P. azurea*, estes participariam dos mecanismos basais de transcrição/tradução dos

peptídeos, ao passo que, a presença de altas concentrações de microrganismos por si só já seria suficiente para acionar outra rota de sinalização, a qual desencadearia uma resposta mais intensa sobre todo o processo de defesa realizado pelo sistema imune inato.

Dessa maneira, os hormônios insulina e VIP poderiam estar mais envolvidos nos mecanismos pós-transcricionais, como por exemplo no controle de envio dos grânulos secretórios para o lúmen das glândulas secretoras. No entanto, como tais peptídeos podem ser responsáveis por um grande número de respostas, dependendo das células que os reconhecem, não é possível inferir de maneira segura suas possíveis funções nos mecanismos que regulam a síntese de peptídeos nas glândulas granulares de anfíbios sem antes realizar novos experimentos.

Observa-se na Figura 12 que o nível de transcrição do gene que codifica o VIP foi maior nos anfíbios submetidos ao contato com microrganismos, e nos anfíbios controle, do que naqueles que sofreram apenas a estimulação elétrica. Ao contrário dos anfíbios que sofreram apenas a estimulação elétrica, os demais grupos experimentais foram submetidos ao contato com NaCl 0,6% o qual, mesmo em concentração baixa, pode ter promovido algum nível de desidratação nesses anfíbios. Sabe-se que o VIP é um hormônio secretório o qual no intestino induz o envio de água para o lúmen deste, ao ponto de estar envolvido em alguns tipos de diarreia, possuindo então uma função de regulação da perda/absorção de água (Burleigh e Banks, 2007).

7.4. MONITORAMENTO DO CONTEÚDO DA SECREÇÃO GLANDULAR de *P. azurea* DURANTE A METAMORFOSE

A metamorfose de *P. azurea* foi acompanhada em laboratório. Animais nos estágios 37, 41, 43, 44, 46 e adulto foram submetidos a diferentes experimentos, com o objetivo de investigar o desenvolvimento das glândulas granulares no que diz respeito ao conteúdo de

peptídeos. Sendo assim, os anfíbios foram submetidos aos experimentos de MALDI-*Imaging*, cromatografia líquida da secreção cutânea e análise de transcrição gênica utilizando a técnica de PCR em tempo real.

A determinação do estágio de desenvolvimento em que os anfíbios se encontravam foi realizada de acordo com os padrões morfológicos sugeridos por Gosner (1960). A escolha desse sistema de classificação dos estágios de desenvolvimento se deu por pura conveniência e seu valor reside somente como modelo didático, desde que, denotam ainda mais importância as mudanças morfológicas internas e de nível molecular que os anfíbios sofrem durante todo esse processo.

A determinação da porcentagem do tecido cutâneo ocupado por íons nos tecidos de *P. azurea* em diferentes estágio de desenvolvimento demonstra que existe um aumento gradual da quantidade de glândulas ativas com o avançar da metamorfose (Figura 13). Observa-se, ainda, uma diferença espacial na distribuição das glândulas ativas, de tal maneira que, a concentração de peptídeos foi sempre maior na região anterior do corpo dos animais, quando comparada à região posterior, independentemente do estágio de desenvolvimento em que se encontravam.

A determinação da porcentagem do tecido cutâneo ocupado por íons sugere, também, que os girinos de *P. azurea* são capazes de estocar peptídeos, nas concentrações necessárias para serem identificados por MALDI-*Imaging* e LC-MS, a partir do estágio 41 de desenvolvimento (Figura 13). Além disto, a secreção cutânea de um dos anfíbios pertencentes ao estágio 41 de desenvolvimento (n=1) apresentou um cromatograma mais pobre em frações do que os demais, sugerindo que nesse estágio de desenvolvimento as glândulas se encontram em estágios prematuros de desenvolvimento.

Isto corrobora os dados de Delfino *et al.* (1998), os quais observaram, utilizando microscopias óptica e eletrônica, que numerosas glândulas de *Phyllomedusa hypochondrialis* no estágio 41 da metamorfose encontravam-se em estágios avançados de maturação. Embora o autor não tenha mencionado qualquer experimento utilizando anfíbios em estágios mais precoces de desenvolvimento, os experimentos de cromatografia líquida, MALDI-*Imaging* e espectrometria de massa realizados com amostras oriundas dos anfíbios pertencentes ao estágio 37 (Figura 19-A) apoiam tais inferências, já que nenhum íon foi identificado nessas análises.

Os resultados obtidos a partir dos experimentos de MALDI-*Imaging* (Figura 14) e cromatografia líquida (Figura 19-B) permitem inferir que os anfíbios no estágio 41 da metamorfose possuem baixíssimas concentrações de peptídeos estocados nas glândulas granulares, quando comparados àqueles que acabaram de realizar a transição para o habitat terrestre (Figura 15 e Figura 19-C). No entanto, ao mesmo tempo, os níveis de transcrição dos precursores que contêm a estrutura conservada pelos peptídeos antimicrobianos em anfíbios diminuem drasticamente (Figura 22). Dessa maneira, os resultados permitem inferir que, nos anfíbios do estágio 41 de desenvolvimento, os peptídeos sintetizados nas glândulas granulares são imediatamente difundidos para o meio aquoso. Quando o anfíbio passa a habitar o meio terrestre, os peptídeos passam a ser estocados nas glândulas granulares, o que culmina com a redução gradual dos níveis de transcrição dos seus precursores.

Dessa maneira, os níveis de transcrição dos precursores que codificam peptídeos bioativos nas glândulas granulares, juntamente com os dados de MALDI-*Imaging* realizados em anfíbios que se encontravam em diferentes etapas da metamorfose sugerem evidências da existência de um mecanismo de regulação retronegativa da transcrição dos precursores. Este pode ser observado pelo fato de os precursores em questão terem apresentado níveis de transcrição cujos valores foram quase que inversamente proporcionais à quantidade de

peptídeos estocados nas glândulas granulares nos anfíbios de cada estágio de desenvolvimento estudados.

Ainda, quanto aos resultados obtidos nos experimentos de PCR em tempo real, observa-se que os anfíbios pertencentes ao estágio 37 da metamorfose apresentaram os maiores níveis de transcrição dos precursores que codificam os peptídeos antimicrobianos (Figura 22), ao passo que nenhum íon ou peptídeo foi caracterizado nesse estágio, utilizando as técnicas de MALDI-*Imaging* ou LC-MS. Duas proposições são apresentadas: 1) estariam os anfíbios sintetizando e estocando os respectivos peptídeos nas glândulas granulares em fase precoce de maturação (sem haver os ductos que levam o seu conteúdo à superfície, por exemplo)? 2) existiria algum outro mecanismo, ou estrutura celular, capaz de sintetizar os peptídeos e enviá-los imediatamente ao meio aquoso protegendo os girinos até que as glândulas granulares tornem-se funcionais? Outros experimentos devem ser realizados com o objetivo de investigar as causas.

