



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

FLAVIA GEORDANA DAMASCENO ARAÚJO

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DA PELE DE PITHECOPUS SPP. (ANURA) E CARACTERIZAÇÃO
FUNCIONAL DA TRIPTOFILINA PAT-2 COMO PEPTÍDEO ANTIOXIDANTE.**

Brasília
01/09/2025

FLAVIA GEORDANA DAMASCENO ARAUJO

ANÁLISE HISTOLÓGICA DA PELE DE PITHECOPUS SPP. (ANURA) E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA TRIPTOFILINA PAT -2 COMO PEPTÍDEO ANTIOXIDANTE.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção de Título de Mestre.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Carneiro Moreira

Brasília

01/09/2025

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE MEDICINA – FM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DA PELE DE PITHECOPUS SPP. (ANURA) E CARACTERIZAÇÃO
FUNCIONAL DA TRIPTOFILINA PAT-2 COMO PEPTÍDEO ANTIOXIDANTE.**

FLÁVIA GEORDANA DAMASCENO ARAÚJO

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

BANCA EXAMINADORA

DR. JOSÉ ROBERTO DE SOUZA DE ALMEIDA LEITE
Faculdade de Medicina/FM/Universidade de Brasília - UnB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas FM-UnB
(Membro interno e Presidente)

Dr. OSMINDO RODRIGUES PIRES JÚNIOR
Instituto de Biologia IB/Universidade de Brasília
(Membro externo)

Dr. CLASSIUS DE OLIVEIRA
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, *Campus* de São José do Rio Preto,
UNESP/SP
(Membro externo)

Dr. JHONES DO NASCIMENTO DIAS
Centro Universitário IESB – Instituto de Educação Superior de Brasília
(Membro externo Suplente)

AGRADECIMENTOS

Dedico esse trabalho à minha filha Alice Araújo de Oliveira.

Agradeço aos amigos que me deram força e apoio nos meus momentos de frustrações. Em especial Mylena Regis, Arthur Loback, Marianna de Souza, Wanessa Félix, Jéssica Luana, Ariane Nogueira e Raíssa Rachel, que se dispuseram em ajudar no que fosse preciso para a consolidação desse projeto. Eles foram minha rede de apoio durante essa jornada, e acredito que todo mestrando deve contar com essa base, pois, sem isso, a trajetória pode se tornar muito solitária.

Agradeço ao meu parceiro de vida, Henrique Loback por todo suporte dado durante os experimentos e durante as atividades de campo, sem você teria sido tudo mais difícil. Obrigada por sempre acreditar em mim.

Agradeço às minhas amigas de trabalho, Marianna de Souza Soares e Wanessa Félix, que estiveram ao meu lado não apenas durante o mestrado, mas ao longo de toda a minha trajetória na Universidade de Brasília.

Sou grata aos colaboradores do Laboratório NuPMIA, ao Laboratório de Síntese e Análises de Biomoléculas – LSAB do Instituto de Química e ao LAFUC – Laboratório de Fauna e Unidades de Conservação do Departamento de Engenharia Florestal, por todo o suporte e orientações que recebi durante esses anos, em especial Maria da Glória, Jéssica, José Carlos, Wanessa Félix, Andreanne, Bruno de Sá, Amilcar Sabino Damazo, Daniel Carneiro Moreira, Miguel.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Daniel Carneiro Moreira, pela confiança e pela paciência em me treinar e orientar. Sua generosidade em compartilhar conhecimentos e sua disponibilidade nas horas de necessidade foram fundamentais para o meu aprendizado. Sou uma grande admiradora tanto da sua pessoa quanto da sua atuação profissional.

Agradeço ao meu orientador, Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite, por acreditar na consolidação deste projeto. Sou grata por todo o apoio recebido e por sua ajuda na resolução dos imprevistos que surgiram ao longo do caminho.

Por fim, agradeço à Universidade de Brasília – UnB, ao seu corpo docente e ao ensino de qualidade que me foi proporcionado, assim como ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, que me ofereceu a oportunidade de executar este projeto.

EPÍGRAFE

*“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando
para ser descoberta”*

Carl Sagan (1934 – 1996)



RESUMO

A família Phyllomedusidae tem despertado crescente interesse científico devido à notável diversidade molecular revelada nas análises de peptídeos presentes em suas secreções cutâneas. Neste estudo, foram investigadas duas espécies, *Pithecopus oreades* e *P. azureus*, com o objetivo de realizar análises histológicas da pele e avaliar a atividade biológica do peptídeo PaT-2, pertencente à classe das triptofilinas. As análises histológicas evidenciaram a presença abundante de glândulas mucosas e serosas, com estas últimas apresentando maior tamanho na região dorsal, o que se relaciona à maior espessura dérmica e à necessidade de proteção em áreas mais expostas, como dorso e cabeça. Observações comportamentais descritas na literatura, como o ato de esfregar o corpo com os membros, sugerem ainda a redistribuição funcional dessas secreções. Ensaio histoquímico confirmaram a presença de polissacarídeos e lipídios, reforçando o papel multifuncional das secreções cutâneas. Em paralelo, o peptídeo sintético PaT-2 foi avaliado em ensaios celulares com menadiona como indutor de estresse oxidativo. Os resultados demonstraram que PaT-2 não apresentou citotoxicidade e atuou como modulador redox, inibindo a formação de glutatona oxidada (GSSG) e evidenciando atividade antioxidante. Este é o primeiro estudo a fornecer uma descrição histológica da pele de *P. oreades* e a caracterizar a atividade antioxidante de PaT-2, trazendo contribuições inéditas tanto para a compreensão da morfologia e fisiologia de anfíbios quanto para o desenvolvimento de biomoléculas com potencial terapêutico.

Palavras-chave: triptofilinas; peptídeos bioativos; estresse oxidativo; *Pithecopus*; antioxidante.

ABSTRACT

The Phyllomedusidae family has attracted increasing scientific interest due to the remarkable molecular diversity found in peptides secreted from their skin. In this study, two species, *Pithecopus oreades* and *P. azureus*, were investigated with the aim of performing histological analyses of the skin and evaluating the biological activity of the tryptophyllin-class peptide PaT-2. Histological examinations revealed an abundance of mucous and serous glands, with the latter significantly larger in the dorsal region, a feature associated with greater dermal thickness and the need for enhanced protection in more exposed areas such as the dorsum and head. Behavioural reports in the literature, such as self-rubbing with the limbs, further suggest that these secretions are redistributed across the body to maximise protective efficiency. Histochemical assays confirmed the presence of polysaccharides and lipids, emphasising the multifunctional nature of cutaneous secretions. In functional assays, synthetic PaT-2 was tested using menadione as an oxidative stress inducer. The results demonstrated that PaT-2 was non-cytotoxic and acted as a redox modulator, inhibiting the formation of oxidised glutathione (GSSG) and thereby exhibiting antioxidant activity. This is the first study to provide a histological description of *P. oreades* skin and to characterise the antioxidant activity of PaT-2, contributing novel insights into the morphology and physiology of amphibians and reinforcing the therapeutic potential of amphibian-derived bioactive peptides.

Keywords: tryptophyllins; bioactive peptides; oxidative stress; *Pithecopus*; antioxidant.

LISTA DE SIGLAS

1. APA	Área de Proteção Ambiental
2. ARIE	Área de Relevante Interesse Ecológico
3. BV2	Linhagem celular de <i>Mus musculus</i>
4. BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
5. CAIQ	Central Analítica do Instituto de Química – UnB
6. CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
7. DCM	Diclorometano
8. DIC	Diisopropilcarbodiimida
9. DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
10. DMF	Dimetilformamida
11. DMSO	Dimetilsulfóxido
12. EDT	Etanoditiol
13. ESI	Electrospray Ionization
14. ESI Q-ToF	Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight
15. FAL	Fazenda Água Limpa
16. Fmoc	Fluorenilmetoxycarbonila
17. GSH	Glutathione Reduzida
18. GSSG	Glutathione Dissulfeto
19. GSSG/tGSH	Relação entre a Glutathione Dissulfeto e Glutathione Total
20. HE	Hematoxilina e Eosina
21. HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
22. IC50	Inhibitory Concentration 50%
23. IDA	Information Dependent Acquisition
24. LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
25. LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry
26. LIC	Laboratório de Imunologia Celular
27. LSAB	Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas – UnB
28. NuPMIA	Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada da Universidade de Brasília
29. PaT-02	<i>Pithecopus azureus</i> Tryptophiline – 02

30. PBS	Phosphate-Buffered Saline
31. PAS	Periodic Acid-Schiff
32. ROS	Reactive Oxygen Species
33. RPM	Revolutions Per Minute
34. SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
35. TFA	Ácido Trifluoroacético
36. TOF	Time of Flight
37. ViroMol	Laboratório de Virologia Molecular - UnB

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Fluxograma da análise dos artigos localizados pela base de dados PubMed 23

Figura 2. Rede de palavras-chave com maiores incidências nos artigos analisados. Quanto maior o tamanho das palavras, mais frequente ela se torna. As cores representam os clusters de palavras chaves relacionadas tematicamente..... 27

Figura 3. Número de publicações extraídas da base de dados PubMed nos anos de 1984 a 2023 28

Figura 4. Quantidade de artigos por revista, mostrando a prevalência de publicações em ordem crescente..... 29

CAPÍTULO II

Figura 5. Mapa de distribuição das espécies *Pithecopus azureus* e *P. oreades*. A imagem (A) representa os Estados de ocorrência de *P. azureus* dentro do Brasil, enquanto (B) representa a ocorrência de *P. oreades* 43

Figura 6. Síntese do peptídeo PaT-2 (FPPWL) pelo método FMOC. O esquema ilustra as etapas da síntese em fase sólida, que se inicia com a adição da resina como suporte. Em cada ciclo, realiza-se a desproteção do grupo Fmoc, seguida da verificação pelo teste de Kaiser, que apresenta coloração azul/violeta (positivo, presença amina livre). Após a confirmação da desproteção, procede-se ao acoplamento do aminoácido com auxílio do agente de acoplamento (Oxyma Pure). O sucesso do acoplamento é novamente verificado pelo teste de Kaiser, que deve resultar em incolor/amarelado (acomplamento completo). Ao final de todos os acoplamentos, o peptídeo é clivado da resina e posteriormente liofilizado 49

Figura 7 Esquema da purificação e caracterização do peptídeo. O peptídeo é inicialmente diluído em água Milli-Q e injetado no sistema HPLC (1), onde ocorre a separação cromatográfica (2). A absorbância das espécies eluídas é monitorada e registrada em forma de cromatograma (3). Em seguida, as frações correspondentes aos picos de interesse são coletadas (4) e a identidade do peptídeo é confirmada por espectrometria de massas (MS) (5). 51

Figura 8. Ensaio de viabilidade celular em placas de 96 poços. Foram semeadas 5.000 células por poço, totalizando 60 poços utilizados no experimento. Após 24 horas de incubação, foi realizada a adição de menadiona em diferentes concentrações (200 μ M a 1,56 μ M). Em seguida, adicionou-se o reagente AlamarBlue, e a leitura da fluorescência foi efetuada 6 horas após a adição do reagente..... 53

Figura 9. Ensaios realizados no presente estudo. (A) representa os ensaios realizados para avaliar os moduladores de Glutathione. (B) atividade antioxidante do Peptídeo. (C) Viabilidade celular do peptídeo. Todos os experimentos foram realizados com células BV2, com cerca de 5000 células por poço (em placas de 96 poços) e 1.10^6 (em placas de 6 poços). Em (C) as setas representam o sentido da diluição da Menadiona e os números o tipo de tratamento 55

Figura 10. Separação dos tecidos para análises histológicas. (A). Indivíduo após a eutanásia. (B) A pele do indivíduo após a dissecação. (D). Separação das amostras para o processamento histológico. (D) Produção das lâminas evidenciando as glândulas 57

Figura 11. Gráfico obtido em HPLC resultado da purificação do PaT-2, apresentando um pico único e proeminente. O pico aparece em um tempo de retenção de aproximadamente 25 minutos. A absorbância em 280 nm está associada à presença de aminoácidos aromáticos (como triptofano), enquanto 216 nm está associada à ligação peptídica..... 60

Figura 12. Espectro de massa do PaT-2 $[M+H]^+ = 658,3716$ Da e sua série isotópica. A partir da massa teórica exata é possível calcular o erro de massa, com valor de 0,152 ppm..... 61

Figura 13. Espectro de fragmentação (MS/MS) obtido em modo IDA do íon $[M+H]^+$. Os fragmentos obtidos a partir das séries estão destacados em roxo (série a), azul (série b) e vermelho (série y). O gráfico abaixo “Error (ppm)” evidencia cada fragmento detectado. ... 62

Figura 14. Tratamento com o indicador de viabilidade AlamarBlue. (A) representa o tratamento com 2 horas. (B) tratamento com 3 horas. (C) tratamento com 4 horas. 62

Figura 15. Efeito da menadiona na viabilidade celular. O gráfico determina o IC50% após o estresse celular induzido pela menadiona e avaliadas pelo ensaio de resazurina (10 μ g/mL, 4 h de incubação). Os experimentos foram realizados em duplicata em células microglicais de camundongos. Cada experimento apresentou valores de IC50% com valores aproximados (8,61 μ M e 13,74 μ M). O gráfico mostra a relação da absorbância e a concentração da menadiona. As cores representam a viabilidade metabólica das células. e avaliadas pelo ensaio de resazurina (10 μ g/mL, 4 h de incubação). 62

Figura 16. Tratamento com 10 μ M de menadiona. O primeiro gráfico mostra os níveis de proteína (Protein), seguido de glutathione Total (GSH-Total), Glutathione-oxidada (GSH-

Oxidized) e Razão entre Glutathione reduzida e oxidada (Disulfide to Total Glutathione). O tratamento com as células controle está evidenciado com a cor azul e as células tratadas com menadiona (10 μ M) apresentam-se na cor vermelha. 64

Figura 17. Gráfico evidenciando os moduladores de glutathione em três tratamentos: controle (círculos azuis), Menadiona 10 μ M (círculos vermelho claro) e Menadiona 20 μ M (círculos vermelho escuro). Cada círculo representa um experimento independente. 65

Figura 18. Alteração na morfologia celular conforme o tratamento recebido. (A) as células foram tratadas com DMSO. (B), as células foram tratadas com DMEM, na (C) e (D) representa o tratamento com menadiona em sua maior para menor concentração. As imagens foram obtidas em aumento de 10x. 66

Figura 19. Efeito da menadiona na viabilidade celular de células BV-2. As células foram tratadas por 24 h com diferentes concentrações de menadiona (3–100 μ M) e avaliadas pelo ensaio de resazurina (10 μ g/mL, 4 h de incubação). Os resultados mostram redução progressiva da viabilidade celular de forma dose-dependente, com destaque para a concentração inibitória de 50% (IC₅₀). 67

Figura 20. Efeitos do peptídeo PaT-2 sobre os parâmetros relacionados à glutathione em células tratadas com menadiona. (A) Glutathione total (tGSH), (B) Glutathione reduzida (GSH), (C) Glutathione oxidada (GSSG) e (D) Razão GSSG/GSH. Os grupos analisados foram: controle (Ctrl), células tratadas com PaT-2, células tratadas com menadiona e células tratadas com a combinação menadiona + PaT-2 (M+PaT-2). Os valores representam a média $\pm$ distribuição dos dados experimentais. 69

Figura 21. Caracterização morfológica da pele de *P. oreades*. (A) Região da cabeça evidenciando epiderme (ep), derme papilar (dp) e derme reticular (dr). Na derme papilar evidenciamos presença de cromatóforos (seta) e glândulas mucosas (*). Na derme reticular observamos a presença de glândulas granulares lipídicas (L) e glândulas granulares serosas (V) (de veneno). (B) Região do pescoço, evidenciando grande quantidade de glândulas granulares serosas (V). (C) Região do dorso, evidenciando a pele mais delgada com glândulas granulares serosas (V) de menor tamanho e mais esparsas. Barra = 10 μ m. Método utilizado: HE. 70

Figura 22. Caracterização histoquímica da pele de *P. oreades* e *P. azureus*. (A) Região da pata dianteira evidenciando glândulas mucosas (*) positivas para PAS, glândulas granulares lipídicas (L) fracamente positivas para PAS e glândulas granulares serosas (de veneno) (V) positivas para azul de alcian 2,5. (B) Região inguinal, evidenciando glândula granular serosa (de veneno) (V) positiva para azul de alcian pH 1,0. Barra = 10 μ m. Métodos utilizados: Alcian Blue pH 2,5 + PAS (A) e Alcian Blue pH 1,0 (B). 71

Figura 23. Distribuição das glândulas em diferentes regiões do corpo de *P. oreades*. As glândulas de veneno foram observadas nas regiões dorsais da cabeça (1), do pescoço (3) e do dorso (5), bem como nas demais áreas analisadas, incluindo os dorsos das patas dianteiras esquerda (2) e direita (4), região inguinal (7) e patas traseiras esquerda (6) e direita (8). Nessas diferentes regiões, as glândulas apresentaram variações quanto à disposição no tecido. Método utilizado: Alcian Blue pH 2,5 + PAS..... 72

Figura 24. Movimentos de limpeza visualizados em rãs. (A) Início da limpeza na região da cabeça e pescoço (B) fim da limpeza na região da cabeça (C) Limpeza na região dorsal (D) após limpeza as rãs iniciam uma postura de conservação de água. As setas representam o sentido dos movimentos. Ilustração: T. Barbeau (2005). 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação das triptofilinas de acordo com o número de resíduos e suas respectivas espécies 21

Tabela 2. Lista dos artigos analisados, evidenciando título do trabalho, principais descobertas, autoria e ano da publicação. Fonte: dados obtidos do site PubMed 24

SUMÁRIO

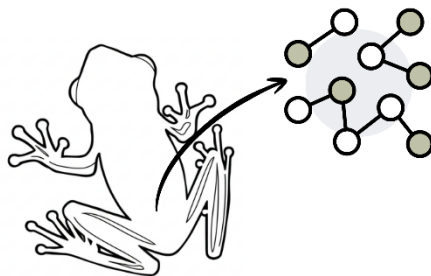
CAPÍTULO I. ANÁLISE DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA SOBRE PEPTÍDEOS DA CLASSE DAS TRIPTOFILINAS SECRETADAS POR ANFÍBIOS.....	18
RESUMO.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Triptofilinas.....	20
1.2 Análise Bibliométrica.....	21
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3 RESULTADOS.....	23
3.1 Análise de rede Palavras-chave.....	26
3.2 Análise do número de publicações por ano.....	27
3.3 Relação de publicações em periódicos científicos.....	28
4 DISCUSSÃO.....	30
4.1 Atividade biológica das triptofilinas.....	30
4.2 Métodos analíticos: identificação, caracterização e purificação.....	31
4.3 Análise Bibliométrica.....	32
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
6 REFERÊNCIAS.....	33
 CAPÍTULO II. ESTUDO EXPERIMENTAL: COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO, SÍNTESE PEPTÍDICA, ANÁLISE HISTOLÓGICA, ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E ANTIOXIDANTES.....	 39
RESUMO.....	40
7 INTRODUÇÃO.....	41
7.1 Anfíbios.....	41
7.2 Família phyllomedusidae.....	42
7.3 Pithecopus oreades (Brandão, 2002) e P. azureus (Cope,1862).....	42
7.4 Glândulas secretoras.....	43
7.5 Anfíbios e seus compostos bioativos.....	45
7.6 Triptofilinas.....	46
7.7 PaT-2.....	46

8	OBJETIVOS	47
8.1	Objetivo Geral	47
8.2	Objetivo Específico	47
9	MATERIAL E MÉTODOS	48
9.1	Síntese do peptídeo PaT-2	48
9.2	Clivagem do peptídeo PaT-2	48
9.3	Purificação do peptídeo PaT-2	49
9.4	Caracterização do peptídeo por espectrometria de massa	50
9.5	Células de estudo e Local de estudo	51
9.6	Cultivo das células	51
9.7	Determinação da densidade celular	52
9.8	Preparação para o ensaio de viabilidade celular	52
9.9	Ensaio de viabilidade celular	52
9.10	Ensaio para análise dos moduladores de glutathione (indicativo de estresse celular)	53
9.11	Preparação do material para a análise	54
9.12	Preparação do estoque de peptídeo PaT-2	54
9.13	Atividade antioxidante e viabilidade celular do peptídeo	54
9.14	Análise estatísticas	56
9.15	Local de estudo e coleta dos animais	56
9.16	Eutanásia dos indivíduos	56
9.17	Dissecação da pele	57
9.18	Histologia da pele	58
9.19	Coloração do material	58
10	RESULTADOS	59
10.1	Purificação do PaT-2	60
10.2	Análise por espectrometria de massa	60
10.3	Morfologia celular e teste com Resazurina	62
10.4	Gráfico IC50%: efeito da menadiona em BV2	63
10.5	Análise dos moduladores de glutathione	64
10.6	Análise morfológica das células BV2	66
10.7	Efeito do peptídeo (PaT-2) na viabilidade celular	67

10.8	Avaliação dos moduladores de glutathione em células tratadas com o peptídeo PaT-2.....	68
10.9	Análise histológica do tecido epitelial de <i>P. Azureus</i> e <i>P. Oreades</i>	69
11	DISCUSSÃO	72
12	CONCLUSÃO	76
13	TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS INTERNACIONAIS	78
14	REFERÊNCIAS	79

CAPÍTULO I

ANÁLISE DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA SOBRE PEPTÍDEOS DA CLASSE DAS TRIPTOFILINAS
SECRETADAS POR ANFÍBIOS



RESUMO

As triptofilinas constituem uma classe de peptídeos bioativos produzidos por algumas famílias de anfíbios incluindo a família Phyllomedusidae. Essas moléculas são caracterizadas pela presença do aminoácido triptofano em sua cadeia e estão associadas ao sistema de defesa química desses animais, protegendo-os tanto contra predadores quanto contra microrganismos patogênicos. Do ponto de vista científico, representam uma fonte promissora para a prospecção de novos fármacos, uma vez que já foram descritas atividades bioativas relevantes, incluindo efeitos miotrópicos, ação antimicrobiana, atividade antioxidante e propriedades neuromodulatórias.