Ainda a respeito dos anfíbios pertencentes ao estágio 41 da metamorfose (habitat aquático), o principal peptídeo encontrado na secreção, e ao mesmo tempo, o único que foi possível mapear nos experimentos de MALDI-*Imaging*, foi uma triptofilina cuja estrutura primária é FPPWL-NH₂ (Figura 20). Isto se deve, provavelmente, ao fato de esse peptídeo possuir apenas resíduos de aminoácido hidrofóbicos, o que dificulta a sua difusão para o meio aquoso. Sendo assim, tal molécula, provavelmente, exerce uma função importante para *P. azurea* nesse estágio de desenvolvimento. Esses resultados são importantes para o direcionamento de investigações que objetivam determinar a função das triptofilinas em anfíbios, desde que, apesar de alguns artigos científicos sugerirem algumas atividades biológicas para essa classe de moléculas, esta prevalece incerta (Conlon *et al.*, 2005; Samgina *et al.*, 2010).

A partir do momento em que *P. azurea* abandona o meio aquático, os resultados obtidos nos experimentos de MALDI-*Imaging* e cromatografia líquida sugerem um aumento gradual do número de peptídeos estocados e de glândulas granulares estocando moléculas em quantidades (Figuras 15-18). No entanto, os dados sugerem que, mesmo no estágio 46 de desenvolvimento, no qual o anfíbio é considerado um animal jovem e o processo de metamorfose está totalmente completo, as glândulas granulares ainda não estão totalmente maturadas.

Isto é evidenciado por: 1) Apesar de o valor da área do tecido dorsal ocupada por glândulas contendo peptídeos em quantidades nos animais do estágio 46 ser próximo ao dos animais adultos (Figuras 13), o perfil de colocalização de íons obtido a partir das análises realizadas com animais adultos apresenta um número maior de íons, os quais possuem níveis de colocalização mais elevados quando comparado aos animais dos estágios anteriores (Figuras 14-18); 2) verifica-se a ausência dos íons 32 a 53 nos anfíbios do estágio 46 (Figuras 17); e 3) os perfis cromatográficos da secreção dos animais adultos é diferente daqueles do estágio 46 (Figura 19).

A Tabela 13 indica que grande parte dos íons 32 a 53 é constituída por peptídeos relacionados a bradicininas. A ausência desses peptídeos em secreções de anfíbios ainda em metamorfose já foi observada anteriormente em *Phyllomedusa distincta* (dados não publicados gerados por colaboradores da Universidade Católica de Brasília). Diante da suposta função de proteção contra a predação exercida por essa classe de moléculas em anfíbios de diferentes espécies, sua ausência em quantidades nas secreções de anfíbios que estão em metamorfose é imprevista.

É importante ressaltar que as diferenças observadas no conteúdo das glândulas granulares existentes entre os indivíduos jovens e adultos podem refletir experiências

ambientais distintas. Enquanto os indivíduos adultos capturados no campo entraram em contato com microrganismos presentes no seu habitat natural durante a vida, os anfíbios jovens experimentaram apenas os microrganismos que estavam presentes no ambiente artificial que lhes foi proporcionado em laboratório. A quantidade e a riqueza dos microrganismos presentes em ambos os ambientes são, muito provavelmente, distintos.

Foi observado um padrão heterogêneo de colocação de peptídeos presentes nas glândulas ativas dos animais adultos (Tabelas 15-19). Isto indica que glândulas distintas não contém o mesmo arsenal de moléculas, mas que cada glândula pode armazenar um perfil próprio de peptídeos, com exceção de algumas filoseptinas e da triptofilina FPPWL-NH₂, as quais estavam presentes em praticamente todas as glândulas granulares dorsais que estocavam peptídeos.

Apesar de existir uma aparente “individualidade” no que diz respeito à síntese, ao processamento e à estocagem de peptídeos entre glândulas granulares distintas, existe outra hipótese: os níveis de transcrição de todos os genes e da tradução nas glândulas individuais seriam idênticos entre as glândulas granulares (por exemplo, o gene A teria uma taxa de transcrição igual a X e o gene B igual a 50X em todas as glândulas), porém, o envio de peptídeos estocados para a superfície do tecido cutâneo seria realizado de maneira independente entre elas, o que resultaria na heterogeneidade observada. Experimentos serão realizados com objetivos de investigar as inferências.

Quanto aos níveis de colocação observado por cada par de peptídeos, apesar de a média ter sido extremamente baixa ($21,4 \pm 19,8$), os peptídeos relacionados a bradicininas e as filoseptinas apresentaram-se com os valores mais altos de colocação. Confirmando-se a hipótese número 1 (que prega a individualidade de transcrição entre as glândulas granulares), poderiam existir, então, glândulas mais especializadas na transcrição de bradicininas, já que

filoseptinas estão presentes em praticamente todas as glândulas analisadas. Se tratando da hipótese número dois, essas classes de moléculas teriam uma taxa de transcrição gênica maior do que as demais, porém, semelhante entre as diferentes glândulas. Neste caso, as filoseptinas estariam sendo mais expressas do que as bradicininas, o que não é corroborado pelos níveis de transcrição obtidos nas análises de genes que transcrevem tais peptídeos, como pode ser observado na Figura 7.

Observa-se ainda que peptídeos truncados pertencentes a uma mesma classe não estão bem colocalizados. Isto indica que: 1) a presença das enzimas responsáveis pelas clivagens é diferente entre glândulas distintas, ou 2) trata-se de um mecanismo controlado, ou 3) trata-se de um mecanismo acidental. Já foi demonstrado que peptídeos antimicrobianos truncados isolados da secreção cutânea de anfíbios perdem a sua atividade antimicrobiana (Magalhaes *et al.*, 2008). Não se sabe exatamente se tais peptídeos adquirem outra atividade biológica ou outra função.

7.5. EXPRESSÃO DIFERENCIAL NAS GLÂNDULAS GRANULARES DORSAIS E INGUINAIS DE *P. nattereri*

P. nattereri é um anfíbio que possui uma secreção cutânea rica em componentes moleculares que são sintetizados e armazenados em glândulas granulares dorsais e em glândulas inguinais peculiares associadas a um comportamento deimático característico. O grupo de pesquisa ao qual pertence o presente aluno caracterizou dois peptídeos com atividade antimicrobiana (nattererinas 1 e 2) e 11 peptídeos relacionados a bradicininas isolados a partir dessa secreção.

Dessa maneira, foram realizados experimentos de MALDI-*Imaging* com o objetivo de mapear a presença desses peptídeos antimicrobianos e dos relacionados a bradicininas no tecido cutâneo dorsal e nas glândulas inguinais de *P. nattereri*. Observa-se que as duas

classes de moléculas foram detectadas em ambos os tecidos analisados, nos quais houve uma notável superioridade no que diz respeito aos níveis de intensidade dos íons correlacionados aos peptídeos antimicrobianos (Figuras 23 e 24).

As análises dos espectros de massa globais obtidos a partir de ambos os tecidos submetidos aos experimentos sugerem que as bradicininas estão presentes em maior concentração nas glândulas inguinais, devido aos diferentes valores de intensidade apresentados por esses íons. No entanto, isto deve ser examinado com cautela, pois seja em placa ou diretamente no tecido, as nattererinas tendem a ionizar mais facilmente do que os peptídeos relacionados a bradicininas, suprimindo o sinal destes.

Dessa maneira, construiu-se duas bibliotecas de cDNAs originadas a partir do tecido cutâneo dorsal e das glândulas inguinais de *P. nattereri*, com o objetivo de caracterizar os precursores que codificam as nattererinas e os peptídeos relacionados a bradicininas nesse anfíbio. Não foi possível determinar a estrutura dos precursores que codificam as nattererinas, ou algum peptídeo similar. Isto sugere que tais precursores possuem em sua estrutura um peptídeo sinal diferente ou, mais provavelmente, tenham um peso molecular diferentes daquele empregado durante o isolamento dos produtos de RT-PCR para a clonagem (300-400 pb).

A estrutura de dois precursores que codificam peptídeos relacionados a bradicininas foi determinada. Ambos possuem as regiões que caracterizam os precursores que codificam os peptídeos presentes nas secreções de anfíbios anuros (Figuras 25 e 26). Nota-se que o precursor BBN1 codifica, além das bradicininas, um peptídeo com domínio opióide, cuja atividade está sendo analisada, juntamente com peptídeos inseridos cujas possíveis funções e atividades devem ser investigadas, também.

Dessa maneira, oligonucleotídeos específicos sintetizados com base na estrutura de ambos os precursores foram empregados em ensaios de PCR em tempo real para determinar

os níveis de transcrição das bradicininas no tecido cutâneo dorsal e nas glândulas inguinais (Figura 27). Os altos níveis de transcrição do gene BBN1 nas glândulas inguinais (30000 vezes maior do que no tecido cutâneo dorsal) ratificam os resultados obtidos no mapeamento de peptídeos realizado nos experimentos de MALDI-*Imaging*. Além disto, a predileção pela transcrição do precursor BBN1 ao BKL1 na própria glândula sugere a importância da presença do peptídeo opióide naquele órgão, já que a tradução do precursor BBN1 produz dois peptídeos relacionados a bradicininas a mais do que a do BKL1.

Sendo assim, embora não tenha sido possível analisar os níveis de transcrição dos precursores que codificam as nattererinas, os resultados de imagem por si só permitem inferir que elas estão presentes em grandes quantidades em toda a superfície de ambos os tecidos analisados. As nattererinas fazem parte do sistema imune inato de *P. nattereri* e, portanto, possuem uma importante função na proteção contra o crescimento indesejado de microrganismos presentes em todo o tecido cutâneo do anfíbio em questão. Dessa maneira, a presença dessa classe de moléculas é esperada tanto no tecido cutâneo dorsal, quanto nas glândulas inguinais.

Por outro lado, a presença, em grandes quantidades, das bradicininas e do peptídeo opióide codificados pelo precursor BBN1 nas glândulas inguinais pode ter uma correlação direta com o comportamento deimático apresentado por *P. nattereri* quando esse anfíbio se encontra em situação de risco. Sendo assim, isto descreveria uma incrível sintonia entre o sistema fisiológico e a ação comportamental desse anfíbio. Ou seja, mesmo quando a exposição visual das glândulas inguinais a um possível predador, dando a impressão de se tratar de uma face com dois grandes olhos negros, não é suficiente para afugentá-lo, este pode ser infligido por uma série de efeitos fisiológicos danosos, os quais têm como origem primária os altos níveis de transcrição do precursor BBN1 nas células que compõe as glândulas inguinais.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O pirosequenciamento do tipo 454 mostrou-se uma ferramenta altamente eficaz para a determinação de precursores que codificam peptídeos bioativos presentes nas secreções cutâneas de anfíbios anuros. No entanto, se faz necessária a montagem do genoma de um anfíbio pertencente ao grupo *Hypochondrialis* para que seja realizada uma montagem mais correta dos *contigs*. Provavelmente, essa será a próxima etapa das investigações.

O sequenciamento automático de peptídeos, da maneira como foi proposta aqui, apesar de não ter se mostrado eficiente, pode ser utilizado de maneira complementar às metodologias de sequenciamento de peptídeos mais convencionais. Novos experimentos serão discutidos com o objetivo de aumentar o número de peptídeos gerados pelo sequenciamento automático realizado a partir de secreções de anfíbios com a finalidade de facilitar a validação dos dados gerados pelo pirosequenciamento.

A depleção do conteúdo das glândulas granulares de *P. azurea* promove alterações nos níveis de transcrição dos precursores que codificam os peptídeos que compõe a secreção cutânea desse anfíbio, assim como, dos precursores que codificam peptídeos hormônio. Dentre estes, a calcitonina, a gastrina e a somatostatina possivelmente participam dos mecanismos iniciais de restauração do conteúdo glandular. Novas investigações serão realizadas com o objetivo de investigar a função que os hormônios caracterizados a partir do tecido cutâneo de *P. azurea* realiza no tecido cutâneo desse anfíbio.

A presença de microrganismos no tecido cutâneo de *P. azurea* é capaz de promover variações nos níveis de transcrição dos precursores analisados. A cepa de bactéria Gram-positiva utilizada induz a transcrição de maneira mais eficiente do que a de bactéria Gram-negativa. Os resultados sugerem evidências de que a expressão de peptídeos bioativos nas

glândulas granulares desse anfíbio é diretamente proporcional à concentração de bactérias presentes no tecido cutâneo. Experimentos serão realizados para testar essa hipótese.

As glândulas granulares individuais são capazes de armazenar um perfil próprio de peptídeos. Estes podem ser detectados em baixas concentrações na secreção cutânea de *P. azurea* a partir do estágio 41 da metamorfose. Quando o anfíbio emerge para o ambiente terrestre, observa-se um súbito aumento na concentração dessas moléculas nas secreções e no interior das glândulas granulares. Apesar disto, quando comparados aos animais adultos, anfíbios no estágio 46 da metamorfose ainda não apresentam as glândulas granulares totalmente maturadas quanto ao seu conteúdo. Isto pode ser fruto das experiências distintas, no que diz respeito ao contato com microrganismos, ou simplesmente, fazer parte de um processo natural de desenvolvimento.