O objetivo desta revisão é reunir e analisar a produção científica disponível até a presente data, destacando as principais descobertas, a evolução metodológica e o avanço no entendimento acerca dessa classe de moléculas. As buscas foram realizadas na base de dados PubMed, a partir de julho de 2025, utilizando descritores específicos. Para a análise bibliométrica e visualização dos tópicos abordados, empregou-se o software VOSviewer, que gerou mapas de coocorrência representativos.

Foram identificados 25 estudos elegíveis para a revisão. Os resultados evidenciam que as triptofilinas representam uma classe de grande interesse biológico, com atividades neuromodulatória, miotrópica, antioxidante, opioide, antimicrobiana e anticancerígena. Portanto, pode-se inferir que os peptídeos dessa classe apresentam elevado potencial farmacológico, reforçando a importância de investigações futuras que explorem seus mecanismos de ação e possíveis aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: triptofilina, peptídeos, anfíbios, biomoléculas, antioxidantes

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tryptofilinas

As triptofilinas são uma classe de peptídeos bioativos produzidos pelas glândulas cutâneas de algumas famílias de anfíbios, incluindo espécies da família Phyllomedusidae, a qual inclui os gêneros *Phyllomedusa* e *Pithecopus* (Montecucchi, 1985a). Essas moléculas fazem parte do complexo coquetel de compostos presentes na secreção tegumentar desses anuros, apresentando grande múltiplas funções fisiológicas e ecológicas (Ge et al., 2014).

Esses peptídeos foram inicialmente descritos em secreções de *Phyllomedusa rohdei* (Montecucchi, 1985), e são caracterizados por conterem o aminoácido triptofano em diferentes contextos estruturais. As triptofilinas podem assumir formas cíclicas ou lineares e apresentam variações importantes em sua composição e massa molecular (GE et al., 2014). Apesar de suas estruturas serem conhecidas, suas funções biológicas ainda não são completamente compreendidas, embora estudos sugiram possíveis papéis antimicrobianos, neuroativos ou reguladores (Conlon, 2011).

Acredita-se que as triptofilinas participem do sistema de defesa química desses anuros, funcionando como parte de uma estratégia evolutiva contra predadores e microrganismos patogênicos. Tal hipótese é reforçada pelo fato de que esses peptídeos estão amplamente distribuídos nas secreções tegumentares e compartilham espaço com outras substâncias bioativas como dermaseptinas (Silva et al., 2007; (Leite et al., 2008)).

Do ponto de vista da ciência, essas moléculas representam uma fonte promissora para a descoberta de novos fármacos, uma vez que muitos peptídeos isolados de anfíbios apresentam caráter defensivo e possuem propriedades terapêuticas importantes, como atividades antioxidantes. Nesse contexto, o estudo das triptofilinas em espécies do gênero *Pithecopus*, pode contribuir para o maior entendimento sobre a biodiversidade química dos anfíbios, além de oferecer perspectivas aplicadas na biotecnologia e farmacologia (Conlon, 2011).

Popov (2013) cita o agrupamento das triptofilinas em três tipos, que estão representados na tabela 1, sendo eles:

- **Grupo 1 (T-1):** que contém em sua cadeia peptídeos básicos (R, K e H) e abrange os heptapeptídeos amidados e os octapeptídeos, além de possuírem prolina e um resíduo de triptofano na quinta posição.
- **Grupo 2 (T-2):** possuem tamanhos diversos e geralmente são amidados na região carbóxi-terminal e possuem prolina e triptofano paralelos.
- **Grupo 3 (T-3):** possui uma estrutura mais conservada, com a presença da sequência Pro-Pro-Pro-Ile-Tyr

Tabela 1. Identificação das triptofilinas de acordo com o número de resíduos e suas respectivas espécies.

Grupo	Sequência primária	NR	Espécie	Referência
T1	RPPSWIPK-	8	<i>Phyllomedusa azurea</i>	(Popov, 2013)
T1	KPPAWVPNH	9	<i>Pachymedusa dactinicolor</i>	
T2	-FPPWMNH-	7	<i>Phyllomedusa azurea</i>	
T2	-FPPWL---	5	<i>Pithecopus azureus</i>	
T2	-FPPWVL---	6	<i>Phyllomedusa centralis</i>	
T2	-QIPWFHR--	7	<i>Litoria rubella</i>	
T2	GIPW-QR-	7	<i>Ascaphus truei</i>	
T3	QDKPFWPPPIYIM	13	<i>Phyllomedusa azurea</i>	
T3	QEKPYWPPPIYPM	13	<i>Phyllomedusa rohdei</i>	
T3	QDKPFWSPPIYPV	13	<i>Phasmahyla jandaia</i>	

Diversas variações estruturais de triptofilinas têm sido identificadas em diferentes espécies de anuros. Além disso, inúmeras pesquisas vêm sendo conduzidas com o objetivo de isolar e caracterizar novos peptídeos cutâneos, sendo que mais de quarenta tipos distintos de triptofilinas (TPHs) já foram descritos a partir das secreções tegumentares desses animais (Pukala et al., 2006).

1.2. Análise bibliométrica

A análise bibliométrica busca mapear, identificar redes de colaboração, avaliar a produção de autores e instituições. Essa metodologia baseia-se em indicadores como o número de produção científica, citações, coautorias, com o intuito de revelar a estrutura dinâmica da pesquisa científica, avaliar a evolução da produção de um tema ou representar um arranjo em formas de mapas de uma área de pesquisa (van Eck & Waltman, 2010).

No que se refere a esse estudo, esse método permite quantificar e analisar na literatura científica as principais contribuições no estudo das peptídeos da classe das triptofilinas oferecendo uma visão abrangente das produções a partir desse tema. Atualmente, há diversas publicações abordando os efeitos das triptofilinas, no entanto ainda são limitadas as investigações que consolidam o conhecimento produzido até o momento. Considerando sua atuação como agentes antioxidantes em anuros e o seu promissor potencial terapêutico, destaca-se a importância de uma revisão na literatura que integre os principais achados sobre o tema (Montecucchi, 1985b).

Diante do exposto, é importante compreender o avanço nos estudos sobre esses peptídeos, o objetivo desse capítulo é destacar o potencial dessas biomoléculas, avanços, tendências e lacunas nas investigações existentes. Para isso, serão utilizadas bases de dados e softwares especializados, com foco nas publicações científicas sobre triptofilinas secretadas por anfíbios.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo tem o objetivo de realizar uma análise das pesquisas já realizadas sobre peptídeos, com foco nas triptofilinas secretadas por anfíbios, conforme registrado na base de dados Pubmed®. O trabalho envolve o mapeamento bibliométrico dessa classe de proteínas, incluindo a identificação dos principais autores e instituições que pesquisam o tema, além de uma análise dos assuntos mais discutidos na área.

O levantamento da produção científica relacionada ao estudo das triptofilinas produzidas por anfíbios foi realizado por meio da ferramenta VOSviewer, utilizando como base de dados a plataforma PubMed (figura 1), uma das principais fontes de literatura acadêmica. As buscas começaram a ser realizadas em 01 de Junho de 2025 e estratégia dos descritores foi iniciada com o uso de operadores booleanos aplicado à base de dados utilizando as expressões:

(tryptophyllin[Title/Abstract]) AND (frog[Title/Abstract] OR
frogs[Title/Abstract])*

3. RESULTADOS

A busca foi conduzida com uso de palavras aplicadas aos campos de título e resumo, limitando os resultados a artigos e revisões, publicados em língua inglesa até julho de 2025.

Dos 26 artigos inicialmente identificados na busca, 25 foram selecionados após a leitura e análise dos critérios de inclusão. Foram excluídos aqueles que não apresentavam descobertas relevantes ou que não continham análise experimental.

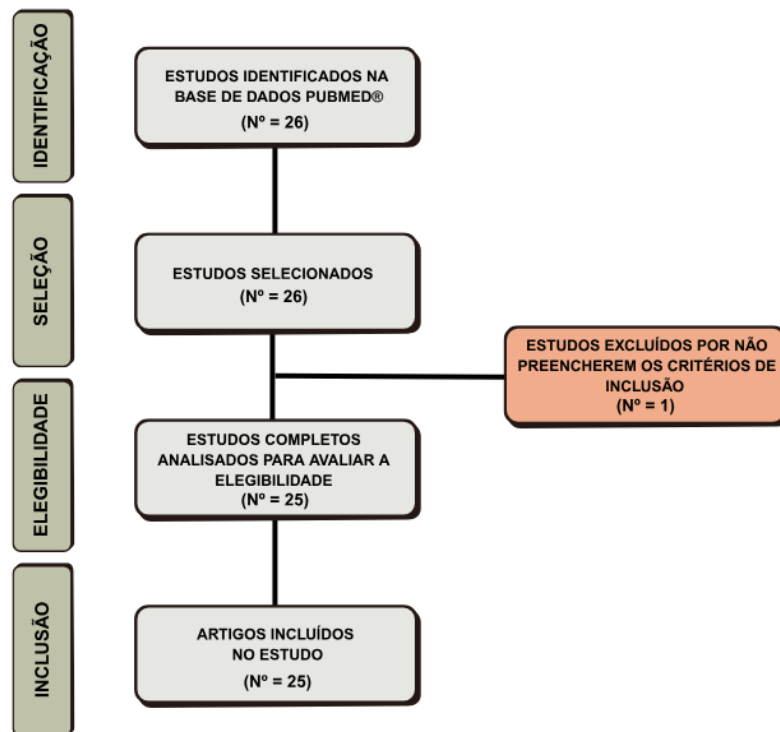


Figura 1. Fluxograma da análise dos artigos localizados pela base de dados PubMed.

Treze trabalhos apresentaram resultados que demonstraram atividades biológicas associadas às triptofilinas (tabela 2). Dentre as atividades mais frequentemente relatadas estão o efeito miotrópico, a ação opioide, o efeito antiproliferativo em células cancerígenas, além de atividades antimicrobiana e antioxidante. Os demais estudos tiveram como foco a investigação, o isolamento, o desenvolvimento ou o aprimoramento das triptofilinas produzidas por diferentes espécies de anfíbios.

Os resultado obtidos da busca estão representados na **tabela 2**.

Tabela 2. Lista dos artigos analisados, evidenciando título do trabalho, principais descobertas, autoria e ano da publicação. Fonte: dados obtidos do site PubMed.

Título do Artigo	Atividade biológica da Triptofilina	Autor e ano
Syntheses of tetra- and pentapeptides from skin extracts of <i>Phyllomedusa rohdei</i> (tryptophyllins)	O objetivo do estudo foi desenvolver e aprimorar métodos de síntese de peptídeos da classe das triptofilinas, além de estabelecer protocolos de purificação, portanto, sua função biológica não foi investigada.	(PERSEO & DE CASTIGLIONE, 1984)
Isolation and Primary Structure Determination of Amphibian Skin Tryptophyllins	O estudo teve o objetivo de isolar e purificar triptofilinas produzidas pela espécie <i>Phyllomedusa rohdei</i> , portanto, sua função biológica não foi investigada.	(Montecucchi, 1985b)
Tryptophyllin-Like Immunoreactivity in Rat Adenohypophysis	O peptídeo isolado da espécie <i>P. rohdei</i> possui um potencial neuromodulador na adenohipófise de ratos.	(Renda et al., 1985)
Phyllomedusa Skin: A Huge Factory and Store-House of a Variety of Active Peptides	O objetivo do trabalho foi investigar a diversidade e a composição dos peptídeos biologicamente ativos presentes na pele de espécies do gênero <i>Phyllomedusa</i> , com foco na caracterização estrutural e classificação dessas moléculas, portanto, a função biológica dos peptídeos descobertos não foi investigada.	(Erspamer et al., 1985)
Active peptides in the skins of two hundred and thirty American amphibian species	O objetivo foi identificar os peptídeos presentes na pele das diferentes espécies, portanto, sua função biológica não foi investigada.	(Erspamer et al., 1986).
The Application of Mass Spectrometry to the Study of Evolutionary Trends in Amphibians	O objetivo do estudo foi utilizar a espectrometria de massas para investigar a as toxinas secretadas pela espécie <i>L. rubella</i> com intuito de revelar se há diferenças entre populações, não foi investigado a atividade biológica dos peptídeos.	(Steinborner et al., 1996)
<i>Pachymedusa dacnicolor</i> tryptophyllin-1: structural characterization, pharmacological activity and cloning of precursor cDNA	Apresentou atividade miotrópica em tecidos de músculo liso de ratos.	(Chen et al., 2004)
Bradykinin-related peptides and tryptophyllins in the skin secretions of the most primitive extant frog, <i>Ascaphus truei</i>	O objetivo do estudo foi isolar, identificar e caracterizar estruturalmente peptídeos presentes na secreção cutânea da rã primitiva <i>Ascaphus truei</i> , com ênfase na descoberta de bradicininas e peptídeos do tipo triptofilinas. Sua função biológica não foi investigada.	(Conlon et al., 2005)
PdT-2: A novel myotropic Type-2 tryptophyllin from the skin secretion of the Mexican giant leaf frog, <i>Pachymedusa dacnicolor</i>	O peptídeo PdT-2 apresentou atividade miotrópica (contraíu musculatura lisa da bexiga de rato).	(L. Wang et al., 2009)

N-Terminal Tagging Strategy for De Novo Sequencing of Short Peptides by ESI-MS/MS and MALDI-MS/MS	O objetivo foi otimizar a identificação estrutural de triptofilinas muito curtas, portanto, não foram investigadas diretamente atividades biológicas do peptídeo.	(Samgina, Kovalev, et al., 2010).
Characterization of a peptide family from the skin secretion of the Middle East Tree Frog <i>Hyla savignyi</i> by composition-based de novo sequencing	O estudo teve o objetivo principal de identificar os peptídeos presentes na pele da espécie <i>Hyla savignyi</i> , portanto, sua função biológica não foi investigada.	(Langsdorf et al., 2010)
Novel natural peptides from <i>Hyla arborea schelkownikowi</i> skin secretion	O estudo teve o objetivo de identificar peptídeos secretados pela espécie <i>H. arborea schelkownikowi</i> , portanto a atividade biológica das triptofilinas não foram investigadas.	(Samgina, Gorshkov, et al., 2010).
An unusual kynurenine-containing opioid tetrapeptide from the skin gland secretion of the Australian red tree frog <i>Litoria rubella</i>	Apresentou ação opióide em músculo arterial de rato (bloqueio do relaxamento dos vasos sanguíneos).	(Ellis-Steinborner et al., 2011).
Gene expression analysis by ESTs sequencing of the Brazilian frog <i>Phyllomedusa nordestina</i> skin glands	O estudo teve o objetivo de identificar genes dos peptídeos produzidos por essa espécie. Foi identificado genes da triptofilina, porém sua atividade biológica não foi investigada.	(Neiva et al., 2013)
PsT-1: A new tryptophyllin peptide from the skin secretion of Waxy Monkey Leaf Frog, <i>Phyllomedusa sauvagei</i>	O peptídeo PsT-1 inibiu a vasorrelaxação induzida por bradicinina e apresentou um efeito antiproliferativo em células de câncer de próstata.	(R. Wang et al., 2013)
Molecular Cloning of a Novel Tryptophyllin Peptide from the Skin of the Orange-Legged Monkey Frog, <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	O peptídeo PhT-3 é antagonista de bradicinina em músculo liso de artéria caudal de rato e apresentou um efeito antiproliferativo em linhagens de câncer de próstata humano.	(R. Wang et al., 2014)
AcT-2: A Novel Myotropic and Antimicrobial Type 2 Tryptophyllin from the Skin Secretion of the Central American Red-Eyed Leaf Frog, <i>Agalychnis callidryas</i>	Apresentou atividade miotrópica (relaxamento da artéria caudal e contração do músculo da bexiga urinária de ratos) e antimicrobiana (inibiu o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i>).	(Ge et al., 2014)
Identification and Functional Analysis of a Novel Tryptophyllin Peptide from the Skin of the Red-eye Leaf Frog, <i>Agalychnis callidryas</i>	O peptídeo AcT-3 é antagonista de bradicinina em músculo liso de artéria caudal de rato, contra o músculo liso intestinal, indicando ação miotrópica e apresenta efeito antiproliferativo em célula de câncer de próstata humano.	(R. Wang et al., 2015)
Baltikinin: A New Myotropic Tryptophyllin-3 Peptide Isolated from the Skin Secretion of the Purple-Sided Leaf Frog, <i>Phyllomedusa baltea</i>	O peptídeo TPH-3 (baltikinin) possui efeitos miotrópicos (relaxamento da musculatura lisa de artéria de rato).	(Shi et al., 2016)
Antioxidant activities of major tryptophyllin L peptides: A joint investigation of Gaussian-based 3D-QSAR and radical scavenging experiments	Os peptídeos estudados apresentaram ação antioxidante, ou seja, neutralizaram radicais livres. Não apresentaram toxicidade em hemácias e nem em larvas de <i>Galleria mellonella</i> , reforçando o potencial biológico seguro.	(Tran et al., 2021)

The peptide secreted at the water to land transition in a model amphibian has antioxidant effects	O PaT-2 apresentou efeito antioxidante em células nervosas.	(Barbosa et al., 2021)
Virtual screening and rational design of antioxidant peptides based on tryptophyllin L structures isolated from the <i>Litoria rubella</i> frog	O trabalho teve o objetivo de utilizar simulações, para modelagem de moléculas derivadas das triptofilinas e simular virtualmente a interação dessas moléculas com radicais livres, aumentando o potencial antioxidante desses peptídeos.	(Tran et al., 2022)
Neuroprotective effects on microglia and insights into the structure–activity relationship of an antioxidant peptide isolated from <i>Pelophylax perezii</i>	Apresentou atividades antioxidantes e neuroprotetora, atividade antiproliferativa leves em células de câncer de próstata e baixa toxicidade em hemácias humanas.	(Plácido et al., 2022)
Purification, Conformational Analysis and Cytotoxic Activities of Host-Defense Peptides from the Giant Gladiator Treefrog <i>Boana boans</i> (Hylidae: Hylinae)	Não foi detectada atividade significativa nos ensaios realizados (antimicrobianas, citotóxica e hemolítica).	(Conlon et al., 2023)
Novel tryptophyllin peptides from <i>Physalaemus centralis</i> inhibit oxidative stress-induced endothelial dysfunction in rat aorta preparation	Os peptídeos apresentaram um efeito vascular, ao restaurar artérias de rato sob estresse oxidativo, apresentaram atividade antioxidante e não apresentaram toxicidade em hemácias humanas e nem em larvas de <i>Galleria mellonella</i> .	(Nogueira et al., 2025)

3.1 Análise de rede de palavras-chave

Um mapeamento visual gerado pelo software VOSviewer (figura 2) mostra a rede de palavras-chave em publicações relacionados ao tema peptídeos da classe das triptofilinas. Cada nó na rede corresponde a uma palavra-chave, e tanto seu tamanho quanto suas conexões refletem a frequência de coocorrência dessas palavras-chave nos documentos analisados. As palavras-chave posicionadas de forma mais central apresenta maior número de conexões, refletindo sua relevância dentro da temática. Dentre os termos as que tiveram maiores pesos foram “animals”, “oligopeptides”, “anura”, “skin”, “peptides” e “amino acid sequence”, respectivamente.