Os peptídeos antimicrobianos, denominados nattererinas 1 e 2, estão presentes em grandes concentrações em todo o tecido cutâneo de *P. nattereri*, ao passo que aqueles relacionados a bradicininas são sintetizados em grandes quantidades nas glândulas inguinais. Isto sugere uma incrível sintonia entre o sistema fisiológico e a ação comportamental desse anfíbio.

Este é um trabalho investigativo e pioneiro de averiguações que têm como objetivo entender os mecanismos que governam os processos de síntese e estocagem de peptídeos bioativos nas glândulas granulares de anfíbios. Mais de cem peptídeos foram caracterizados nesse trabalho, entre os inéditos e os já descritos. O transcriptoma gerado possui uma relevância biológica importante, e poderá ser útil para ajudar a esclarecer, ainda, inúmeros questionamentos que envolvem a fisiologia do tecido cutâneo de *P. azurea*. O modelo experimental apresentado aqui pode ser empregado em investigações que abranjam outros

tipos de animais, assim como em experimentos que envolvam perguntas relacionadas a interação de peptídeos/proteínas em tecidos das mais diversas origens.

Por fim, os resultados apresentados aqui corroboram experimentos e observações de Erspamer *et al.* (1981), os quais indicam a existência de um eixo cérebro-intestino-pele em vertebrados referente à síntese e a secreção de peptídeos bioativos de semelhante natureza funcional. De fato, essa proposta surgiu justamente quando se demonstrou que as secreções cutâneas de anfíbios anuros possuem semelhantes estruturas de peptídeos rotineiramente encontradas no cérebro ou no intestino de vertebrados. O presente trabalho reforça os achados de Erspamer, contribuindo com a identificação de moléculas da secreção cutânea de *P. azurea*, as quais eram, até então, tidas como exclusivamente presentes no cérebro ou no intestino de vertebrados. A busca de evidências que comprovem a existência de tal eixo, bem como a compreensão dos mecanismos que o governam é de fundamental importância para um conhecimento mais acurado dos processos e eventos metabólicos que conduzem à expressão gênica diferenciada dessas moléculas nesses tecidos de mesma origem embriológica, mas anatomicamente tão distintos no organismo adulto.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, M. F. et al. Antimicrobial peptides and protease inhibitors in the skin secretions of the crawfish frog, *Rana areolata*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1601, n. 1, p. 55-63, Nov 19 2002. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429503> >.

ALLEN, B. M. The results of thyroid removal in the larvae of *Rana pipiens*. **J. Exptl. Zool.**, v. 24, p. 499-519, 1925.

ALTIG, R.; MCDIARMID, R. W. Morphological diversity and evolution of egg and clutch structure in amphibians. **Herpetological Monographs**, n. 21, p. 1-32, 2007. ISSN 0733-1347. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000252341700001 >.

ANASTASI, A.; ERSPAMER, V.; BERTACCINI, G. Occurrence of Bradykinin in the Skin of *Rana Temporaria*. **Comp Biochem Physiol**, v. 14, p. 43-52, Jan 1965. ISSN 0010-406X (Print)

0010-406X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14288205> >.

ANDERSON, K. V. Toll signaling pathways in the innate immune response. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 1, p. 13-19, Feb 2000. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000085306900002 >.

ANGEL, R.; DELFINO, G.; PARRA, G. J. Ultrastructural patterns of secretory activity in poison cutaneous glands of larval and juvenile *Dendrobates auratus* (Amphibia, Anura). **Toxicon**, v. 41, n. 1, p. 29-39, Jan 2003. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12467659> >.

ARCK, P. et al. Is there a 'gut-brain-skin axis'? **Exp Dermatol**, v. 19, n. 5, p. 401-5, May 2010. ISSN 1600-0625 (Electronic)

0906-6705 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20113345> >.

BRAND, G. D. et al. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2137-46, Sep 2006. ISSN 0196-9781 (Print)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16797783> >.

BRAND, G. D. et al. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 347, n. 3, p. 739-46, Sep 1 2006. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16844081> >.

BRAND, G. D. et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta* - Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49332-49340, Dec 20 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180028900030 > .

BROWN, D. D.; CAI, L. Amphibian metamorphosis. **Dev Biol**, v. 306, n. 1, p. 20-33, Jun 1 2007. ISSN 0012-1606 (Print)

0012-1606 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449026> > .

BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Curr Opin Immunol**, v. 18, n. 1, p. 24-30, Feb 2006. ISSN 0952-7915 (Print)

0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16337365> > .

BRUSCHI, D. P. et al. Evaluation of the taxonomic status of populations assigned to *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae) based on molecular, chromosomal, and morphological approach. **BMC Genet**, v. 14, p. 70, 2013. ISSN 1471-2156 (Electronic)

1471-2156 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23937545> > .

BRUSQUETTI, F.; LAVILLA, E. O. Lista comentada de los anfibios de Paraguay. **Cuadernos de Herpetologia.**, v. 20, n. 3-79, 2006.

BURLEIGH, D. E.; BANKS, M. R. Stimulation of intestinal secretion by vasoactive intestinal peptide and cholera toxin. **Auton Neurosci**, v. 133, n. 1, p. 64-75, Apr 30 2007. ISSN 1566-0702 (Print)

1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17023221> > .

CHEN, T. et al. *Pachymedusa dacinicolor* tryptophyllin-1: structural characterization, pharmacological activity and cloning of precursor cDNA. **Regul Pept**, v. 117, n. 1, p. 25-32, Jan 15 2004. ISSN 0167-0115 (Print)

0167-0115 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14687697> > .

CHEN, T.; SHAW, C. Identification and molecular cloning of novel trypsin inhibitor analogs from the dermal venom of the Oriental fire-bellied toad (*Bombina orientalis*) and the European yellow-bellied toad (*Bombina variegata*). **Peptides**, v. 24, n. 6, p. 873-80, Jun 2003. ISSN 0196-9781 (Print)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948839> > .

CHEN, T. et al. Elements of the granular gland peptidome and transcriptome persist in air-dried skin of the South American orange-legged leaf frog, *Phyllomedusa hypocondrialis*. **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2129-36, Sep 2006. ISSN 0196-9781 (Print)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713656> >.

CHEN, T. B. et al. Partial structure of the phylloxin gene from the giant monkey frog, *Phyllomedusa bicolor*: Parallel cloning of precursor cDNA and genomic DNA from lyophilized skin secretion. **Peptides**, v. 26, n. 12, p. 2624-2628, Dec 2005. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000233976400038 >.

CHEN, X. et al. A fish bradykinin (Arg⁰, Trp⁵, Leu⁸-bradykinin) from the defensive skin secretion of the European edible frog, *Pelophylax kl. esculentus*: structural characterization; molecular cloning of skin kininogen cDNA and pharmacological effects on mammalian smooth muscle. **Peptides**, v. 32, n. 1, p. 26-30, Jan 2011. ISSN 1873-5169 (Electronic)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20923691> >.

CONCEICAO, K. et al. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, v. 28, n. 3, p. 515-523, Mar 2007. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244611700004 >.

CONLON, J. M. Bradykinin and its receptors in non-mammalian vertebrates. **Regul Pept**, v. 79, n. 2-3, p. 71-81, Feb 5 1999. ISSN 0167-0115 (Print)

0167-0115 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10100919> >.

CONLON, J. M. et al. Bradykinin-related peptides and tryptophyllins in the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. **Gen Comp Endocrinol**, v. 143, n. 2, p. 193-9, Sep 1 2005. ISSN 0016-6480 (Print)

0016-6480 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15922344> >.

CONLON, J. M.; KIM, J. B. A protease inhibitor of the Kunitz family from skin secretions of the tomato frog, *Dyscophus guineti* (Microhylidae). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 279, n. 3, p. 961-4, Dec 29 2000. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11162457> >.

COPE, E. D. Catalogues of the reptiles obtained during the explorations of the Parana, Paraguay, Vermejo and Uruguay Rivers, by Capt. Thos. J. Page, U.S.N.; and of those procured by Lieut. N. Michler, U.S. Top. Eng., Commander of the expedition conducting the survey of the Atrato River. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 14, p. 346-359, 1862.

CSORDAS, A.; MICHL, H. Primary structure of two oligopeptides of the toxin of *Bombina variegata* L. **Toxicon**, v. 7, n. 2, p. 103-8, Sep 1969. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5823347> >.

DANKS, J. A. et al. Parathyroid hormone-related protein in tissues of the emerging frog (*Rana temporaria*): immunohistochemistry and in situ hybridisation. **J Anat**, v. 190 (Pt 2), p. 229-38, Feb 1997. ISSN 0021-8782 (Print)

0021-8782 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9061446> >.

DELFINO, G. et al. Serous cutaneous glands in *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae): secretory patterns during ontogenesis. **Tissue Cell**, v. 30, n. 1, p. 30-40, Feb 1998. ISSN 0040-8166 (Print)

0040-8166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9569677> >.

DELFINO, G. et al. Serous cutaneous glands in new world hylid frogs: an ultrastructural study on skin poisons confirms phylogenetic relationships between *Osteopilus septentrionalis* and *Phrynohyas venulosa*. **J Morphol**, v. 253, n. 2, p. 176-86, Aug 2002. ISSN 0362-2525 (Print)

0022-2887 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12112131> >.

DELFINO, G. et al. Serous cutaneous glands of the Pacific tree-frog *Hyla regilla* (Anura, Hylidae): patterns of secretory release induced by nor-epinephrine. **Tissue Cell**, v. 38, n. 1, p. 65-77, Feb 2006. ISSN 0040-8166 (Print)

0040-8166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423375> >.

DOCKRAY, G. J.; HOPKINS, C. R. Caerulein Secretion by Dermal Glands in *Xenopus-Laevis*. **Journal of Cell Biology**, v. 64, n. 3, p. 724-733, 1975a. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1975V734400019 >.

0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1150750> >.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1994. xxi, 670 p. ISBN 080184780X.

ERDOGAN, M. F.; GURSOY, A.; KULAKSIZOGLU, M. Long-term effects of elevated gastrin levels on calcitonin secretion. **J Endocrinol Invest**, v. 29, n. 9, p. 771-5, Oct 2006. ISSN 1720-8386 (Electronic)

0391-4097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114906> >.

ERSPAMER, V. et al. The brain-gut-skin triangle: new peptides. **Peptides**, v. 2 Suppl 2, p. 7-16, 1981. ISSN 0196-9781 (Print)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6178095> >.

EVANGELISTA, S. Role of calcitonin gene-related Peptide in gastric mucosal defence and healing. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 30, p. 3571-6, 2009. ISSN 1873-4286 (Electronic)

1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19860701> >.

FAIVOVICH, J. et al. The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs, Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). **Cladistics**, v. 26, p. 227-261, 2010.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. **American Museum of Natural History, New York, USA.**, v. Version 5.6 (9 January 2013), 2013. Disponível em: < <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> >.

GEBHARD, L. G. et al. A Kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of Phyllomedusa sauvagii. **Eur J Biochem**, v. 271, n. 11, p. 2117-26, Jun 2004. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15153102> >.

GHOSH, D. et al. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. **Nat Immunol**, v. 3, n. 6, p. 583-90, Jun 2002. ISSN 1529-2908 (Print)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021776> >.

GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. **Eur J Biochem**, v. 268, n. 21, p. 5589-600, Nov 2001. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11683882> >.

GIARETTA, A. A., FACURE, K.G. Terrestrial and communal nesting in Eupemphix nattereri (Anura, Leiuperidae): interactions with predators and pond structure. **J Nat History**, v. 400, p. 2577-2587, 2004.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, p. 183-190, 1960.

HAMANAKA, Y. et al. Expression of human beta-defensin 2 (hBD-2) in Helicobacter pylori induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against Helicobacter pylori. **Gut**, v. 49, n. 4, p. 481-7, Oct 2001. ISSN 0017-5749 (Print)

0017-5749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11559643> >.

HARRIS, R. N. et al. Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. **ISME J**, v. 3, n. 7, p. 818-24, Jul 2009. ISSN 1751-7370 (Electronic)

1751-7362 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19322245> >.

HOFFMANN, J. A. et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1313-8, May 21 1999. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334979> >.

HOLZER, P. et al. Release of calcitonin gene-related peptide induced by capsaicin in the vascularly perfused rat stomach. **Neurosci Lett**, v. 108, n. 1-2, p. 195-200, Jan 1 1990. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2304629> >.

IEMBO, T. Estudo da secreção da pele do anfíbio *Physalaemus nattereri*: identificação de caracterização estrutural de peptídeos relacionados à bradicinina. **Tese de doutorado em biologia molecular - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília**, p. 93, 2005.

INUI, T. et al. Linkage between capsaicin-stimulated calcitonin gene-related peptide and somatostatin release in rat stomach. **Am J Physiol**, v. 261, n. 5 Pt 1, p. G770-4, Nov 1991. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1683166> >.