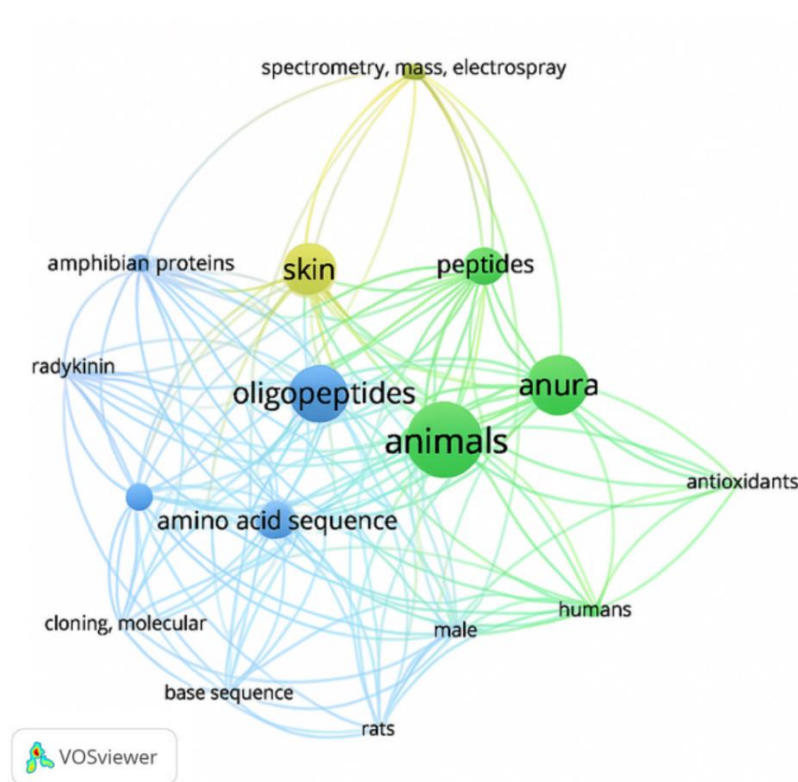


Figura 2. Rede de palavras-chave com maiores incidências nos artigos analisados. Quanto maior o tamanho das palavras, mais frequente ela se torna. As cores representam os clusters de palavras chaves relacionadas tematicamente.

3.2 Análise do número de publicações por ano

O primeiro registro sobre a identificação de triptofilinas em anfíbios foi publicado em 1984 (Figura 3), indicando ser trabalhos experimentais pioneiros nesse tema documentados em periódicos. O número de publicações cresceu aos poucos, apresentando picos nos anos de 1985, 2010 e 2021. Esses aumentos podem estar ligados ao surgimento de novas técnicas de análise, como a espectrometria de massas, e ao interesse cada vez maior por substâncias naturais com potencial terapêutico. A maioria dos trabalhos publicados apresentaram-se no formato de artigo científico.



Figura 3. Número de publicações extraídas da base de dados PubMed nos anos de 1984 a 2023.

3.3 Relação das publicações em periódicos científicos

Dentre os 25 periódicos analisados, a revista *Peptides* destacou-se por concentrar o maior número de citações (168), seguida de *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (54) e *Regulatory peptides* (49) (figura 4). Coincidentemente artigos mais antigos apresentaram maiores números de citações, o que sugere que se tratam de estudos precursoros, utilizados como base teórica e metodológica em pesquisas posteriores



Figura 4. Quantidade de artigos por revista, mostrando a prevalência de publicações em ordem crescente.

4. DISCUSSÃO

Entre os 25 artigos analisados, alguns se destacaram por trazer contribuições relevantes acerca das triptofilinas, reforçando o elevado potencial biológico dessa classe de peptídeos. As principais atividades descritas englobam efeitos neuromodulatórios, ação miotrópica, propriedades antioxidantes, atividades de natureza opioide, além de ação antimicrobiana e anticancerígena. Tais achados demonstram a versatilidade funcional dessas moléculas e sua relevância como modelos para prospecção farmacológica. De modo geral, os estudos empregaram metodologias avançadas de investigação, incluindo síntese peptídica, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massas, que possibilitaram a identificação, caracterização estrutural e purificação das triptofilinas, ampliando o conhecimento sobre sua diversidade química e funcional.

4.1. Atividade biológica das triptofilinas

A triptofilina com ação miotrópica atua diretamente sobre o músculo liso modulando sua contração ou relaxamento (SHI, 2016). Esse mecanismo não é totalmente esclarecido para todas as triptofilinas, mas estudos indicam que elas interagem com receptores ativando vias de sinalização que aumentam ou reduzem a entrada de Ca^{2+} , ou seja, se o Ca^{2+} aumenta ocorre a contração, caso contrário ocorre o relaxamento muscular. Wang (2013) analisou a atividade do peptídeo PdT-2, isolado de *Pachymedusa dactylos*, em contração de músculo liso da bexiga de rato, sugerindo interação com células musculares. Em 2015, Wang, observou que AcT-3, isolado de *Agaychnis callidryas*, contrai músculo liso intestinal de rato e antagoniza o efeito relaxante da bradicinina em artéria caudal, mostrando ação miotrópica dupla: tanto direta (contrátil) quanto indireta (antagonista). Além disso, AcT-3 apresentou um efeito que antiproliferativo em células de câncer de próstata humano, demonstrando uma redução significativa na taxa de crescimento celular dessas células, no entanto, o possível mecanismo não foi elucidado (WANG, 2015).

As triptofilinas que apresentaram ação antioxidante atuam neutralizando radicais livres por meio da doação de elétrons, protegendo células que sofreram estresse oxidativo (PLÁCIDO et al, 2021). Uma das características da triptofilina é possuir triptofano (Trp) em sua cadeia, um aminoácido aromático, que são capazes de doar elétrons com facilidade sem perder a estabilidade (TRAN, 2021). Nogueira et al (2025) testaram a ação antioxidante de dois peptídeos PcT-1 e PpT-2 produzidos pela espécie *Physalaemus centralis* e *Pelophylax perezi*, respectivamente. Ambos os peptídeos demonstraram efeito antioxidantes nas células testadas, além de apresentar baixa toxicidade em indivíduos da espécie *Galleria mellonella*, revelando o potencial biotecnológico desses peptídeos como agentes antioxidantes.

As demais atividades investigadas, como ação antimicrobiana, opioides e antiproliferativa em células cancerígenas são relatadas por alguns pesquisadores. As triptofilinas com atividades antimicrobianas interagem com a parede celular desses microorganismos desestabilizando a bicamada lipídica, que perdem a integridade da membrana, consequentemente levando à lise celular de bactérias ou fungos (PLÁCIDO et al, 2021). Já em células cancerígenas, um dos mecanismos de ação é a inibição do

crescimento celular. Plácido observou efeito antiproliferativo moderado do PpT-2 em células de cancer de próstata humano, indicando que essa molécula induz a apoptose celular. A ação opióide, relatada por Renda et al (1985), mostra um possível papel do peptídeo como neurotransmissor ao induzir a sedação e sono quando injetado em pombos, o mecanismo não foi descrito.

4.2. Métodos analíticos: identificação, caracterização e purificação

Muitos trabalhos analisados nesse presente estudo se concentraram em isolar, purificar e identificar a diversidade de substâncias obtidas na secreção de anfíbios. Os resultados observados destacam a importância dessas técnicas, e as descobertas permitem inferir que esses animais produzem uma vasta gama de peptídeos com potenciais bioativos.

Em um dos trabalhos mais antigos desta revisão, Erspamer (1986) identificou diversos peptídeos por meio do método Cromatografia em Coluna de Alumina e Filtração em Gel, que é considerado um método mais simples, porém permitiu a descoberta de mais de cinco famílias de peptídeos. Uma das características desse método é a exclusão molecular, ou seja, moléculas que apresentam maiores volumes são eluídas primeiramente quando se comparada com as de menor volume (Winzor, 2003)

Técnicas avançadas são utilizadas para caracterizar essas moléculas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Samgina (2010) investigou a espécie *Hyla arborea schelkownikowi* e utilizou como método de análise a espectrometria de massas e ionização por nano-eletrospray para sequenciamento de peptídeos curtos, cerca de dez peptídeos foram encontrados e foi revelado um novo peptídeo para essa espécie (bradicinina).

Barbosa et al (2021), utilizaram diversas técnicas para identificar e caracterizar o peptídeo PaT-2, como MALDI IMAGING, para evidenciar a distribuição dessa molécula na pele do animal, além da síntese e sequenciamento de cDNA, demonstrando a complementariedade de diferentes metodologias para obtenção de resultados mais completos.

4.3. Análise bibliométrica

A importância da análise bibliométrica é mostrar dados complexos em representações visuais mais claras, como mapas que evidenciam redes de colaboração e palavras-chaves que são importantes em um tema. Os dados obtidos nessa análise permitiu uma visualização e compreensão das tendências de pesquisa, identificação dos principais periódicos, entendimento sobre lacunas de conhecimento e descobertas de novos temas nessa área de estudo, oferecendo um direcionamento de pesquisa para novos trabalhos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, revisamos a produção científica disponível sobre os peptídeos da classe das triptofilinas, secretados por anfíbios da família Phyllomedusidae, destacando suas principais atividades biológicas, os achados mais relevantes e a evolução metodológica das pesquisas nessa área. As evidências reunidas demonstram que as triptofilinas apresentam ampla diversidade estrutural e funcional, o que lhes confere papéis fundamentais na defesa imunológica e fisiológica dos anfíbios. Essa versatilidade reforça seu valor como moléculas de interesse farmacológico. De modo geral, foram relatadas atividades neuromodulatórias, miotrópicas, antioxidantes, opioides, antimicrobianas e até mesmo anticancerígenas, evidenciando o vasto espectro de ações desses peptídeos.

Em síntese, as triptofilinas configuram uma classe promissora de biomoléculas com múltiplas aplicações biológicas e biomédicas. A continuidade dos estudos é essencial não apenas para o aprofundamento do conhecimento acerca de seus mecanismos de ação, mas também para fomentar a descoberta de novos candidatos a fármacos com potencial terapêutico em áreas estratégicas, como inflamação, doenças infecciosas, estresse oxidativo e patologias de origem neurodegenerativa.

6. REFERÊNCIAS

- Andrade, P., Elías, R. P., Grandez, R. R., & Mamani, J. P. (2018). Histological description of the skin of the titicaca water frog (*Telmatobius culeus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(1), 64–74. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14085>
- Asséf Millen Valente Teixeira, S. (n.d.). *STÉPHANIE ASSÉF MILLEN VALENTE TEIXEIRA MORFOLOGIA DO TEGUMENTO DE ANFÍBIOS ANUROS DA MATA ATLÂNTICA E SUA APLICAÇÃO EM ESTUDOS COMPORTAMENTAIS*.
- Aykul, S., & Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry*, 508, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.025>
- Azevedo Calderon, L. De, Silva, A. D. A. E., Ciancaglini, P., & Stábeli, R. G. (2011). Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: From biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. In *Amino Acids* (Vol. 40, Issue 1, pp. 29–49). <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0622-3>
- Barbeau, T. R., & Lillywhite, H. B. (2005). Body wiping behaviors associated with cutaneous lipids in hyliid tree frogs of Florida. *Journal of Experimental Biology*, 208(11), 2147–2156. <https://doi.org/10.1242/jeb.01623>
- Barbosa, E. A., Plácido, A., Moreira, D. C., Albuquerque, L., Dematei, A., Silva-Carvalho, A., Cabral, W. F., Bão, S. N., Saldanha-Araújo, F., Kuckelhaus, S. A. S., Borges, T. K., Portugal, C. C., Socodato, R., Teixeira, C., Lima, F. C. D. A., Batagin-Neto, A., Sebben, A., Eaton, P., Gomes, P., ... Leite, J. R. S. A. (2021). The peptide secreted at the water to land transition in a model amphibian has antioxidant effects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1962). <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1531>
- Biswas, S. K., & Rahman, I. (2009). Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: The role of glutathione. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 30, Issues 1–2, pp. 60–76). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.07.001>
- Caramaschi, U. (2006). Redefinição do Grupo de *Phyllomedusa hypochondrialis*, com redescritção de *P. megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926), revalidação de *P. azurea cope*, 1862 e descrição de uma nova espécie (amphibia, anura, hylidae). *Arquivos Do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, v.64, p.159-179.
- Caricchio, R., Kovalenko, D., Kaufmann, W. K., & Cohen, P. L. (1999). *Apoptosis Provoked by the Oxidative Stress Inducer Menadione (Vitamin K 3) Is Mediated by the Fas/Fas Ligand System 1*. <http://www.idealibrary.com>
- Chen, T., Orr, D. F., O'Rourke, M., McLynn, C., Bjourson, A. J., McClean, S., Hirst, D., Rao, P., & Shaw, C. (2004). *Pachymedusa dacnicolor* tryptophyllin-1: Structural characterization, pharmacological activity and cloning of precursor cDNA. *Regulatory Peptides*, 117(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2003.08.004>
- Conlon, J. M. (2011). The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate

- immunity in anurans. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 343, Issue 1, pp. 201–212). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1014-4>
- Conlon, J. M., Guilhaudis, L., Attoub, S., Coquet, L., Leprince, J., Jouenne, T., & Mechkarska, M. (2023). Purification, Conformational Analysis and Cytotoxic Activities of Host-Defense Peptides from the Giant Gladiator Treefrog *Boana boans* (Hylidae: Hylinae). *Antibiotics*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071102>
- Conlon, J. M., Jouenne, T., Cosette, P., Cosquer, D., Vaudry, H., Taylor, C. K., & Abel, P. W. (2005). Bradykinin-related peptides and tryptophyllins in the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. *General and Comparative Endocrinology*, 143(2), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.04.006>
- Currie, T. L., Engler, M. M., Olsen, C. H., Krauthamer, V., Scott, J. M., Deuster, P. A., & Flagg, T. P. (2022). The Effects of Berry Extracts on Oxidative Stress in Cultured Cardiomyocytes and Microglial Cells: A Potential Cardioprotective and Neuroprotective Mechanism. *Molecules*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092789>
- de Sousa, N. A., Marani, M. M., Lopes, A. L. F., Silva, E. M., Barbosa, E. A., Vasconcelos, A. G., Kuzniewski, F. T. B., Lustosa, S. S., Gomes, K. P., Colugnati, D. B., Rocha, J. A., Santos, L. H., Benquerer, M. P., Quelemes, P., Vêras, L., Moreira, D. C., Gadelha, K. K. L., Magalhães, P. J. C., Plácido, A., ... Leite, J. R. S. A. (2022). BR-bombesin: a novel bombesin-related peptide from the skin secretion of the Chaco tree frog (*Boana raniceps*) with physiological gastric effects. *Amino Acids*, 54(5), 733–747. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03114-4>
- Duellman, W. E., Marion, A. B., & Hedges, S. B. (2016). Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, 4104(1), 1–109. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4104.1.1>
- Duellman, W. E., & Trueb, L. (1994). *Biology of amphibians* (2^o).
- Ellis-Steinborner, S. T., Scanlon, D., Musgrave, I. F., Tran, T. T. N., Hack, S., Wang, T., Abell, A. D., Tyler, M. J., & Bowie, J. H. (2011). An unusual kynurenine-containing opioid tetrapeptide from the skin gland secretion of the Australian red tree frog *Litoria rubella*. Sequence determination by electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(12), 1735–1740. <https://doi.org/10.1002/rcm.5041>
- Erspamer, V., Falconieri Erspamer, G., & Ceil, J. M. (1986). ACTIVE PEPTIDES IN THE SKINS OF TWO HUNDRED AND THIRTY AMERICAN AMPHIBIAN SPECIES. In *Biochem. Physiol. Vol. UC* (Issue I).
- Erspamer, V., Melchiorri, P., Falconieri Erspamer, G., Montecucchi, P. C., & de Castiglione, R. (1985). Phyllomedusa skin: A huge factory and store-house of a variety of active peptides. *Peptides*, 6(SUPPL. 3), 7–12. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90343-2](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90343-2)
- Ge, L., Lyu, P., Zhou, M., Zhang, H., Wan, Y., Li, B., Li, R., Wang, L., Chen, T., & Shaw, C. (2014). AcT-2: A novel myotropic and antimicrobial type 2 tryptophyllin from the skin secretion of the central American red-eyed leaf frog, *Agalychnis callidryas*. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/158546>
- Haddad, C. F. B. (2008). *Uma Análise da Lista Brasileira de Anfíbios Ameaçados de Extinção*.

- Hata Rasit, A., Amirah Md Sungif, N., Zainudin, R., Zulkarnaen, M., & Narihan, A. (2018). THE DISTRIBUTION AND AVERAGE SIZE OF GRANULAR GLAND IN POISONOUS ROCK FROG, *Odorrana hosii*. In *Malays. Appl. Biol* (Vol. 47, Issue 1).
- Huang, L., Chen, D., Wang, L., Lin, C., Ma, C., Xi, X., Chen, T., Shaw, C., & Zhou, M. (2017). Dermaseptin-PH: A Novel Peptide with Antimicrobial and Anticancer Activities from the Skin Secretion of the South American Orange-Legged Leaf Frog, *Pithecopus (Phyllomedusa) hypochondrialis*. *Molecules*, 22(10), 1805. <https://doi.org/10.3390/molecules22101805>
- Langsdorf, M., Ghassempour, A., Römpf, A., & Spengler, B. (2010). Characterization of a peptide family from the skin secretion of the middle east tree frog *Hyla savignyi* by composition-based de novo sequencing. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(19), 2885–2899. <https://doi.org/10.1002/rcm.4717>
- Leite, J. R. S. A., Brand, G. D., Silva, L. P., Kückelhaus, S. A. S., Bento, W. R. C., Araújo, A. L. T., Martins, G. R., Lazzari, A. M., & Bloch, C. (2008). Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 151(3), 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.03.016>
- Lima Hermes, C. (2013). *UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS AUTOMAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE OXIDAÇÃO DO NADPH PARA A MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE: DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE REFERÊNCIA E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LIPEMIA, HEMOGLOBINA E BILIRRUBINA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO.*
- Li, T., Li, L., Du, F., Sun, L., Shi, J., Long, M., & Chen, Z. (2021). Activity and Mechanism of Action of Antifungal Peptides from Microorganisms: A Review. *Molecules*, 26(11), 3438. <https://doi.org/10.3390/molecules26113438>
- Luiz, P., & Fontana, M. (n.d.). *DISSERTAÇÃO 2.*
- Montecucchi, P. C. (1985a). Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins. *Peptides*, 6(SUPPL. 3), 187–195. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90373-0](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90373-0)
- Montecucchi, P. C. (1985b). Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins. *Peptides*, 6(SUPPL. 3), 187–195. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90373-0](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90373-0)
- Morris, D., Khurasany, M., Nguyen, T., Kim, J., Guilford, F., Mehta, R., Gray, D., Saviola, B., & Venketaraman, V. (2013). Glutathione and infection. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1830, Issue 5, pp. 3329–3349). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.012>
- Neiva, M., Vargas, D. C., Conceição, K., Rádis-Baptista, G., Assakura, M. T., Jared, C., & Hayashi, M. A. F. (2013). Gene expression analysis by ESTs sequencing of the Brazilian frog *Phyllomedusa nordestina* skin glands. *Toxicon*, 61(1), 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.10.016>

- Nogueira, A., Brango-Vanegas, J., Vasconcelos, A. G., Coleone, A. P., Barbosa, É. A., Moreira, D. C., da Silva, M. da G., Cabral, W. F., Nascimento, J. D., Vinícius de Sousa França, J., Arcanjo, D. D. R., Lima, F. C. D. A., Batagin-Neto, A., Kückelhaus, S. A. S., Brand, G. D., Plácido, A., & Leite, J. R. S. A. (2025). Novel tryptophyllin peptides from *Physalaemus centralis* inhibit oxidative stress-induced endothelial dysfunction in rat aorta preparation. *Toxicon*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2025.108234>
- PERSEO, G., & DE CASTIGLIONE, R. (1984). Syntheses of tetra- and pentapeptides from skin extracts of *Phyllomedusa rhodei* (tryptophyllins). *International Journal of Peptide and Protein Research*, 24(2), 155–160. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1984.tb00941.x>
- Plácido, A., do Pais do Amaral, C., Teixeira, C., Nogueira, A., Brango-Vanegas, J., Alves Barbosa, E., C. Moreira, D., Silva-Carvalho, A., da Silva, M. da G., do Nascimento Dias, J., Albuquerque, P., Saldanha-Araújo, F., C. D. A. Lima, F., Batagin-Neto, A., Kuckelhaus, S., Bessa, L. J., Freitas, J., Dotto Brand, G., C. Santos, N., ... Eaton, P. (2022). Neuroprotective effects on microglia and insights into the structure–activity relationship of an antioxidant peptide isolated from *Pelophylax perezii*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(10), 2793–2807. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17292>
- Prates, I., Antoniazzi, M. M., Sciani, J. M., Pimenta, D. C., Toledo, L. F., Haddad, C. F. B., & Jared, C. (2012). Skin glands, poison and mimicry in dendrobatid and leptodactylid amphibians. *Journal of Morphology*, 273(3), 279–290. <https://doi.org/10.1002/jmor.11021>
- Pukala, T. L., Bowie, J. H., Maselli, V. M., Musgrave, I. F., & Tyler, M. J. (2006). Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: Structure and activity. In *Natural Product Reports* (Vol. 23, Issue 3, pp. 368–393). <https://doi.org/10.1039/b512118n>
- Renda, T., D'Este, L., Buffa, R., Usellini, L., Capella, C., Vaccaro, R., & Melchiorri, P. (1985). Tryptophyllin-like immunoreactivity in rat adenohypophysis. *Peptides*, 6(SUPPL. 3), 197–202. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90374-2](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90374-2)
- Reuber, D. R., & Brandão, A. (2008). *Taxonomia, distribuição geográfica potencial e conservação das espécies de Phyllomedusa do grupo Hypochobdrialis*.
- Samgina, T. Y., Gorshkov, V. A., Artemenko, K. A., Kovalev, S. V., Ogourtsov, S. V., Zubarev, R. A., & Lebedev, A. T. (2010). Novel natural peptides from *Hyla arborea schelkownikowi* skin secretion. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(12), 1749–1754. <https://doi.org/10.1002/rcm.4571>
- Samgina, T. Y., Kovalev, S. V., Gorshkov, V. A., Artemenko, K. A., Poljakov, N. B., & Lebedev, A. T. (2010). N-Terminal Tagging Strategy for De Novo Sequencing of Short Peptides by ESI-MS/MS and MALDI-MS/MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(1), 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.09.008>
- Scott, J. E., Quintarelli, G., & Dellovo, M. C. (n.d.). *Histochemie 4, 73-85 (1964) THE CHEMICAL AND HISTOCHEMICAL PROPERTIES OF ALCIAN BLUE I. THE MECHANISM OF ALCIAN BLUE STAINING**.
- Shi, D., Xi, X., Wang, L., Gao, Y., Ma, C., Chen, H., Zhou, M., Chen, T., & Shaw, C. (2016). Baltikinin: A new myotropic tryptophyllin-3 peptide isolated from the skin secretion of the purple-sided leaf frog, *Phyllomedusa baltea*. *Toxins*, 8(7), 1–10.

<https://doi.org/10.3390/toxins8070213>

- Simas, B., Co-Orientador:, M., Chaves Barreto, C., Beatriz, O. :, & Magalhães, S. (n.d.). *UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS GENÔMICAS E BIOTECNOLOGIA Mestrado TRANSCRIPTOMA DA DERME DE *Phyllomedusa distincta* Autora: Cláudia Sofia de Freitas Correia Popov BRASÍLIA 2012 Autora: Cláudia Popov.*
- Steinborner, S. T., Wabnitz, P. A., Bowie, J. H., & Tyler, M. J. (1996). The application of mass spectrometry to the study of evolutionary trends in amphibians. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(1), 92–95. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19960115\)10:1<92::AID-RCM443>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19960115)10:1<92::AID-RCM443>3.0.CO;2-3)
- Toledo, R. C., & Jared, C. (1995). Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 111(1), 1–29. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)98515-I](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)98515-I)
- Tran, T. T. N., Tran, D. P., Nguyen, T. M. A., Tran, T. H., Phan, N. N. A., Nguyen, V. C., Nguyen, V. T., & Bowie, J. H. (2022). Virtual screening and rational design of antioxidant peptides based on tryptophyllin L structures isolated from the *Litoria rubella* frog. *Journal of Peptide Science*, 28(4). <https://doi.org/10.1002/psc.3380>
- Tran, T. T. N., Tran, D. P., Nguyen, V. C., Tran, T. D. T., Bui, T. T. T., & Bowie, J. H. (2021). Antioxidant activities of major tryptophyllin L peptides: A joint investigation of Gaussian-based 3D-QSAR and radical scavenging experiments. *Journal of Peptide Science*, 27(4). <https://doi.org/10.1002/psc.3295>
- van Eck, N. J., & Waltman, L. (2010). Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics*, 84(2), 523–538. <https://doi.org/10.1007/s11192-009-0146-3>
- Vaz-Silva, W., Maciel, N. M., Nomura, F., Morais, A. R. de, Batista, V. G., Santos, D. L., Andrade, S. P., Oliveira, A. Â. B. de, Brandão, R. A., & Bastos, R. P. (2020). *Guia de identificação das espécies de anfíbios (Anura e Gymnophiona) do estado de Goiás e do Distrito Federal, Brasil Central*. Sociedade Brasileira de Zoologia. <https://doi.org/10.7476/9786587590011>
- Wang, L., Zhou, M., Chen, T., Walker, B., & Shaw, C. (2009). PdT-2: A novel myotropic Type-2 tryptophyllin from the skin secretion of the Mexican giant leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. *Peptides*, 30(8), 1557–1561. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.04.019>
- Wang, R., Chen, T., Zhou, M., Wang, L., & Shaw, C. (2013). PsT-1: A new tryptophyllin peptide from the skin secretion of Waxy Monkey Leaf Frog, *Phyllomedusa sauvagei*. *Regulatory Peptides*, 184, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2013.03.017>
- Wang, R., Lin, Y., Chen, T., Zhou, M., Wang, L., & Shaw, C. (2014). Molecular cloning of a novel tryptophyllin peptide from the skin of the orange-legged monkey frog, *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Chemical Biology and Drug Design*, 83(6), 731–740. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12287>
- Wang, R., Zhou, Y., Chen, T., Zhou, M., Wang, L., & Shaw, C. (2015). Identification and functional analysis of a novel tryptophyllin peptide from the skin of the red-eye leaf frog, *Agalychnis*

callidryas. *International Journal of Biological Sciences*, 11(2), 209–219.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.10143>

Warburg, M. R. (2000). (Warburg 2000) Cutaneous glands in the Australian hyliid. *Anat Embryol*.

Winzor, D. J. (2003). Analytical exclusion chromatography. In *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* (Vol. 56, Issues 1–3, pp. 15–52). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(03\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(03)00071-X)

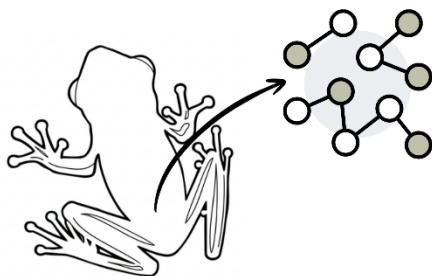
Wiraswati, H. L., Hangen, E., Belén Sanz, A., Lam, N.-V., Reinhardt, C., Sauvat, A., Mogha, A., Ortiz, A., Kroemer, G., & Modjtahedi, N. (2016). *Apoptosis inducing factor (AIF) mediates lethal redox stress induced by menadione* (Vol. 7, Issue 47).
www.impactjournals.com/oncotarget

Yokoyama, H., Kudo, N., Todate, M., Shimada, Y., Suzuki, M., & Tamura, K. (2018). Skin regeneration of amphibians: A novel model for skin regeneration as adults. *Development, Growth & Differentiation*, 60(6), 316–325. <https://doi.org/10.1111/dgd.12544>

Zugibe, F. T. (n.d.). *Positive periodic acid-Schiffstaining of acid mucopolysaccharides* (Vol. 2, Issue 1970).

CAPÍTULO II

ESTUDO EXPERIMENTAL : COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO, SÍNTESE PEPTÍDICA, ANÁLISE HISTOLÓGICA, ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E ANTIOXIDANTES



RESUMO

A família Phyllomedusidae tem recebido crescente atenção científica devido à diversidade molecular revelada nos estudos de peptídeos secretados por esses anfíbios. Neste trabalho, foram analisadas duas espécies, *Pithecopus oreades* e *P. azureus*, com o objetivo de realizar a caracterização histológica da pele e avaliar a atividade biológica do peptídeo PaT-2, pertencente à classe das triptofilinas. As análises histológicas evidenciaram um padrão glandular típico de anuros, com abundância de glândulas mucosas e serosas, sendo estas últimas significativamente maiores na região dorsal. Ensaio histoquímico confirmaram a presença de polissacarídeos e lipídios, reforçando a importância dessas secreções na fisiologia e nos mecanismos de defesa cutânea. Em estudos celulares, a menadiona foi utilizada como indutor de estresse oxidativo, enquanto o peptídeo PaT-2, sintetizado em laboratório, foi avaliado quanto ao seu potencial antioxidante. Os resultados demonstraram que PaT-2 não apresentou efeito citotóxico e atuou como modulador redox, reduzindo a formação de glutatona oxidada (GSSG) e evidenciando atividade antioxidante. Assim, o estudo mostra que PaT-2 possui potencial biotecnológico como candidato a novos agentes terapêuticos. Além disso, este trabalho apresenta a primeira descrição histológica da pele de *P. oreades*, trazendo contribuições inéditas para o conhecimento da morfologia e fisiologia dessa espécie.

Palavras-chave: triptofilinas; peptídeos bioativos; antioxidante; menadiona; anfíbios.

7. INTRODUÇÃO

7.1. Anfíbios

Os anfíbios representam um dos grupos mais diversificados de vertebrados, estando amplamente distribuídos em diferentes ecossistemas e desempenhando papéis fundamentais nos processos ecológicos (Duellman & Trueb, 1994). Esses animais são considerados bioindicadores de qualidade ambiental devido à elevada permeabilidade de sua pele e à dependência de condições específicas de temperatura e umidade, o que os torna particularmente sensíveis a alterações ambientais e à presença de poluentes (Haddad, 2008). Além disso, ocupam posições estratégicas nas cadeias alimentares: atuam como predadores, contribuindo para o controle populacional de insetos e outros invertebrados, e como presas de aves, répteis e mamíferos, garantindo a manutenção do equilíbrio ecológico.

Atualmente, o mundo conta com cerca de 8.859 espécies de anfíbios reconhecidas, e o Brasil abriga uma parcela significativa dessa diversidade, sendo um dos países com maior riqueza desse grupo (AmphibiaWeb, 2025). Essa diversidade elevada está relacionada à variedade de biomas brasileiros, como Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado, que oferecem micro-habitats e condições ambientais favoráveis à reprodução e sobrevivência das espécies.

Um dos aspectos mais marcantes da classe Amphibia é o ciclo de vida bifásico, que integra fases aquáticas e terrestres (Vaz-Silva et al., 2020). Nos anuros, essa transição é marcada pela metamorfose, um processo altamente complexo regulado por fatores hormonais (especialmente hormônios tireoidianos) e caracterizado por modificações morfofisiológicas profundas. Durante esse período, o organismo passa da forma larval — dotada de brânquias e adaptada à vida aquática — para a fase adulta, com pulmões, membros bem desenvolvidos e tegumento especializado para a respiração cutânea e o equilíbrio hídrico (Duellman & Trueb, 1994). Essa plasticidade de desenvolvimento é considerada um dos fatores que garantiram a ampla radiação adaptativa dos anfíbios, tornando-os um grupo-chave para o estudo da evolução, ecologia e fisiologia dos vertebrados.

7.2. Família Phyllomedusidae

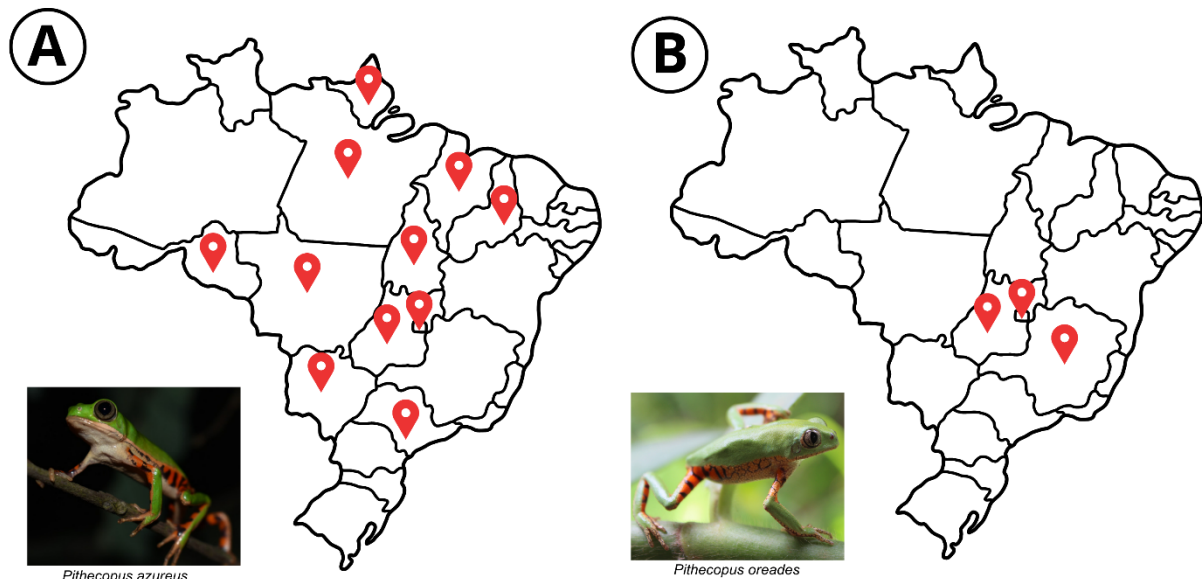
A família Phyllomedusidae, comumente conhecida como pererecas-de-folhagem é considerada uma das mais chamativas e carismáticas já vistas. Seu nome vem do grego Phyllos= folha e medusa = protetora, portanto “protetora da folhagem”, e remete, principalmente, a algumas características, como a sua coloração dorsal verde viva e seu hábito arborícola (Reuber & Brandão, 2008). Muitos pesquisadores têm dado certa atenção à família Phyllomedusidae, isso se deve porque os estudos feitos com as análises dos peptídeos secretado por esses anfíbios revelaram uma grande diversidade molecular, um dos papéis biológicos mais estudados desses peptídeos são as suas atividades antimicrobianas (Azevedo Calderon et al., 2011). Em algumas culturas, as espécies pertencentes ao gênero *Phyllomedusa* são bastante exploradas em rituais xamânicos para trazer sorte na caça. Os indígenas utilizam uma substância resinosa obtidos da pele desses animais para realizar seus ritos. Segundo a crença, essa substância intoxica os índios que a ingerem, o resultado é que algumas habilidades sensoriais são temporariamente mais aguçadas (Toledo & Jared, 1995)

7.3. *Pithecopus oreades* (Brandão, 2002) e *P. azureus* (Cope,1862)

A etimologia do nome Pithecopus é derivado do grego pithekodes, o que significa semelhante a um macaco (Duellman et al., 2016). *Pithecopus* Cope,1866 é o gênero de espécies de pererecas com características arborícolas que possuem polegares opositores especializados tanto para o uso em seu habitat quanto para o comportamento reprodutivo. Não possuem discos adesivos muito desenvolvidos (Caramaschi, 2006) e tendem a não ser ágeis e ao se movimentarem utilizam os dedos opositores para se agarrarem nos galhos (Duellman et al., 2016). Durante seu deslocamento em marcha lenta, as cores vivas presentes nos seus flancos são exibidas, provavelmente atuando como um mecanismo de defesa aposemático que está associado às toxinas da pele desses animais (Duellman & Trueb, 1994). Ambas espécies possuem semelhança no padrão de cores, possuindo uma coloração verde viva em todo o comprimento da parte dorsal e uma coloração alaranjada nos flancos, se estendendo às patas.

O período de reprodução dessas espécies tem um pico no começo das primeiras chuvas, se prolongando por três meses, aproximadamente (Vaz-Silva et al., 2020). Algumas espécies de *Pithecopus* são encontradas em áreas altas do cerrado e em pequenos poços margeados por mata de galeria, as chances de encontrar essa espécie são maiores em período reprodutivo, pois os machos vocalizam para atrair as fêmeas, e quando ocorre o amplexo a espécie deposita seus ovos embrulhando-os em uma folha com uma dobra semelhante à um charuto (Vaz-Silva et al., 2020).

Pithecopus oreades é uma espécie endêmica do Brasil, encontrada em áreas de altas altitudes, cerca de 900m, no bioma Cerrado (figura 5B). Sua distribuição abrange os Estados de Goiás, Minas Gerais e o Distrito Federal. Já *P. azureus* abrange o Leste da Colômbia, estendendo-se para Venezuela, pelas Guianas e pela Amazônia brasileira nos estados do Pará e Amapá, além de Mato Grosso, Goiás e Tocantins (figura 5A) (FROST, 2025).



7.4. Glândulas secretoras

As glândulas cutâneas dos anuros, ou rãs e sapos, são um componente fundamental de seu tegumento, desempenhando diversas funções vitais, incluindo proteção e regulação da hidratação (Duellman & Trueb, 1994). A estrutura da pele desses

animais é consistentemente composta por glândulas exócrinas especializadas (Yokoyama et al., 2018). Embora a pele da maioria das espécies tenha a mesma estrutura histológica básica, a presença ou ausência de certas glândulas é uma característica que varia e pode ser específica para cada espécie (Silva, 2017), além disso, há variações das superfícies das peles, que se adaptam de acordo com seu habitat, ou seja, quanto mais próximo ao ambiente terrestre, maior a complexidade na textura tegumentar. A coloração é determinada pelos cromatóforos e são adaptações extremamente importantes para algumas espécies, auxilia na camuflagem no meio ambiente, na procura de um parceiro para reprodução, e como aviso para os predadores (Duellman & Trueb, 1994).

Na pele de anfíbios adultos, o tegumento é composto por duas camadas firmemente conectadas: a epiderme e a derme (Silva, 2017). Além dessa estrutura básica, há dois tipos principais de glândulas secretoras na pele dos anfíbios: as glândulas mucosas e as glândulas serosas (ou granulares). As glândulas mucosas produzem um muco espesso, que é crucial para manter a superfície da pele úmida e protegida contra o ressecamento. Já as glândulas serosas secretam um fluido aquoso com substâncias nocivas, servindo como um mecanismo de defesa química (Toledo & Jared, 1995). Essas toxinas além de afastar seus predadores, secretam peptídeos antimicrobianos e antifúngicos que impedem a proliferação de microorganismos que poderiam causar diversos danos à pele desses animais, principalmente por ser uma superfície altamente úmida (Conlon, 2011). Entretanto, dependendo da espécie, há variações na disposição, quantidade e tipo de substâncias secretadas por essas glândulas. Um estudo comparativo de Prates et al. (2012) sobre a distribuição e morfologia das glândulas e veneno em *Ameerega picta* e *Leptodactylus lineatus* mostrou diferenças significativas no arranjo e tamanho das glândulas, bem como nas secreções. Isso evidencia que as duas espécies fazem uso de defesas químicas de maneiras distintas, adaptando-se de forma única a seus respectivos ambientes e necessidades de sobrevivência.

7.5. Anfíbios e seus compostos bioativos

Os anfíbios constituem uma das fontes mais relevantes de moléculas bioativas na natureza, em especial devido à complexidade química das secreções produzidas por suas glândulas cutâneas. Essas secreções exercem funções essenciais de defesa,

atuando contra predadores e microrganismos patogênicos, e representam um verdadeiro reservatório de compostos de interesse farmacológico (Toledo & Jared, 1995). Entre tais moléculas, os peptídeos bioativos têm recebido atenção especial por apresentarem uma ampla gama de atividades biológicas com potencial aplicação em saúde humana, animal e em biotecnologia.

Souza et al. (2022), ao estudarem a pele de *Boana raniceps*, identificaram a biomolécula BR-Bombesina, com potenciais aplicações nas atividades gastrointestinais, abrindo perspectivas para uso em terapias regulatórias. De forma semelhante, Leite et al. (2008) descreveram a ação antimicrobiana e bactericida de peptídeos derivados da pele de *Phyllomedusa oreades* e *Phyllomedusa distincta*, destacando sua aplicabilidade no tratamento da mastite bovina, um problema de grande impacto na pecuária leiteira.

Além desses casos, outros estudos clássicos relatam moléculas como as dermaseptinas, isoladas de espécies de *Phyllomedusa*, reconhecidas por sua potente atividade contra bactérias, fungos e parasitas; as magaininas, descobertas em *Xenopus laevis*, que apresentam propriedades antimicrobianas e citotóxicas; e as triptofilinas, caracterizadas pela presença de resíduos de triptofano e associadas a efeitos neuromodulatórios, antioxidantes e regulatórios. Também são descritos peptídeos com propriedades opioides e miotrópicas, demonstrando a diversidade funcional dessas secreções.