ISHIZUYA-OKA, A.; SHI, Y. B. Molecular mechanisms for thyroid hormone-induced remodeling in the amphibian digestive tract: a model for studying organ regeneration. **Dev Growth Differ**, v. 47, n. 9, p. 601-7, Dec 2005. ISSN 0012-1592 (Print)

0012-1592 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16316405> >.

JANEWAY, C. A., JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 197-216, 2002. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861602> >.

JIANG, H.; KANOST, M. R. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 30, n. 2, p. 95-105, Feb 2000. ISSN 0965-1748 (Print)

0965-1748 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10696585> >.

LAI, R. et al. Identification and cloning of a trypsin inhibitor from skin secretions of Chinese red-belly toad *Bombina maxima*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 131, n. 1, p. 47-53, Jan 2002. ISSN 1096-4959 (Print)

1096-4959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742757> >.

LAVILLA; O., E.; CEI., J. M. Amphibians of Argentina. A Second Update, 1987–2000. **Museo Regionale di Scienze Naturali. Torino**, v. 28, p. 1-177, 2001.

LEITE, J. R. et al. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides**, v. 26, n. 4, p. 565-73, Apr 2005. ISSN 0196-9781 (Print)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15752569> >.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 697-743, 2007. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201680> >.

LEMAITRE, B. et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 973-83, Sep 20 1996. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8808632> >.

LENZI-MATTOS et al. The inguinal macroglands of the frog *Physalaemus nattereri* *Leptodactylidae*: structure, toxic secretion and relationship with deimatic behaviour. **Journal of Zoology (London)** v. 266, p. 385-394, 2005.

LI, J. X. et al. Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides. **Faseb Journal**, v. 21, n. 10, p. 2466-2473, Aug 2007. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248454400021 >.

LI, L. et al. Bradykinins and their cDNA from piebald odorous frog, *Odorrana schmackeri*, skin. **Peptides**, v. 24, n. 6, p. 863-872, Jun 2003. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000185266800009 >.

LINZMEIER, R. et al. A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. **Gene**, v. 233, n. 1-2, p. 205-11, Jun 11 1999. ISSN 0378-1119 (Print)

0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10375637> >.

LOW, M. J. Clinical endocrinology and metabolism. The somatostatin neuroendocrine system: physiology and clinical relevance in gastrointestinal and pancreatic disorders. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 18, n. 4, p. 607-22, Dec 2004. ISSN 1521-690X (Print)

1521-690X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15533778> >.

LU, X. et al. Two serine protease inhibitors from the skin secretions of the toad, *Bombina microdeladigitora*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 149, n. 4, p. 608-12, Apr 2008. ISSN 1096-4959 (Print)

1096-4959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18221904> >.

MAAKE, C.; HANKE, W.; REINECKE, M. An immunohistochemical and morphometric analysis of insulin, insulin-like growth factor I, glucagon, somatostatin, and PP in the development of the gastro-entero-pancreatic system of *Xenopus laevis*. **Gen Comp Endocrinol**, v. 110, n. 2, p. 182-95, May 1998. ISSN 0016-6480 (Print)

0016-6480 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570939> >.

MAGALHAES, B. S. et al. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 377, n. 4, p. 1057-61, Dec 26 2008. ISSN 1090-2104 (Electronic)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18976634> >.

MAGALHAES, M. T. et al. Conformational and functional effects induced by D- and L-amino acid epimerization on a single gene encoded peptide from the skin secretion of *Hypsiboas punctatus*. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e59255, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23565145> >.

MARTINS, G. R. P. Peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea de *Physalaemus nattereri* (Anuro). **Dissertação de mestrado em ciências da saúde - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília**, p. 43, 2005.

MATTOS, R. L. et al. Structure of venom glands in the frog *Physalaemus nattereri* (Anura, Leptodactylidae). **Acta Microsc**, v. 12B, n. 563-564, 2003.

MECKE, A. et al. Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: An atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers. **Biophysical Journal**, v. 89, n. 6, p. 4043-4050, Dec 2005. ISSN 0006-3495. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000233590800041 >.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A., JR. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 298-300, Apr 12 2002. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11951031> >.

MEINCKEN, M.; HOLROYD, D. L.; RAUTENBACH, M. Atomic force microscopy study of the effect of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 10, p. 4085-92, Oct 2005. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16189084> >.

MELO-E-SILVA, D. D. et al. Morphometric and genetic differentiation among populations of *Eupemphix nattereri* (Amphibia, Anura, Leiuperidae) from central Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 98, p. 493-500, 2008.

MIELE, R. et al. Molecular cloning of a bombinin gene from *Bombina orientalis*: detection of NF-kappaB and NF-IL6 binding sites in its promoter. **FEBS Lett**, v. 431, n. 1, p. 23-8, Jul 10 1998. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9684858> >.

MIGNOGNA, G. et al. BSTI, a trypsin inhibitor from skin secretions of *Bombina bombina* related to protease inhibitors of nematodes. **Protein Sci**, v. 5, n. 2, p. 357-62, Feb 1996. ISSN 0961-8368 (Print)

0961-8368 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8745414> >.

MONTECUCCHI, P. C. Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins. **Peptides**, v. 6 Suppl 3, p. 187-95, 1985. ISSN 0196-9781 (Print)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3831963> >.

MURPHY, J. B.; KIES, M. W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **Biochim Biophys Acta**, v. 45, p. 382-384, 1960.

NEIVA, M. et al. Gene expression analysis by ESTs sequencing of the Brazilian frog *Phyllomedusa nordestina* skin glands. **Toxicon**, v. 61, p. 139-150, Jan 2013. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314146400017 >.

NICOLAS, P.; VANHOYE, D.; AMICHE, M. Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1669-80, Nov 2003. ISSN 0196-9781 (Print)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019198> >.

NISHIKAWA, A.; HAYASHI, H. T3-hydrocortisone synergism on adult-type erythroblast proliferation and T3-mediated apoptosis of larval-type erythroblasts during erythropoietic conversion in *Xenopus laevis*. **Histochem Cell Biol**, v. 111, n. 4, p. 325-34, Apr 1999. ISSN 0948-6143 (Print)

0948-6143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10219633> >.

OUELLETTE, A. J. Paneth cells and innate immunity in the crypt microenvironment. **Gastroenterology**, v. 113, n. 5, p. 1779-84, Nov 1997. ISSN 0016-5085 (Print)

0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9352884> >.

OUELLETTE, A. J. et al. Localization of the cryptdin locus on mouse chromosome 8. **Genomics**, v. 5, n. 2, p. 233-9, Aug 1989. ISSN 0888-7543 (Print)

0888-7543 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2571573> >.