Dessa forma, evidencia-se que os anfíbios não apenas desempenham papéis fundamentais nos ecossistemas, mas também constituem uma rica fonte de biomoléculas inovadoras, com grande potencial para a descoberta de novos agentes terapêuticos aplicáveis no combate a infecções, na modulação de processos fisiológicos e até mesmo no desenvolvimento de candidatos para doenças inflamatórias e câncer.

7.6. Triptofilinas

As triptofilinas (TPHs) constituem uma família de peptídeos pequenos, geralmente compostos por 5 a 13 resíduos de aminoácidos, contendo frequentemente prolina e

triptofano em sua estrutura. Esses peptídeos foram inicialmente isolados a partir de secreções cutâneas de anuros (Ge et al., 2014).

Embora tenham sido descritas há mais de duas décadas, as funções fisiológicas das triptofilinas permaneceram pouco esclarecidas durante muitos anos (Ge et al., 2014). No entanto, o avanço das pesquisas revelou novas perspectivas, ampliando o interesse sobre esses peptídeos, sobretudo na área da biotecnologia, onde vêm sendo reconhecidos como candidatos promissores para aplicações terapêuticas e farmacológicas.

7.7. PaT-2

O PaT-2 é um peptídeo produzido pelo anfíbio do gênero *Pithecopus*, pertencente ao grupo das Triptofilinas do grupo 2, essas características dão origem ao seu nome. Em seu trabalho, Barbosa et al (2021) observaram que o PaT-2 é o primeiro peptídeo produzido pela espécie *P. azureus* no momento de transição da água para o ambiente terrestre, e que, portanto, se torna uma molécula de interesse, uma vez que os anfíbios secretam substâncias importantes para proteção contra estresses bióticos e abióticos (Barbosa et al., 2021). Foi analisado o efeito neuroprotetor das triptofilinas em células de mamíferos, demonstrando sua capacidade de inibir o estresse oxidativo dessas células. Essas descobertas despertam o alerta para possível produção de fármacos que inibam os radicais livres (ROS) e potencial aplicação em humanos com foco em várias doenças degenerativas, como o Alzheimer (Barbosa et al., 2021).

8. OBJETIVOS

8.1. Geral

O presente estudo foi estruturado para caracterizar as glândulas na pele desses anfíbios, sintetizar e avaliar a atividade biológica das triptofilinas encontradas na secreção cutânea de anfíbios do Cerrado brasileiro.

8.2. Objetivos específicos

- Síntese do peptídeo bioativos PaT-2;
- Identificação das triptofilinas por LC-MS/MS;
- Citotoxicidade e ensaios antioxidantes;
- Coleta de material biológico em campo;
- Histologia da pele dos anfíbios estudados.

9. MATERIAL E MÉTODOS

9.1. Síntese do peptídeo PaT-2

O peptídeo foi sintetizado manualmente por meio do método de síntese em fase sólida, conforme protocolo padronizado no Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas – LSAB da Universidade de Brasília (figura 6).

Há diferentes estratégias para a síntese de peptídeos em fase sólida, no entanto adotamos a estratégia Fmoc, que tem a função proteção do grupo amino, e, para que ocorra o acoplamento, esse grupo deve ser removido na etapa anterior.

Os derivados de aminoácidos utilizados foram: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Phe-OH.

Para a síntese, foram utilizados 242,3 mg de resina. A desproteção foi realizada com uma solução de 4-metilpiperidina, em dois banhos sucessivos, cada um com agitação de 15 minutos, visando a remoção do grupo Fmoc. A resina foi lavada com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM) em três ciclos alternados de 2 mL cada.

Para o teste de desproteção, foram adicionadas 3 gotas das seguintes soluções: KCN (2% em piridina), fenol a 80% em etanol e ninidrina em etanol. A confirmação da desproteção foi realizada pela observação de alterações na coloração da resina; a presença de uma coloração azulada indicou um resultado positivo para a desproteção, permitindo assim a continuidade das reações de acoplamento.

Para a reação de acoplamento, foram utilizados 85,3 mg de Oxyma Pure, que foi dissolvido em uma solução de dimetilformamida (DMF) até completa solubilização do reagente. Em seguida, foram adicionados 93 µL de diisopropilcarbodiimida (DIC), e a mistura foi mantida em agitação por 1 hora e 30 minutos.

9.2. Clivagem do peptídeo

Durante a clivagem ocorre o rompimento da ligação peptídica e a resina, portanto adicionou-se uma mistura de reagentes ao recipiente de reação, composta por 8,25 mL de ácido trifluoroacético (TFA), 0,50 mL de fenol, 0,5 mL de água ultrapura (mili-Q), 0,5 mL de tioanisol e 0,25 mL de etanoditiol (EDT), e foi realizado o teste de

desproteção. O TFA e os demais solventes foram evaporados por borbulhamento com argônio, e a precipitação do peptídeo foi realizada em éter diisopropílico. Em seguida, o peptídeo foi extraído com uma mistura de água e acetonitrila na proporção de 1:1. As soluções contendo o peptídeo sintético foram coletadas, congeladas e submetidas à liofilização.

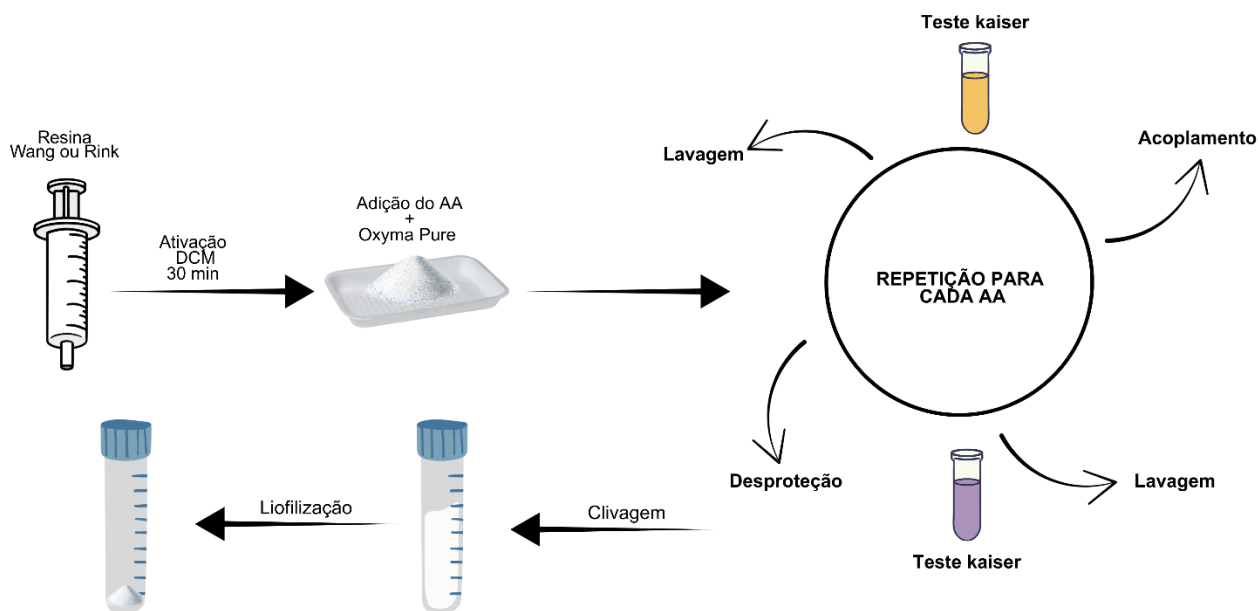


Figura 6. Síntese do peptídeo PaT-2 (FPPWL) pelo método FMOC. O esquema ilustra as etapas da síntese em fase sólida, que se inicia com a adição da resina como suporte. Em cada ciclo, realiza-se a desproteção do grupo Fmoc, seguida da verificação pelo teste de Kaiser, que apresenta coloração azul/violeta (positivo, presença amina livre). Após a confirmação da desproteção, procede-se ao acoplamento do aminoácido com auxílio do agente de acoplamento (Oxyma Pure). O sucesso do acoplamento é novamente verificado pelo teste de Kaiser, que deve resultar em incolor/amarelado (acomplamento completo). Ao final de todos os acoplamentos, o peptídeo é clivado da resina e posteriormente liofilizado.

9.3. Purificação do peptídeo

O peptídeo foi purificado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa, utilizando um equipamento da Shimadzu Corporation. Alíquotas individualizadas da síntese liofilizada foram solubilizadas em água deionizada (Mili-Q) e acetonitrila. As purificações foram realizadas com uma coluna C18 (250 mm x 10 mm, 5 µm), a um fluxo de 10 mL/min, empregando um gradiente de eluição de acetonitrila que variou de 5 a 95% ao longo de 60 minutos. A detecção foi realizada por meio da absorção UV a 216 nm e 280 nm, o que é indicativo de ligações peptídicas, e as amostras foram coletadas manualmente e posteriormente liofilizadas (figura 7).

9.4. Caracterização do peptídeo por espectrometria de massa

Após a purificação o peptídeo foi caracterizado por espectrometria de massa acoplada a um cromatógrafo líquido (LC-MS) e análise dos fragmentos gerados (LC-MS/MS) com o objetivo de confirmar a identidade do peptídeo e garantir que a sequência de aminoácidos corresponde à sequência planejada.

Para isso, uma pequena quantidade de amostra do peptídeo liofilizado foi dissolvida em 1mL de uma solução de metanol com 0,1% de ácido fórmico e após a completa diluição, foi realizado a leitura no equipamento. O espectrômetro foi regulado no modo positivo e utilizou-se o modo de aquisição IDA (Information Dependent Acquisition). Esse modo combina uma abordagem de aquisição de dados que depende de informações prévias, facilitando e otimizando a coleta de espectros de massa de fragmentos.

Os experimentos foram conduzidos na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília (CAIQ – UnB) e utilizou-se um espectrômetro de alta resolução TripleTOF 5600+ (Sciex, Ontário, Canadá), que conta com uma fonte de ionização por electrospray (ESI – Electrospray Ionization), um sistema de separação de íons do tipo triplo quadrupolo, uma célula de colisão para fragmentação em gás inerte e um analisador de massas por tempo de voo (TOF – Time of Flight). O equipamento está integrado a um cromatógrafo líquido (Eksigent UltraLC 100, Sciex) equipado com sistema de injeção automática de amostras, operando com uma vazão constante de 0,3 mL/min. Os espectros de massa gerados foram analisados e processados com o software PeakView v2.1, enquanto os espectros de fragmentação (MS/MS) foram interpretados com a ferramenta online Interactive Peptide Spectral Annotator [1].

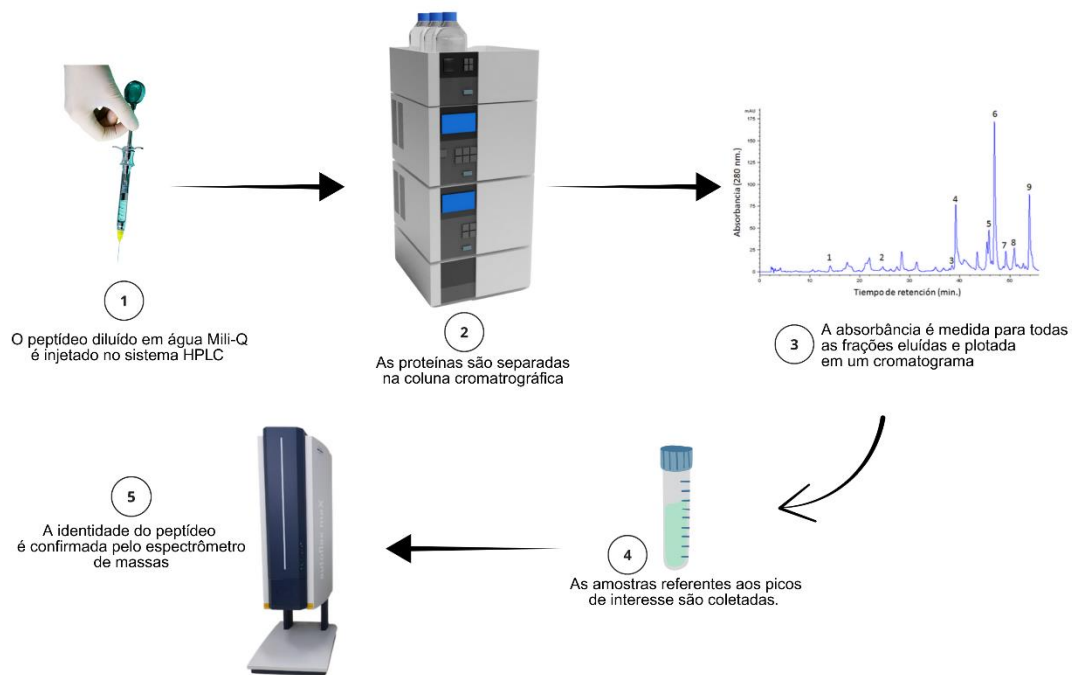


Figura 7. Esquema da purificação e caracterização do peptídeo. O peptídeo é inicialmente diluído em água Milli-Q e injetado no sistema HPLC (1), onde ocorre a separação cromatográfica (2). A absorbância das espécies eluídas é monitorada e registrada em forma de cromatograma (3). Em seguida, as frações correspondentes aos picos de interesse são coletadas (4) e a identidade do peptídeo é confirmada por espectrometria de massas (MS) (5).

9.5. Células de estudo e Local de estudo

As células foram fornecidas pelo Laboratório de Virologia Molecular (ViroMol) da Universidade de Brasília, além de alguns espaços disponibilizados pelo Laboratório de Imunologia Celular (LIC) para a execução do experimento. A condução do experimento ocorreu no Núcleo de Pesquisa em Imunologia e Morfologia Aplicada (NuPMIA). Para este estudo, foram utilizadas células da linhagem BV2 (*Mus musculus*), conhecidas como micróglia, que apresentam características parcialmente aderentes.

9.6. Cultivo das células

As células BV2 foram cultivadas até alcançarem 70-80% de confluência em meio DMEM (Dulbecco Medium Eagle Modified), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 1% de uma solução antibiótica com estreptomicina e penicilina, e 1% de aminoácidos. O cultivo foi mantido em estufa úmida, a 37 °C e com 5% de CO₂.

A manutenção da confluência celular foi realizada periodicamente. Nessa fase, o meio de cultivo era removido, as células eram lavadas com 5 mL de PBS (Phosphate-

Buffered Saline) e 1 mL de tripsina era adicionado. A tripsinização ocorreu por 5 minutos a 37 °C. Para neutralizar a tripsina, foram utilizados 4 mL de DMEM, e o conteúdo foi centrifugado a 1500 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o pellet com as células foi ressuspensão em 5 mL de DMEM, onde a seguir a densidade celular foi calculada. As passagens foram feitas de acordo com o tamanho dos frascos: para frascos T25, a passagem foi de 200 mil células, enquanto para frascos T75, foi de 400 mil células, com a adição de 3 mL e 13 mL de DMEM, respectivamente.

9.7. Determinação da densidade celular

A contagem de células foi realizada na câmara de Neubauer, no microscópio com o objetivo de passar pela contagem apenas células viáveis. Para a contagem, uma pequena amostra de células (10 µl) junto com azul de tripan (50 µl) e PBS (40 µl) foram adicionados em um tubo eppendorf. Apresentando um fator de diluição de 1:1.

9.8. Preparação para o ensaio de viabilidade celular

Para o experimento, foram utilizadas microplacas de 96 poços, excluindo os poços das extremidades, totalizando 60. Baseando-se em estudos anteriores, recomenda-se a utilização de cerca de 5.000 células viáveis por poço. Após a contagem e o plaqueamento, foram adicionadas as células desejadas, juntamente com 200 µl de DMEM em cada poço, e as placas foram mantidas em estufa por 24 horas. A Menadiona foi empregada como agente estressor para os testes de viabilidade celular, sendo fornecida pelo laboratório NuPMIA (figura 8).

9.9. Ensaio de viabilidade celular

Foi preparada uma solução contendo 30 µl de menadiona (10 mM) em 1470 µl de DMEM, e as células foram tratadas com diferentes concentrações dessa solução por meio de uma diluição seriada de $\frac{1}{2}$, resultando em 8 concentrações (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56 µM), com 6 replicatas para cada uma. Para o controle positivo, foi adicionado DMSO (10%), enquanto o controle negativo consistiu em DMEM (120µl) (figura 8).

O AlamarBlue foi empregado como indicador de viabilidade celular, utilizando uma concentração final de 10 µg/mL. Em cada poço, foram adicionados 100 µl da solução de AlamarBlue, e as placas foram então incubadas em estufa por 4 horas.

A absorbância foi medida a 595 nm usando um leitor de microplacas SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, EUA).

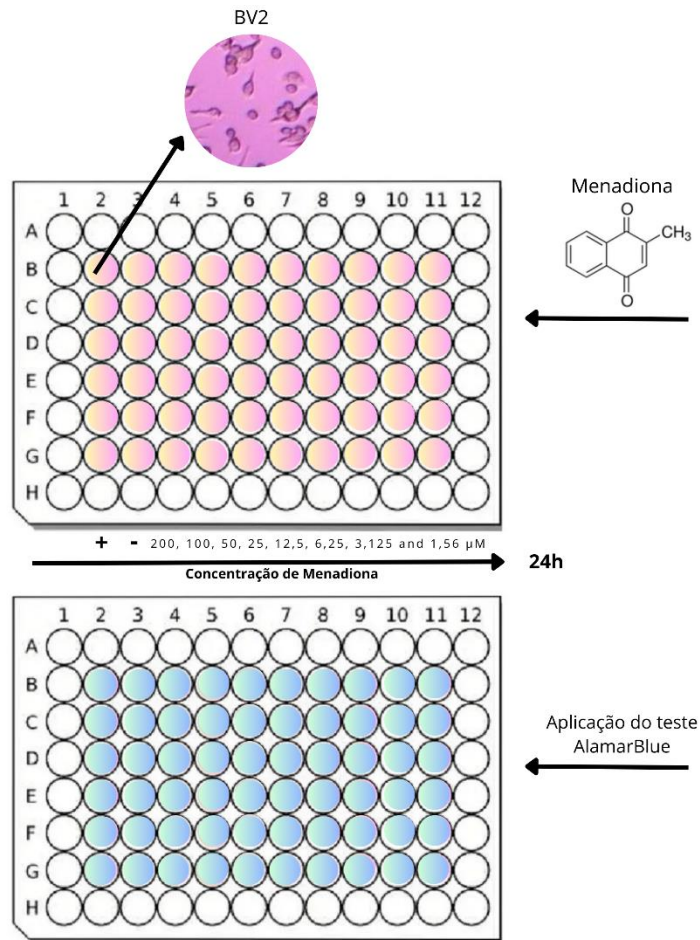


Figura 8. Ensaio de viabilidade celular em placas de 96 poços. Foram semeadas 5.000 células por poço, totalizando 60 poços utilizados no experimento. Após 24 horas de incubação, foi realizada a adição de menadiona em diferentes concentrações (200 µM a 1,56 µM). Em seguida, adicionou-se o reagente AlamarBlue, e a leitura da fluorescência foi efetuada 6 horas após a adição do reagente.

9.10. Ensaio para análise dos moduladores de glutathione (indicativo de estresse celular)

Após a avaliação da viabilidade celular com o agente estressor Menadiona, determinou-se uma concentração inibitória de 50% (IC₅₀). Essas concentrações foram

submetidas a novos testes para análise dos moduladores de glutathione. O metabolismo da glutathione foi analisado após exposição das células a $10\mu\text{M}$ de menadione durante 24h, com foco na Glutathione total (tGSH), glutathione reduzida (GSH), glutathione dissulfeto (GSSG) e na relação GSSG/tGSH.

Em placas de 6 poços, contendo 1.000.000 de células por poço, foram realizados dois tipos de tratamentos, com três repetições cada: 1 mL de Menadione ($10\mu\text{M}$) e 1 mL do meio DMEM por poço (figura 9A).

9.11. Preparação do material para a análise

Para a análise do estresse celular, foi realizada a preparação e a lavagem das células. O conteúdo dos poços foi submetido à tripsinização e transferido para tubos de microcentrifuga (Eppendorf) devidamente identificados. As células foram centrifugadas a 300 g por 5 minutos, sob temperatura de 4°C . O sobrenadante foi removido, e as células foram ressuspensas em 1 mL de solução salina fosfatada (PBS), repetindo-se esse procedimento por mais duas vezes. Ao término do processo, o sobrenadante foi completamente descartado, restando apenas o pellet celular, que foi armazenado a -19°C .

9.12. Preparação do estoque de peptídeo PaT-2

Após a purificação e liofilização, foi preparada uma solução estoque do peptídeo. Devido à presença de resíduos de triptofano na sequência do peptídeo, as concentrações foram determinadas para o comprimento de onda de 280 nm. A concentração foi medida experimentalmente utilizando o coeficiente de absorção molar do peptídeo, e essa concentração foi utilizada para ajustar o volume, a fim de alcançar $50\mu\text{M}$ por poço. A solução estoque foi esterilizada por filtração.

9.13. Atividade antioxidante e viabilidade celular do peptídeo

Para a avaliação das atividades antioxidantes do peptídeo, foram realizados dois experimentos, o primeiro, utilizando placas de cultura com 6 poços, cada um contendo 1.000.000 de células, com cada tratamento sendo realizado em duplicata. As células foram submetidas a quatro condições experimentais: controle (DMEM), tratamento com

Menadiona (10 μ M), tratamento com Peptídeo (50 μ M) e tratamento combinado de Menadiona e Peptídeo (figura 9B).

Já o segundo experimento, foi utilizado placas de 96 poços, desprezamos os poços das extremidades, resultando em 60 poços. Foi realizado diluições seriadas com concentrações iniciais de 100 μ M e final de 1,56 μ M de Menadiona. Foram analisadas quatro condições: controles (DMEM e DMSO), Menadiona e o tratamento combinado de Menadiona e Peptídeo (figura 9C).

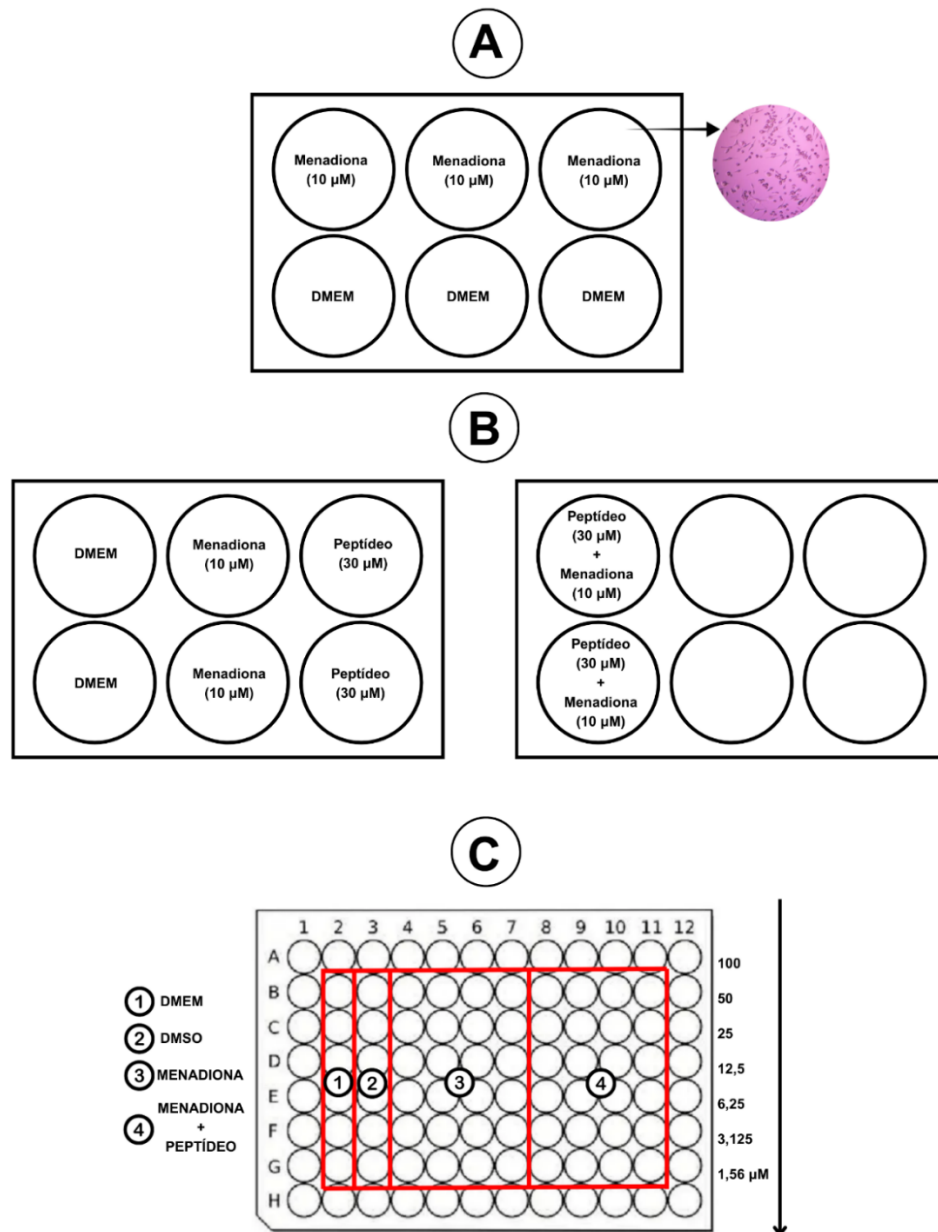


Figura 9. Ensaios realizados no presente estudo. **(A)** representa os ensaios realizados para avaliar os moduladores de Glutathiona. **(B)** atividade antioxidante do Peptídeo. **(C)** Viabilidade celular do peptídeo. Todos os experimentos foram

realizados com células BV2, com cerca de 5000 células por poço (em placas de 96 poços) e 1.10^6 (em placas de 6 poços). Em (C) as setas representam o sentido da diluição da Menadiona e os números o tipo de tratamento.

9.14. Análise estatísticas

Todas as análises estatísticas e os ajustes de curva foram realizados no R (R Foundation for Statistical Computing), utilizando o ambiente RStudio)

9.15. Local de estudo e coleta dos animais

Foi selecionado um local para a coleta das espécies, situado na Fazenda Água Limpa (FAL) da Universidade de Brasília, no Distrito Federal. A FAL está integrada à Área de Proteção Ambiental (APA) Gama Cabeça de Veado, que é considerada uma Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) e ocupa aproximadamente 4.500 hectares de Cerrado (IBRAM, 2018). As atividades de campo se iniciaram nos dias 1, 7 e 14 de março de 2024, com coletas posteriores realizadas em 26 de outubro de 2024, durante o período chuvoso no Cerrado. As atividades tinham início às 20 horas, e as buscas incluíam inspeções nas margens de cursos d'água. As espécies foram encontradas em poças artificiais e nas proximidades da trilha das Falésias (coordenadas 15°57'41.1"S 47°58'09.2"W), em riachos localizados em altitudes elevadas (coordenadas 15°58'39.1"S 47°56'44.0"W), além de poços na entrada da Fazenda (15°56'18.7"S 47°56'29.7"W). No total foram coletados 6 indivíduos, sendo 3 indivíduos de cada espécie.

Os animais foram coletados com a utilização de luvas nitrílicas e manipuladas de acordo com as regras do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA), sob licença número 31066-1/SISBIO. Após a captura, os indivíduos eram armazenados em tubos falcon de 50mL, cujas tampas foram perfuradas para permitir a entrada de oxigênio.

9.16. Eutanásia dos indivíduos

Os indivíduos foram eutanasiados usando uma solução de cloridrato de lidocaína líquida a 2% injetada diretamente no cérebro dos sapos adultos. Esse método apresenta um efeito rápido e confiável, não causando sofrimento para o animal, segundo a Resolução Normativa nº 37 de 15 de fevereiro de 2018, que traz as Diretrizes da prática

de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que diz:

“Pode-se ainda induzir a morte de anfíbios com uma injeção intra craniana - via forame magno – de anestésico local. Essa via de inoculação permite a imobilização e dessensibilização quase imediatamente após o término da inoculação. Devem ser utilizadas agulhas hipodérmicas 0,45x13 ou 0,38x13, similares as empregadas para administrar insulina. O procedimento requer adequada imobilização manual do animal. Para espécimes de maior porte podem ser necessárias duas pessoas para a contenção do animal. Introduce-se a agulha na linha sagital mediana, em ângulo de 45 graus através da pele que recobre a região atlanto-occipital, onde se encontra o forame magno. O volume de anestésico local varia 0,5 a 2 mL de acordo com o tamanho do animal.”

CONCEA, RN nº 37 de 15 de Fevereiro de 2018.

9.17. Dissecção da pele

Após a eutanásia e a confirmação do óbito dos seis indivíduos, houve a dissecção da pele com auxílio materiais de dissecção fabricado em aço inoxidável, com uma tesoura íris curva e uma pinça anatômica com serrilha. A pele de todos os indivíduos foi totalmente rebatida e destacadas nas seguintes regiões dos dorsos: dos membros anteriores, da cabeça, do tórax, inguinal e membros posteriores.

Para a análise histológica, foram processados dois (2) indivíduos de cada espécie (figura 10).

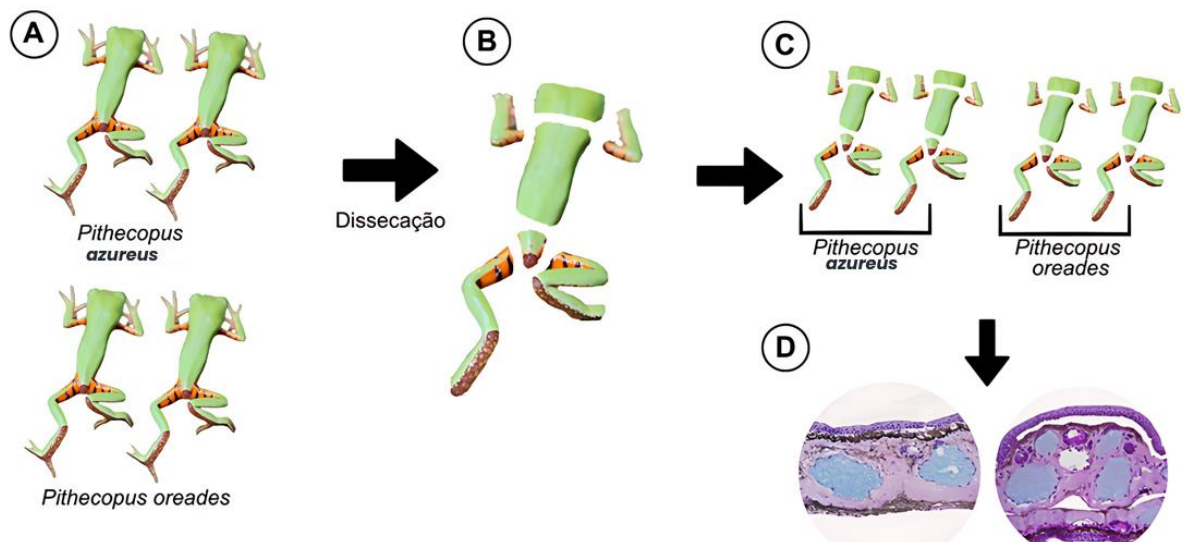


Figura 10. Separação dos tecidos para análises histológicas. (A). Indivíduo após a eutanásia. (B) A pele do indivíduo

após a dissecação. **(D)**. Separação das amostras para o processamento histológico. **(D)** Produção das lâminas evidenciando as glândulas.

9.18. Histologia da pele

Os materiais fixados foram submetidos ao processo de parafinização, que inclui as etapas de desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina. Inicialmente, as amostras foram lavadas com água destilada para remover o excesso do fixador. Em seguida, iniciou-se a fase de desidratação, conforme o protocolo estabelecido pelo Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada.

As amostras foram fixadas em Carnoy e seguiram diretamente a três banhos de álcool absoluto, também com duração de 1 hora em cada um, completando assim a fase de desidratação.

Para a diafanização, foi utilizado o óleo de côco, com três imersões de 1 hora em cada banho. Na etapa de inclusão, foram empregadas três soluções de parafina líquida, com a mesma duração por banho. Posteriormente, os fragmentos foram dispostos em moldes de inclusão, devidamente identificados com seus respectivos números.

Para a obtenção dos cortes, utilizou-se um micrótomo (Leica 2125RT, USA), ajustado para espessura de 5 µm. Os cortes foram colocados em um banho-maria, contendo água destilada, mantido em temperatura de 40 - 45°C. O material selecionado foi acondicionado em lâminas de vidro. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma estufa a 60 °C durante 1 hora para garantir a completa secagem e adesão dos cortes às lâminas e a retirada do excesso de parafina.

9.19. Coloração do material

Foram utilizados quatro tipos de colorações: hematoxilina e eosina (HE), ácido periódico de Schiff (do acrônimo *periodic acid Schiff* - PAS) e azul alciano em pH 1,0 e 2,5. Todas as colorações passaram pelas mesmas etapas iniciais, que incluem a desparafinização, realizada em três imersões de xilol, com duração de 5 minutos cada. Em seguida, foi realizada a hidratação em etanol em diferentes concentrações: 100% (5 minutos), 100% (30 segundos), 95% (30 segundos), 80% (30 segundos), 70% (5 minutos) e água destilada.

Para a coloração com hematoxilina e eosina (HE), as lâminas foram imersas em hematoxilina de Harris por 40 segundos, seguidas por lavagem em água corrente, uma imersão em álcool-ácido, lavagem em água corrente por 30 segundos, três mergulhos em água amoniacal a 4%, água corrente e, por fim, três mergulhos em água destilada. O material foi, então, submetido a uma solução de álcool 80% por 30 segundos e, em seguida, banhado em eosina por 2 minutos. A desidratação foi realizada com quatro banhos em álcool 100% (30 segundos cada), e as lâminas foram diafanizadas com três imersões em xilol, cada uma com duração de 30 segundos.

Para a histoquímica dos glicoconjugados, foram utilizadas as seguintes colorações: a PAS para a demonstração dos polissacarídeos neutros, coloração com alcian blue em pH 2,5 para a demonstração de polissacarídeos ácidos (carboxilados), e alcian blue em pH 1,0 para a demonstração de polissacarídeos sulfatados.

O Histokit da EasyPath diagnósticos, composto por quatro reagentes específicos, foi utilizado na preparação das colorações de PAS e Alcian Blue em pH 2,5. O protocolo inicial foi seguido normalmente, e, após a etapa de hidratação, as amostras foram imersas em água destilada por 1 minuto. Em seguida, os reagentes foram aplicados na seguinte sequência: reagente A (alcian blue pH 2,5) por 30 minutos, reagente B (ácido periódico) por 5 minutos, reagente C (PAS) por 10 minutos em câmara escura, e reagente D (hematoxilina de Harris) por 1 minuto. Entre a aplicação de cada reagente, as lâminas foram lavadas em água corrente por 1 minuto e secas cuidadosamente com papel toalha para remover o excesso de água.

10. RESULTADOS

10.1. Purificação do PaT-2

O gráfico evidencia um pico com elevada absorbância, sugestivo do PaT-2, com tempo de retenção de 25,642 minutos (figura 11). As frações correspondentes ao pico foram coletadas e em seguida analisadas por espectrometria de massas para a confirmação da síntese.

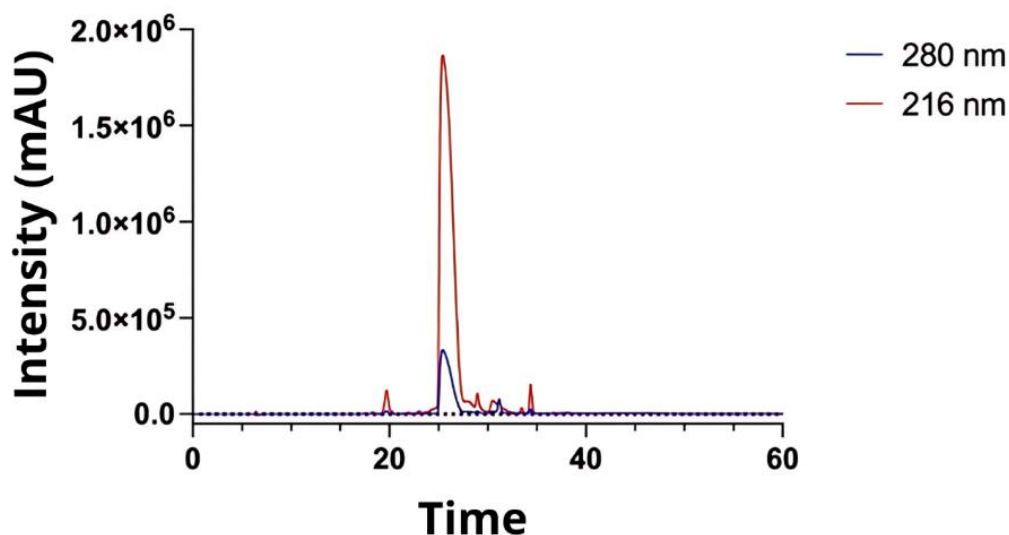


Figura 11. Gráfico obtido em HPLC resultado da purificação do PaT-2, apresentando uma fração única e proeminente. O pico aparece em um tempo de retenção de aproximadamente 25 minutos. A absorbância em 280nm está associada à presença de aminoácidos aromáticos (como triptofano), enquanto que 216nm está associada à ligação peptídica.

10.2. Análise por espectrometria de massa

As amostras obtidas a partir das cromatografias líquidas, correspondentes ao peptídeo PaT-2 purificado, foram analisadas por espectrometria de massa utilizando um equipamento ESI Q-ToF (Triple ToF 5600+). O objetivo foi confirmar o sucesso da síntese por meio da elucidação da sequência FPPWL-NH₂ (PaT-2), cuja massa teórica é $[M+H]^+ = 658,3716$ Da.

A molécula do PaT-2 foi identificada na forma monocarregada, apresentando uma massa experimental de $[M+H]^+ = 658,3717$ Da, acompanhada por sua série isotópica. O erro de massa foi calculado como apenas 0,152 ppm (figura 12).

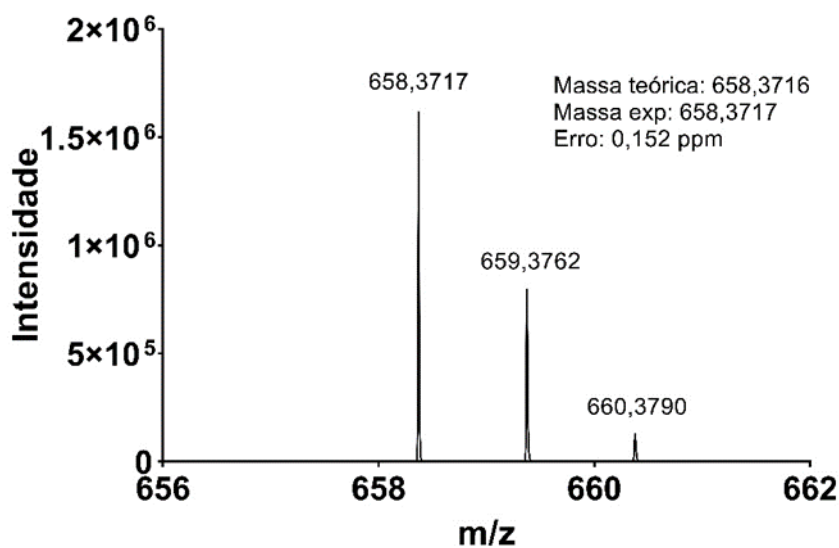


Figura 12. espectro de massa do PaT-2 $[M+H]^+ = 658,3716$ Da e sua série isotópica. A partir da massa teórica exata é possível calcular o erro de massa, com valor de 0,152 ppm.

Na figura 13, é apresentado o espectro de fragmentação do PaT-2, exibindo picos correspondentes às quebras de todas as ligações por meio das principais séries de fragmentação de peptídeos. Assim, os fragmentos identificados confirmam que as sequências foram sintetizadas corretamente e na ordem esperada.

O íon selecionado para a fragmentação foi escolhido automaticamente com base na pré-configuração do modo IDA (Information Dependent Acquisition). A análise evidenciou, principalmente, fragmentos pertencentes às séries a, b e y, conforme destacado nas figuras, com os respectivos erros de massa em ppm descritos nos quadros abaixo dos espectros. Os dados foram processados por meio da ferramenta online Interactive Peptide Spectral Annotator (figura 13).