PINTO, A. et al. Effects of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide on airway and pulmonary vascular smooth muscle in guinea-pigs. **Br J Pharmacol**, v. 119, n. 7, p. 1477-83, Dec 1996. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8968558> >.

PUKALA, T. L. et al. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. **Nat Prod Rep**, v. 23, n. 3, p. 368-93, Jun 2006. ISSN 0265-0568 (Print)

0265-0568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16741585> >.

RIVA, D. L. et al. Ten years of research on Bolivian amphibians: updated checklist, distribution, taxonomic problems, literature and iconography. **Revista Española de Herpetología**, v. 14, p. 19-164, 2000.

SAHL, H. G. et al. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 4, p. 466-75, Apr 2005. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15582982> >.

SALTHE, S. N. The Egg Capsules in the Amphibia. **J Morphol**, v. 113, p. 161-71, Sep 1963. ISSN 0362-2525 (Print)

0022-2887 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14065317> >.

SALZMAN, N. H. et al. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. **Nature**, v. 422, n. 6931, p. 522-6, Apr 3 2003. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660734> >.

SAMGINA, T. Y. et al. Novel natural peptides from *Hyla arborea schelkownikowi* skin secretion. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 24, n. 12, p. 1749-54, Jun 30 2010. ISSN 1097-0231 (Electronic)

0951-4198 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20499319> >.

SAMGINA, T. Y. et al. Mass spectrometric study of bradykinin-related peptides (BRPs) from the skin secretion of Russian ranid frogs. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 25, n. 7, p. 933-40, Apr 15 2011. ISSN 1097-0231 (Electronic)

0951-4198 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21416530> >.

SAP, J. et al. The C-Erb-a Protein Is a High-Affinity Receptor for Thyroid-Hormone. **Nature**, v. 324, n. 6098, p. 635-640, Dec 18 1986. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986F300800045 >.

SCHEINMAN, R. I. et al. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. **Science**, v. 270, n. 5234, p. 283-6, Oct 13 1995. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7569975> >.

SCHREIBER, A. M.; BROWN, D. D. Tadpole skin dies autonomously in response to thyroid hormone at metamorphosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 1769-74, Feb 18 2003. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560472> >.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 23, n. 6, p. 595-601, Nov 2007. ISSN 0267-1379 (Print)

0267-1379 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17906434> >.

SEBBEN, A. Microdissecação fisiológica a fresco: uma nova visão sobre a anatomia de anfíbios e répteis. **Herpetologia no Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia.**, v. II, p. 311-325, 2007.

SEBBEN, A.; SCHWARTZ, C. A.; CRUZ, J. S. A Defesa Química dos Anfíbios. . **Ciência Hoje**, v. 15, p. 25-33, 1993.

SEVERI, C. et al. Different receptors mediate the action of bombesin-related peptides on gastric smooth muscle cells. **Am J Physiol**, v. 260, n. 5 Pt 1, p. G683-90, May 1991. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1852115> >.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochim Biophys Acta**, v. 1462, n. 1-2, p. 55-70, Dec 15 1999. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10590302> >.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 66, n. 4, p. 236-48, 2002. ISSN 0006-3525 (Print)

0006-3525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12491537> >.

SIMMACO, M. et al. Effect of glucocorticoids on the synthesis of antimicrobial peptides in amphibian skin. **FEBS Lett**, v. 416, n. 3, p. 273-5, Oct 27 1997. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9373168> >.

SIMMACO, M. et al. Experimental infections of *Rana esculenta* with *Aeromonas hydrophila*: a molecular mechanism for the control of the normal flora. **Scand J Immunol**, v. 48, n. 4, p. 357-63, Oct 1998. ISSN 0300-9475 (Print)

0300-9475 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9790305> >.

STEINBORNER, S. T. et al. The Structures of Four Tryptophyllin and Three Rubellidin Peptides from the Australian Red Tree Frog *Litoria rubella*. **Aust. J. Chem**, v. 47, p. 2099-2108, 1994.

STEINDACHNER, F. Über einige neue Batrachier aus den Sammlungen des Wiener Museums. . **Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften, Mathematisch-Naturwissenschaftliche** v. 48, p. 186–192., 1863.

TAKAHASHI, A. et al. Production of beta-defensin-2 by human colonic epithelial cells induced by *Salmonella enteritidis* flagella filament structural protein. **FEBS Lett**, v. 508, n. 3, p. 484-8, Nov 23 2001. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728477> >.

TERRENI, A. et al. Development of serous cutaneous glands in *Scinax nasica* (Anura, Hylidae): patterns of poison biosynthesis and maturation in comparison with larval glands in specimens of other families. **Tissue Cell**, v. 35, n. 4, p. 274-87, Aug 2003. ISSN 0040-8166 (Print)

0040-8166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12921710> >.

TERRY, A. S. et al. The Cdna Sequence Coding for Prepro-Pgs (Prepro-Magainins) and Aspects of the Processing of This Prepro-Polypeptide. **Journal of Biological Chemistry**, v.

263, n. 12, p. 5745-5751, Apr 25 1988. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988N089800040 >.

THOMPSON, A. H. 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*: discovery of a novel peptide family, the hyposins. **J Proteome Res**, v. 6, n. 9, p. 3604-13, Sep 2007. ISSN 1535-3893 (Print) 1535-3893 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17696382> >.

THOMPSON, A. H. et al. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*: mass spectrometric structural characterisation and cloning of precursor cDNAs. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 24, p. 3780-3788, 2006. ISSN 0951-4198. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242936400022 >.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous Granular Glands and Amphibian Venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology**, v. 111, n. 1, p. 1-29, May 1995. ISSN 0300-9629. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995QW03500001 >.

VANHOYE, D. et al. Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 9, p. 2068-2081, May 2003. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182449700021 >.

VOUILLE, V.; AMICHE, M.; NICOLAS, P. Structure of genes for dermaseptins B, antimicrobial peptides from frog skin - Exon 1-encoded prepropeptide is conserved in genes for peptides of highly different structures and activities. **Febs Letters**, v. 414, n. 1, p. 27-32, Sep 1 1997. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XV23500006 >.

WANG, H. et al. Functional peptidomics of amphibian skin secretion: A novel Kunitz-type chymotrypsin inhibitor from the African hyperoliid frog, *Kassina senegalensis*. **Biochimie**, v. 94, n. 3, p. 891-9, Mar 2012. ISSN 1638-6183 (Electronic) 0300-9084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22197669> >.

WANG, L. et al. PdT-2: a novel myotropic type-2 tryptophyllin from the skin secretion of the Mexican giant leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. **Peptides**, v. 30, n. 8, p. 1557-61, Aug 2009. ISSN 1873-5169 (Electronic) 0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19427344> >.