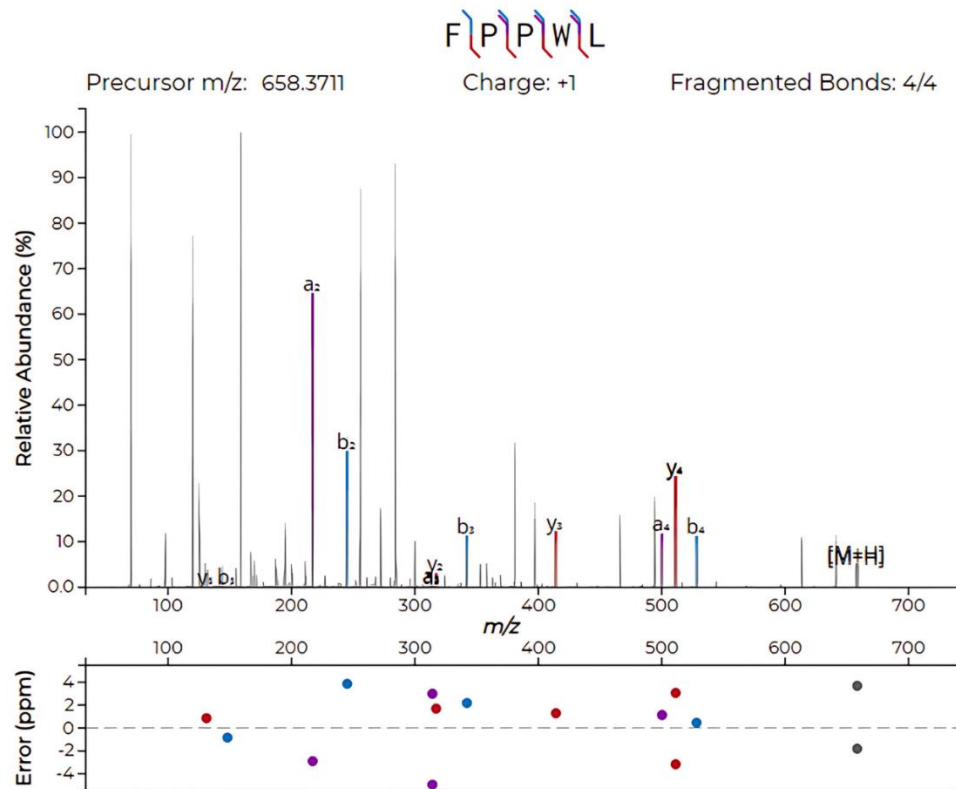


Figura 13: espectro de fragmentação (MS/MS) obtido em modo IDA do íon $[M+H]^+$. Os fragmentos obtidos a partir das séries estão destacados em roxo (série a), azul (série b) e vermelho (série y). O gráfico abaixo “Error (ppm)” evidencia cada fragmento detectado.

10.3. Morfologia celular e teste com Resazurina

Após a aplicação do teste de indicador de viabilidade celular (AlamarBlue) nas placas de 96 poços chegou-se ao seguinte resultado:

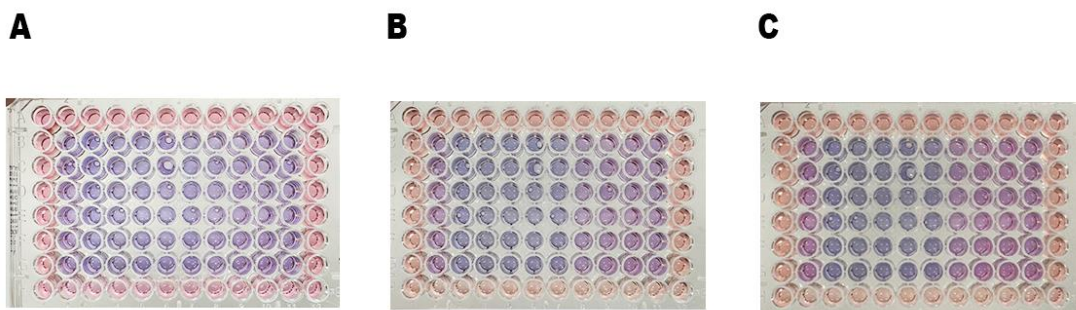


Figura 14. Tratamento com o indicador de viabilidade AlamarBlue. (A) representa o tratamento com 2 horas. (B) tratamento com 3 horas. (C) tratamento com 4 horas.

Os poços das extremidades apresentam uma cor rosa claro devido à solução contendo DMEM, onde não há presença de células. Os seguintes poços (a partir da coluna 02) encontra-se os controles contendo DMEM, DMSO e as diluições com o agente estressor Menadiona, respectivamente. Ao adicionar a solução rezazurina e analisar a mudança de cor, nota-se que na primeira coluna (2) há células metabolicamente viáveis (DMEM), na coluna 3, não houve alteração da cor, indicando ausência de células vivas (DMSO). A partir da coluna 4 a Menadiona mostrou-se ser citotóxica nas suas maiores concentrações, e conforme a concentração diminui, nota-se uma mudança gradiente de coloração de azul para rosa, indicando a presença de células metabolicamente viáveis (figura 14).

10.4. Gráfico IC50%: efeito da menadiona em BV2

Após a avaliação da viabilidade celular com o agente estressor Menadiona, determinou-se uma concentração inibitória de 50% (IC50) como sendo 11,2 μM . Esse valor representa a média de dois experimentos independentes (figura 15). No gráfico, a viabilidade celular está respresentada por uma escala de cores, ou seja, tons de rosa indicam maior quantidade de células metabolicamente ativas, enquanto tons de roxo ou azul indicam baixa ou nenhuma viabilidade celular.

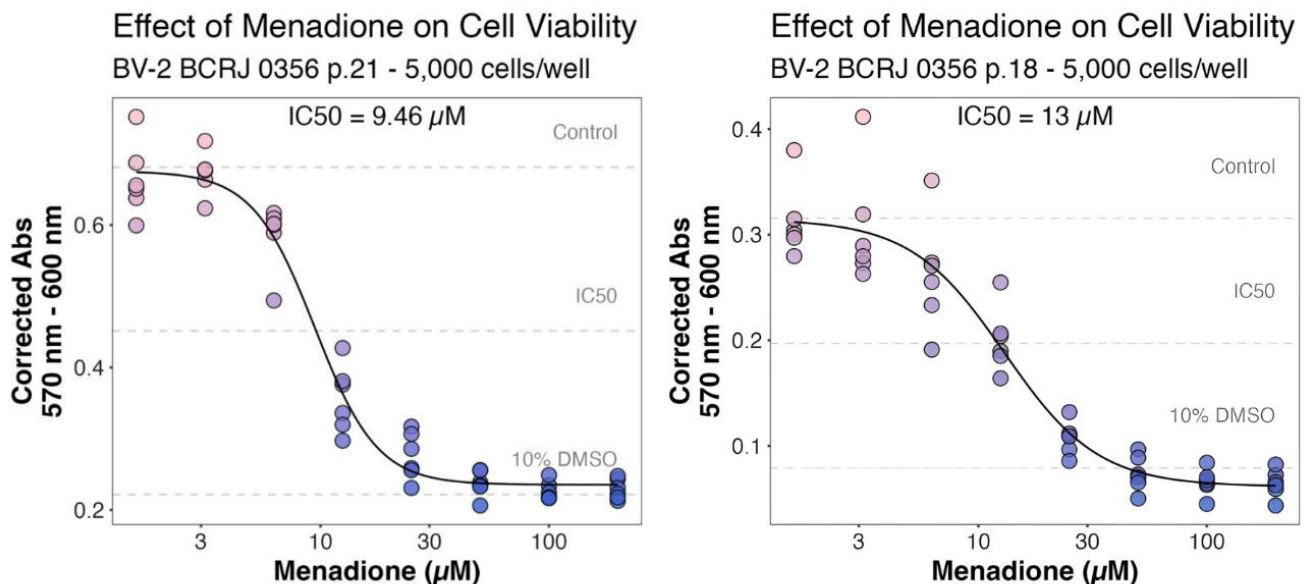


Figura 15. Efeito da menadiona na viabilidade celular. O gráfico determina o IC50% após o estresse celular (BV2) induzido pela menadiona, avaliado pelo ensaio de resazurina (10 $\mu\text{g/mL}$, 4 h de incubação). O tratamento durou 24 h

e foi iniciado 24 h após o plaqueamento. Os experimentos foram realizados em duplicata em células micróglias de camundongo, resultando em valores aproximados de IC50% (9,46 μ M e 13 μ M). O gráfico mostra a relação entre a absorbância e a concentração de menadiona, com as cores representando a viabilidade metabólica das células.

10.5. Análise dos moduladores de glutathione

Na concentração de 10 μ M, o tratamento com menadiona resultou em um aumento de 124% nos níveis de GSSG, de 0,487 para 1,09 nmol/mg de proteína, mudando a relação GSSG/tGSH para um estado mais oxidado, com um aumento de 2,54% para 3,78% (um aumento de 49%). Além disso, os níveis de GSH e tGSH aumentaram 53% e 54%, respectivamente, de 19,2 para 29,3 nmol/mg de proteína e de 19,7 para 30,4 nmol/mg de proteína (figura 16).

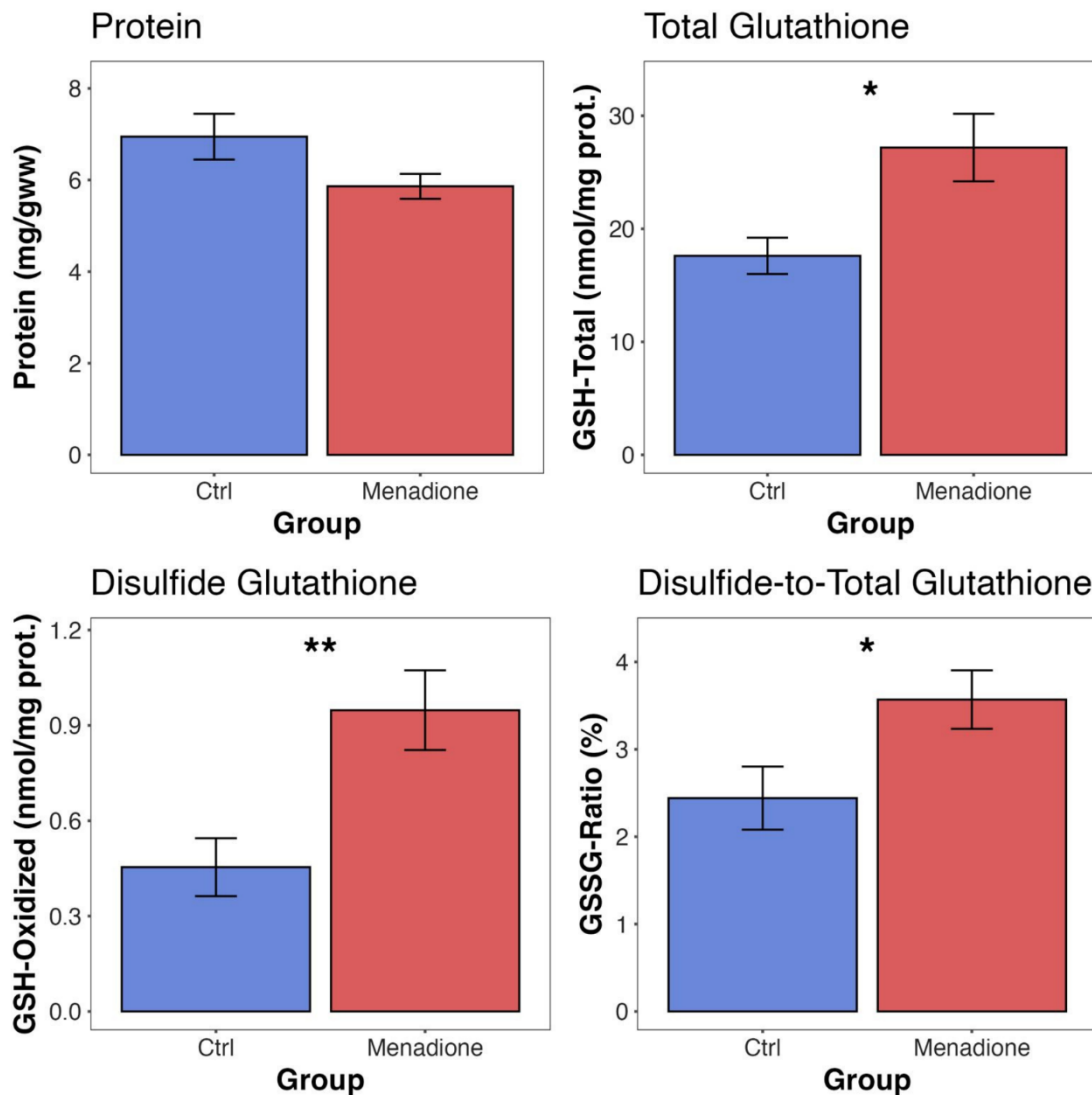


Figura 16. Efeitos moduladores do glutathione em células BV2 após indução com menadiona (10 μ M) (IC50%). A figura apresenta sequencialmente os níveis de proteína total, glutathione total (GSH-Total), glutathione oxidada (GSH-Oxidized)

e a razão entre glutathiona reduzida e oxidada (dissulfeto em relação à glutathiona total). As células controle estão representadas em azul, enquanto as células tratadas com menadiona (10 μ M) estão em vermelho. A significância estatística é indicada por asteriscos ($p < 0,05 = **$; $p < 0,01 = ****$).

Um novo teste foi conduzido com o objetivo de avaliar o aumento dos níveis glutathiona nas células quando expostas ao dobro de concentração de menadiona (figura 17). Assim como nos experimentos anteriores, foram analisados quatro parâmetros: quantidade de proteína presente nos grupos controle e tratados, a Glutathiona Total, Glutathiona oxidada e a razão da glutathiona reduzida e oxidada. Os grupos controle e tratamento com menadiona a 10 μ M, não foram observados alterações significativas no padrão de resposta em comparação com experimentos anteriores. Entretanto, o tratamento com 20 μ M apresentou um resultado muito abaixo do esperado, sugerindo uma possível morte celular causado pela sua alta concentração. Esse resultado indica que concentrações de menadiona acima do IC₅₀ podem exercer efeito citotóxico.

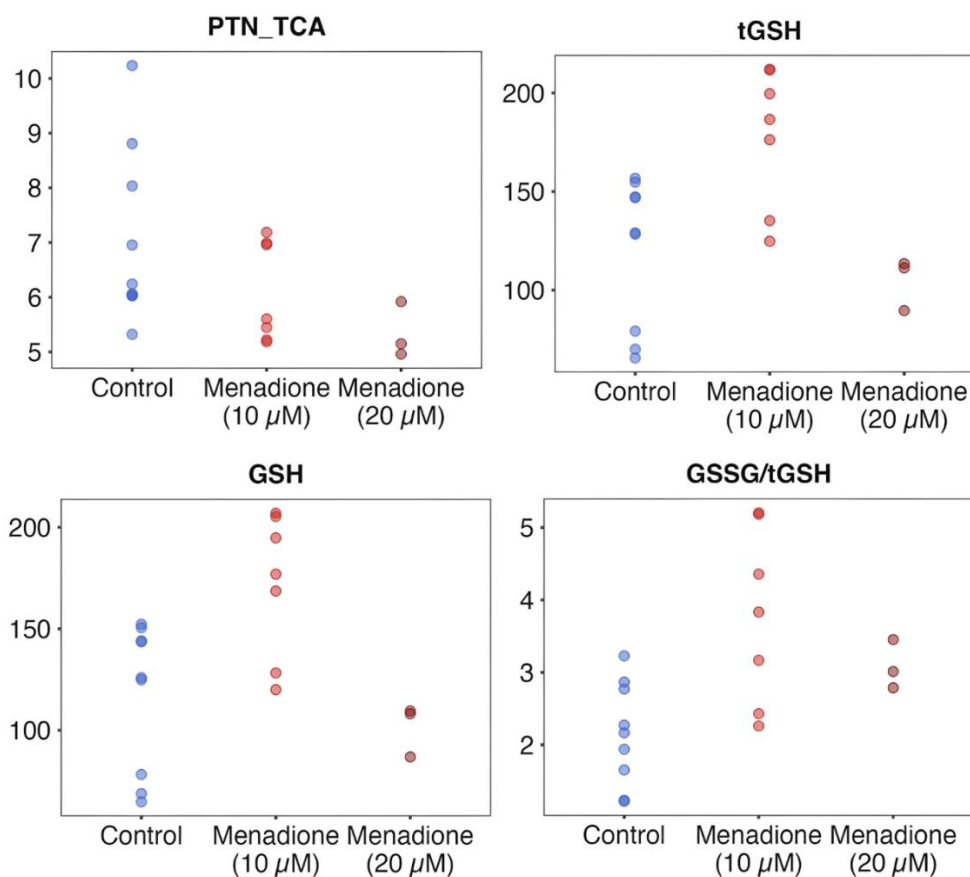


Figura 17. Análises dos efeitos de moduladores de glutathiona após exposição à menadiona em doses superiores à concentração de IC₅₀. Três grupos de tratamento foram avaliados: controle (círculos azuis), menadiona 10 μ M

(IC50%) (círculos vermelho-claro) e menadiona 20 μ M (círculos vermelho-escuro). Cada círculo representa um experimento independente. A análise por ANOVA não detectou diferenças significativas entre o grupo tratado com 20 μ M de menadiona e os demais grupos.

10.6. Análise morfológica das células BV2

Na análise morfológica, que foram obtidas por meio da observação em microscópio e de fotos (figura 18), foram analisadas alterações na morfologia celular conforme o tratamento recebido pelas células:

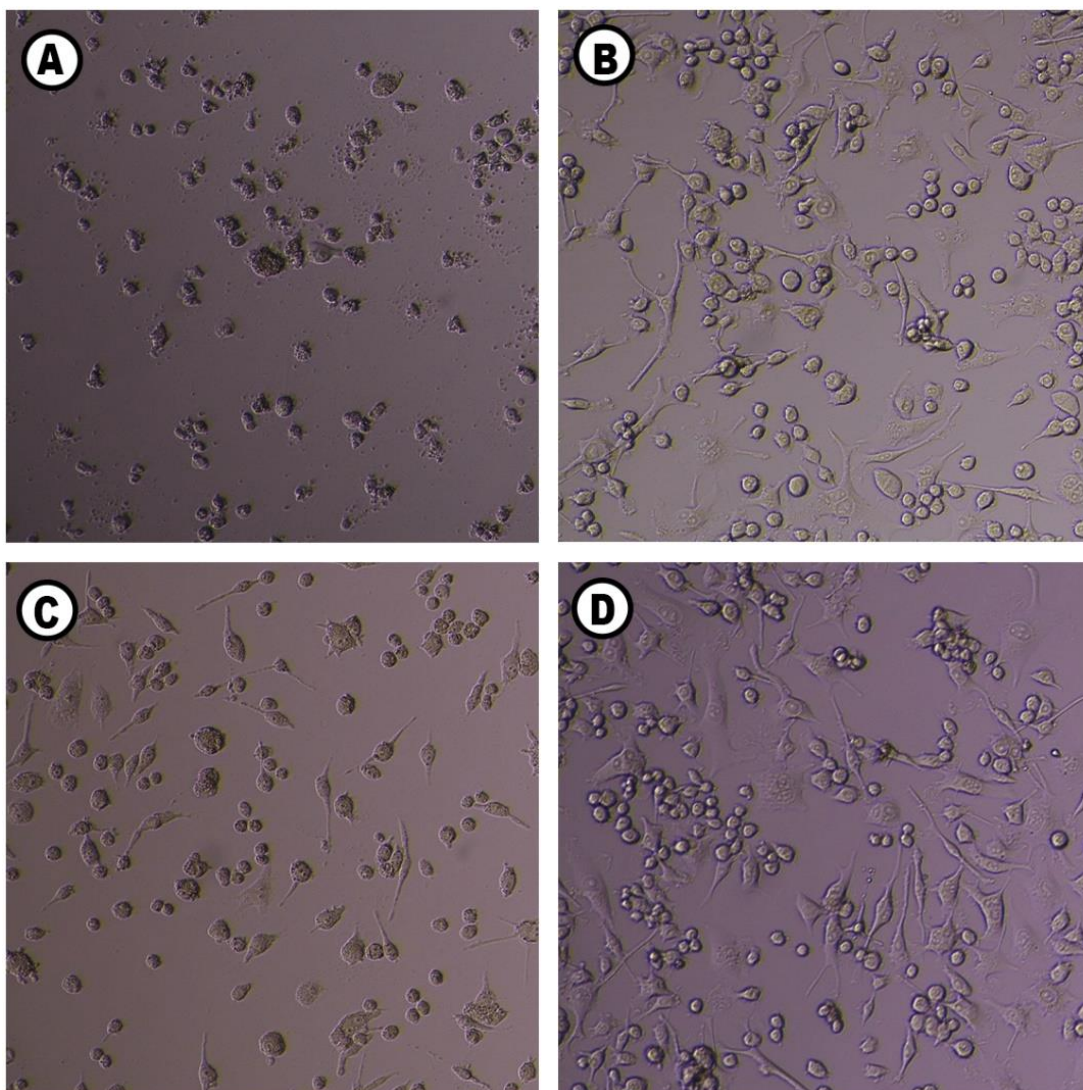


Figura 18. Alteração na morfologia celular conforme o tratamento recebido. **(A)** as células foram tratadas com DMSO. **(B)**, as células foram tratadas com DMEM, na **(C)** e **(D)** representa o tratamento com menadiona em sua maior para menor concentração. As imagens foram obtidas em aumento de 10x.