WANG, L. et al. Sauvamide--a novel amidated myotropic decapeptide from the skin secretion of the waxy monkey frog, *Phyllomedusa sauvagei*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 383, n. 2, p. 240-4, May 29 2009. ISSN 1090-2104 (Electronic)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19358833> >.

WANG, Z.; WANG, G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. Database issue, p. D590-2, Jan 1 2004. ISSN 1362-4962 (Electronic)

0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681488> >.

WEINBERGER, C. et al. The C-Erb-a Gene Encodes a Thyroid-Hormone Receptor. **Nature**, v. 324, n. 6098, p. 641-646, Dec 18 1986. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986F300800046 >.

WHITE, S. H.; WIMLEY, W. C.; SELSTED, M. E. Structure, function, and membrane integration of defensins. **Curr Opin Struct Biol**, v. 5, n. 4, p. 521-7, Aug 1995. ISSN 0959-440X (Print)

0959-440X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8528769> >.

WIEPRECHT, T. et al. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. **Febs Letters**, v. 417, n. 1, p. 135-140, Nov 3 1997. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997YF21400029 >.

WU, J. et al. Proteomic analysis of skin defensive factors of tree frog *Hyla simplex*. **J Proteome Res**, v. 10, n. 9, p. 4230-40, Sep 2 2011. ISSN 1535-3907 (Electronic)

1535-3893 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21740067> >.

YAN, X. W. et al. Bi-functional peptides with both trypsin-inhibitory and antimicrobial activities are frequent defensive molecules in Ranidae amphibian skins. **Amino Acids**, v. 43, n. 1, p. 309-316, Jul 2012. ISSN 0939-4451. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000305210800031 >.

YOSHIZATO, K. Biochemistry and Cell Biology of Amphibian Metamorphosis with a Special Emphasis on the Mechanism of Removal of Larval Organs. **International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology**, v. 119, p. 97-149, 1989. ISSN 0074-7696. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1989DE12600003 >.

YOU, D. et al. The first gene-encoded amphibian neurotoxin. **J Biol Chem**, v. 284, n. 33, p. 22079-86, Aug 14 2009. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19535333> >.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 15, p. 5449-53, Aug 1987. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3299384> >.

ZHAO, Y. et al. Isolation and preliminary characterization of a 22-kDa protein with trypsin inhibitory activity from toad *Bufo andrewsi* skin. **Toxicon**, v. 46, n. 3, p. 277-81, Sep 1 2005. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15970299> >.

Anexo I – Oligonucleotídeos utilizados em ensaio de PCR em tempo real.

Name*	5' - 3'	Alvos
Actin_Pazu1_F	CACACTGTGCCCATCTACGAA	Actina (<i>P. azurea</i>)
Actin_Pazu1_R	CAGCCAAGTCCAGACGCA	Actina (<i>P. azurea</i>)
Calc1_Phyl_F	ATGGTTGTGCTGAAGGTGTCC	Calcitonina
Calc1_Phyl_R	TGGGAGCCGTACATCTGTCC	Calcitonina
Gast1_Phyl_F	TGGCCACAGCCGTCTCT	Gastrina
Gast2_Phyl_R	CAGCAGGTCCCCTCTTGCT	Gastrina
VIP1_Phyl_F	CGCTGGAGAAAGGCCACA	Peptídeo intestinal vasoativo
VIP1_Phyl_R	AAGACCCCGAACAAATCCCT	Peptídeo intestinal vasoativo
Ins1_Phyl_F	TGAGCAGCCATCAGTAAACGG	Insulina
Ins1_Phyl_R	TCCTGGGACTGAATCTGCATC	Insulina
Rest1_Phyl_F	CAAATTGAATTGCGTAGATGTAACG	Resistina
Rest1_Phyl_R	AGAGACGGCGGTGTATCCAG	Resistina
Smt1_Phyl_F	TTGACCCTGGAAATGATCAGAA	Somatostatina
Smt1_Phyl_R	GGTTGCCTGATTCCAAGACC	Somatostatina
BKL1_Phyl_F	TGAAGAAATCTCTTTTCTTGACTTTTCT	Bradicinina 1
BKL1_Phyl_R	TCCTCTATTTTCATCTTCATTCTCTTCC	Bradicinina 2
BKL_All_Phyl_F	GTCTGTTCCTTGGATTAGTTTCC	Bradicinina (todas)
BKL_All_Phyl_R	CATCGTCATCCTGTCTTTTCTCTTC	Bradicinina (todas)
Dsp5_Phyl_F	GGAATGGTCTCTCTTTCTATCTGTGA	Dermaseptina 5
Dsp5_Phyl_R	TGTACTCCACAGCCCTCTCTTCA	Dermaseptina 6
Dsp_All_F	TGAAGAAGAGAAGAGAGAAAATGAAGATG	Dermaseptina (todas)
Dsp_All_R	AGAGCTCTCTTCATTTTCGCTTTG	Dermaseptina (todas)
INB1_Phyl_F	GTCTGGCAGCAGCATTTGT	Inibidor enzimático 1
INB1_Phyl_R	TTGTGCGCACTTTGGCTCAGT	Inibidor enzimático 2
Pst_All_F	GTATTATTTCTTGGACTGGTTTCCCT	Filoseptinas (Todas)
Pst_All_R	TTGGAAGCAAGCTTAAGAATCTCTT	Filoseptinas (Todas)
Tryp1_Phyl_F	AAATCTCTTTTCTTGTCTGTTC	Triptofilina 1
Tryp1_Phyl_R	TCTCCTCGTCATCTTCTGTTTT	Triptofilina 2
BBN1_F	CCGTTCTCTGCGAGAAGAA	Gene BBN1
BBN1_R	AAGGAGAGAATCCTGGAGGACG	Gene BBN1
BKL2_F	ACCTGATAAGCAAGAGGGTTCTCT	Gene BKL1
BKL2_R	GACACATGGCGTCAGAATCAA	Gene BKL1
ACTIN_PUN3_F	CCCTGTATGCCTCTGGTCGTA	Actina (<i>P. nattereri</i>)
ACTIN_PUN3_R	GCGTGAGGCAGGGCATAG	Actina (<i>P. nattereri</i>)
qPPS_F	GAAGAAATCTCTTTTCTTGACTATTCTCT	Peptídeo sinal de precursores que codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios
qPPS_R	TTTCTTCTCTCTGTCTCTTCTTCTCAC	Peptídeo sinal de precursores que codificam peptídeos antimicrobianos em anfíbios

*F = Forward - R = Reverse