De acordo com o tratamento houve alteração da estrutura celular. Em tratamento com DMSO, observou-se a ruptura da membrana celular, acarretando a morte das células. Em tratamento com DMEM, a morfologia observada é a considerada comum, comparando com informações visuais obtidas pelas fontes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Na imagem C, nota-se uma alteração na parede celular, ela se apresenta em com uma cor escura e com alteração na parede celular. Indicando que houve um estresse celular devido à alta concentração de Menadiona. A última imagem, evidencia células próximas à morfologia comum dessa linhagem, indicando que a Menadiona apresentou pouco ou nenhuma atividade que interfira na sua morfologia.

10.7. Efeito do peptídeo (PaT-2) na viabilidade celular

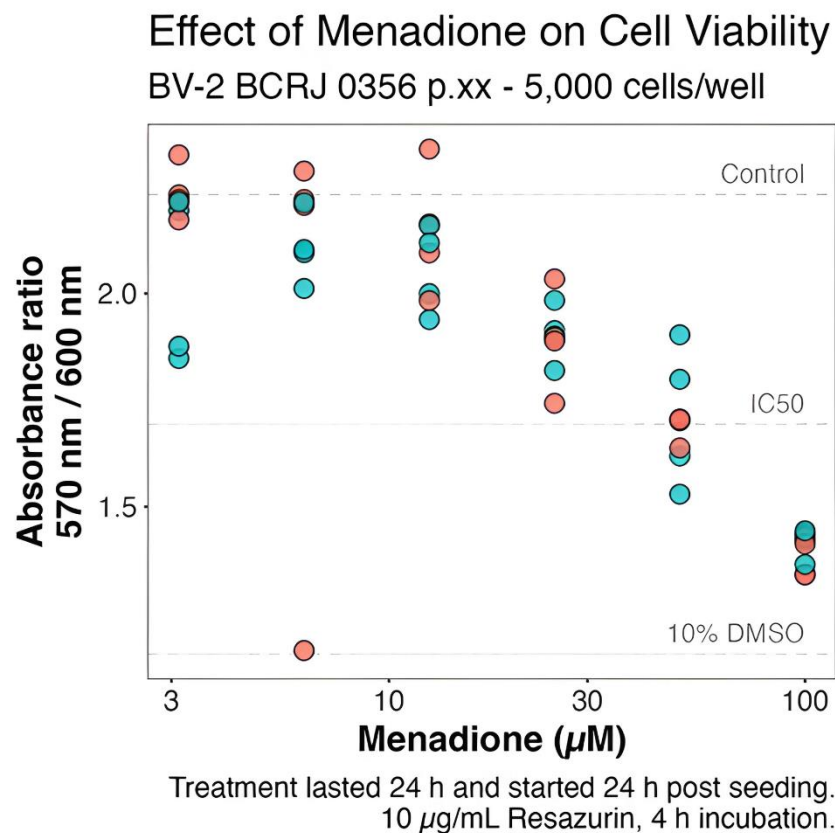


Figura 19. Efeito da menadiona na viabilidade celular de células BV-2. As células foram tratadas por 24 h com diferentes concentrações de menadiona (3–100 µM) e avaliadas pelo ensaio de resazurina (10 µg/mL, 4 h de incubação), que mensura a atividade metabólica celular. Os resultados demonstram uma redução progressiva e dose-dependente da viabilidade celular, evidenciada pela diminuição da absorbância. Cada ponto no gráfico representa a média de experimentos independentes realizados em duplicata, com barras de erro indicando o desvio padrão.

Em seguida, a análise de viabilidade celular comparativa entre os grupos tratados apenas com menadiona e aqueles tratados com peptídeo associado à menadiona demonstrou que não houve diferença na viabilidade celular ao longo de todas as concentrações testadas (3–100 μ M) (figura 19). Esses resultados indicam que, nas condições experimentais avaliadas, o peptídeo não exerce efeito protetor nem citotóxico adicional sobre as células, na medida de viabilidade celular.

10.8. Avaliação dos moduladores de glutathione em células tratadas com o peptídeo PaT-2

Os mesmos parâmetros de glutathione foram analisados, porém com a inclusão outros tratamentos às células: grupo controle, menadiona (10 μ M), PaT-2 e PaT-2+Menadiona (10 μ M). Esse experimento teve o objetivo de analisar a produção de glutathione e investigar o efeito antioxidante do peptídeo (figura 20).

O grupo controle e tratado apenas com menadiona, apresentaram resultados consistentes com os experimentos anteriores. O tratamento com o peptídeo isolado não alterou a síntese de glutathione, indicando que não há um efeito citotóxico. Já o tratamento combinado com o peptídeo e a menadiona não altera a viabilidade celular, mas há uma redução da oxidação da glutathione, o que sugere que o peptídeo suprimiu o efeito estressor da menadiona.

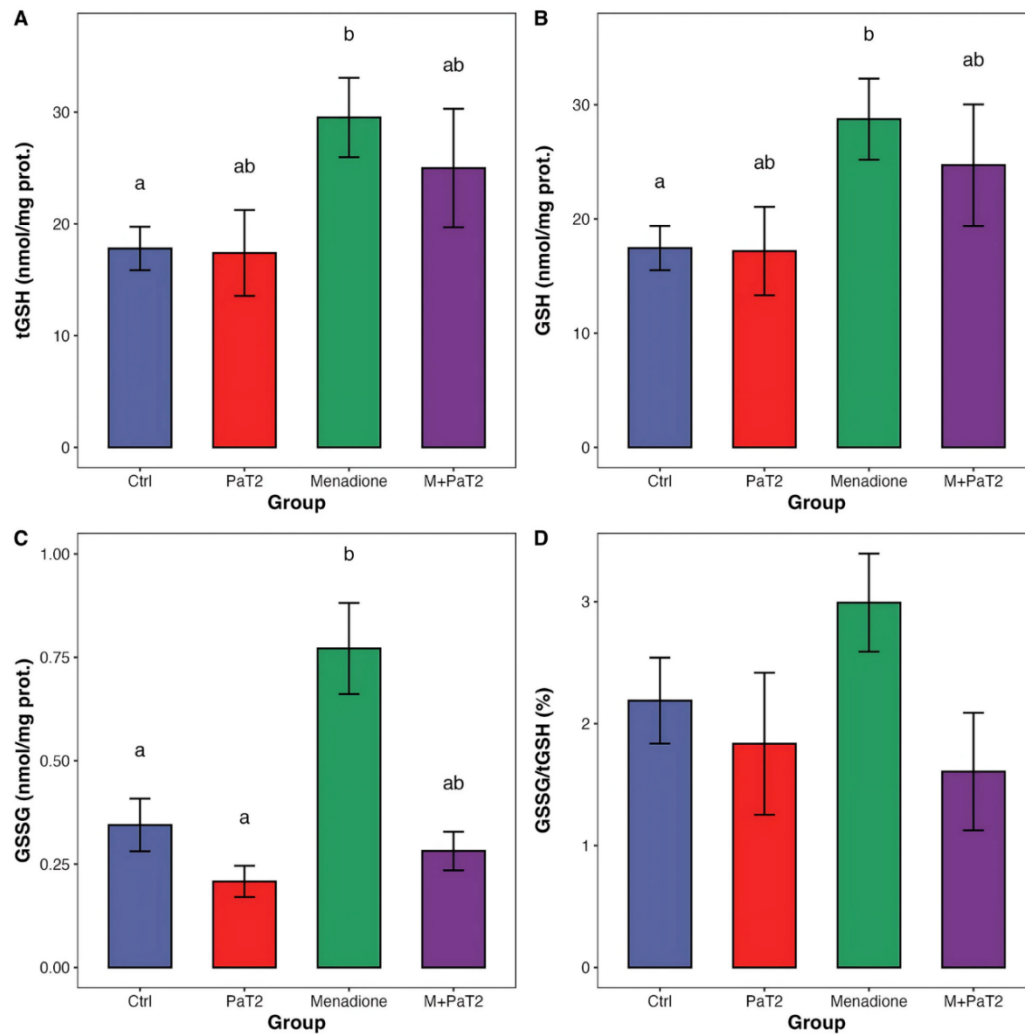


Figura 20. Efeitos do PaT-2 em parâmetros relacionados à glutatona em células tratadas com menadiona (BV2). (A) Glutatona total (tGSH), (B) Glutatona reduzida (GSH), (C) Glutatona oxidada (GSSG) e (D) Razão GSSG/GSH. Grupos analisados: controle (Ctrl), células tratadas com PaT-2, células tratadas com menadiona e células tratadas com menadiona + PaT-2 (M+PaT-2). Os valores representam a média $\pm$ distribuição dos dados experimentais. Diferenças significativas entre os grupos foram representadas por letras em formato de exibição compacta, onde grupos que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

10.9. Análise histológica do Tecido Epitelial de *P. azureus* e *P. Oreades*

A pele é formada por uma epiderme com células basais, queratinócitos e camada queratinizada. Na derme, observou-se uma camada papilar, composta de tecido conectivo frouxo com pequenas glândulas e cromatóforos; e a derme reticular, mais profunda, constituído por tecido conectivo denso não modelado com distribuição de fibras de colágeno e glândulas de maior porte (figura 21A). As glândulas estão conectadas com a camada mais externa do epitélio através de ductos, por onde secreta o conteúdo do interior das glândulas.

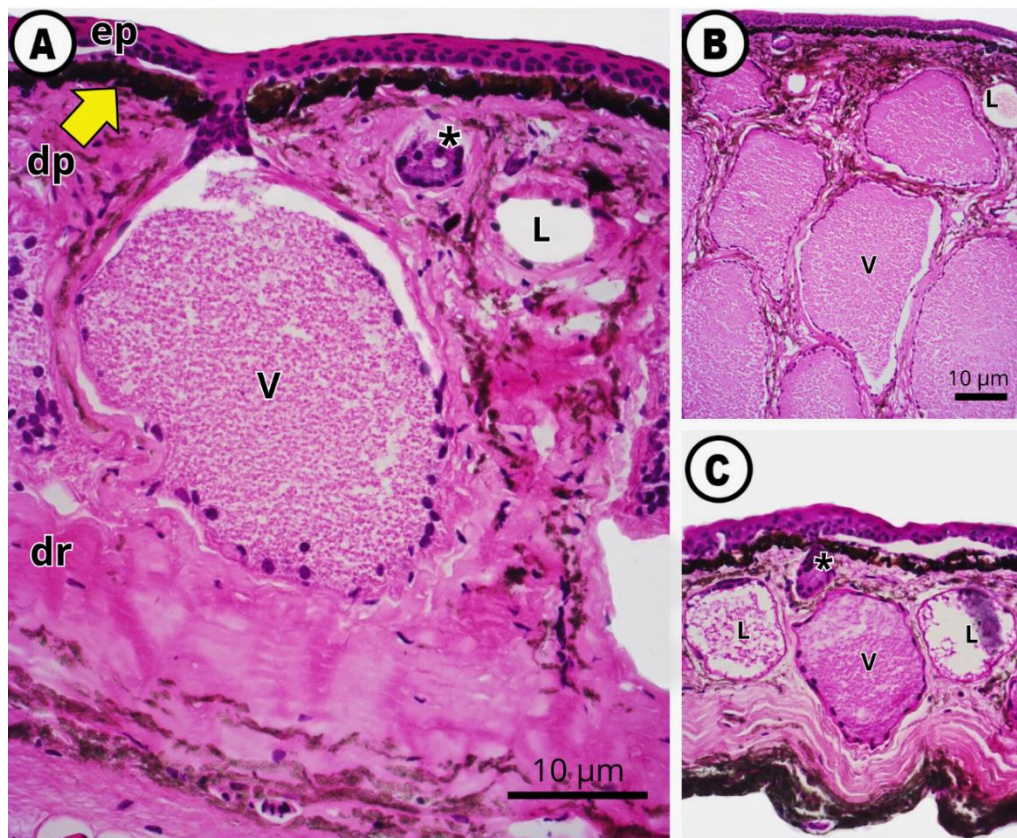


Figura 21. Caracterização morfológica da pele de *P. oreades*. **(A)** Região do dorso da cabeça evidenciando epiderme (ep), derme papilar (dp) e derme reticular (dr). Na derme papilar evidenciamos presença de cromatóforos (seta) e glândulas mucosas (*). Na derme reticular observamos a presença de glândulas granulares lipídicas (L) e glândulas granulares serosas (V) (de veneno). **(B)** Região do dorso do pescoço, evidenciando grande quantidade de glândulas granulares serosas (V). **(C)** Região do dorso do tórax, evidenciando a pele mais delgada com glândulas granulares serosas (V) de menor tamanho e mais esparsas. Barra = 10µm. Método utilizado: HE.

A análise histológica constatou a presença de três glândulas ao longo do tecido conectivo dos espécimes analisados: as mucosas, as granulares lipídicas e as granulares serosas as quais foram distinguidas tanto pela morfologia (figura 21) quanto por identificações histoquímica através dos métodos testados (figura 22). As glândulas mucosas estavam localizadas na derme papilar (figura 22A) e apresentavam forte afinidade ao PAS, indicando a presença de mucopolissacarídeos neutros (figura 22A). As glândulas granulares lipídicas apresentavam um tamanho médio e demonstraram uma leve reação positiva ao PAS (figura 22A). Já as glândulas granulares serosas (de veneno) diferiram entre si em sua forma e tamanho. Dependendo da região corporal, apresentavam dimensões diferenciadas. Na região dos dorsos da cabeça (figura 22A) e do tórax (figura 22B) apresentavam maior tamanho e número e aspecto alveolar. No

restante do corpo, apresentavam menores concentrações (figura 23). Uma fina camada de células mioepiteliais reveste as margens dessa glândula. As glândulas de veneno contém em seu interior pequenos grânulos que foram positivos para alcian blue pH 2,5 e 1, revelando a presença de polissacarídeos ácidos carboxilados (figura 22A) e sulfatados (figura 22B).

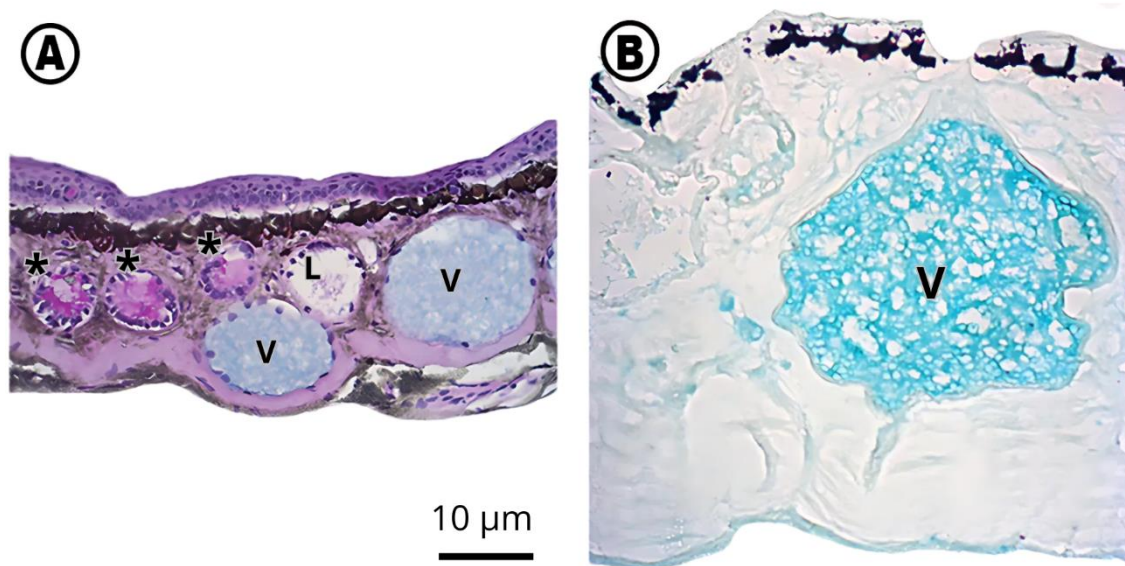


Figura 22. Caracterização histoquímica da pele de *P. oreades* e *P. azureus*. **(A)** Região do dorso da pata dianteira evidenciando e glândulas mucosas (*) positivas para PAS, glândulas granulares lipídicas (L) fracamente positivas para PAS e glândulas granulares serosas (de veneno) (V) positivas para azul de alcian 2,5. **(B)** Região inguinal dorsal, evidenciando glândula granular serosa (de veneno) (V) positiva para azul de alcian pH 1,0. Barra = 10 µm. Métodos utilizados: Alcian Blue ph 2,5 + PAS (A) e Alcian Blue ph 1,0 (B).

Por fim, a organização morfológica da pele de ambas as espécies foi semelhante. Entre as regiões analisadas, as glândulas serosas ocorreram predominantemente na região dorso do tórax, da cabeça e do pescoço (figura 23).

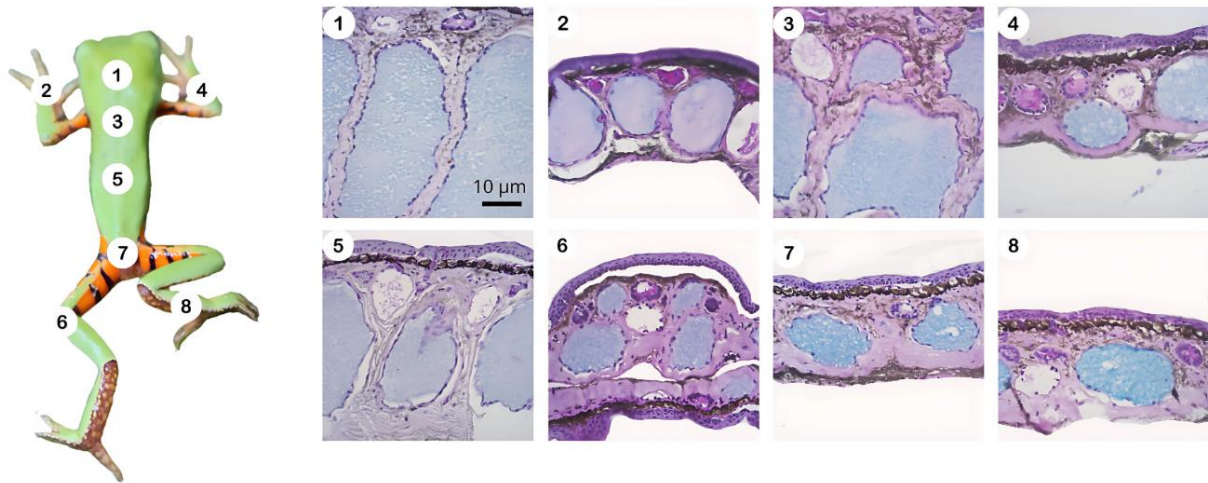


Figura 23. Distribuição das glândulas em diferentes regiões do corpo de *P. oreades*. As glândulas de veneno foram observadas nas regiões dorsais da cabeça (1), do pescoço (3) e do dorso (5), bem como nas demais áreas analisadas, incluindo os dorsos das patas dianteiras esquerda (2) e direita (4), região inguinal (7) e patas traseiras esquerda (6) e direita (8). Nessas diferentes regiões, as glândulas apresentaram variações quanto à disposição no tecido. Método utilizado: Alcian Blue pH 2,5 + PAS.

11. DISCUSSÃO

Na primeira parte da análise, foi investigado o papel da menadiona como indutor de estresse oxidativo. A menadiona, um análogo sintético da vitamina K3, é amplamente utilizada como modelo experimental para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), uma vez que sua estrutura quinônica favorece reações de oxirredução que desestabilizam o equilíbrio redox celular (Caricchio et al., 1999; Currie et al., 2022). No presente estudo, observou-se que concentrações elevadas de menadiona induziram alterações significativas na morfologia celular, com perda da integridade de membrana e sinais de apoptose, resultados que corroboram com a literatura (Wiraswati et al., 2016). A determinação do IC_{50} (11,2 μ M) para células BV2 demonstrou-se fundamental para estabelecer uma condição experimental que provoca estresse oxidativo sem levar à morte celular maciça, garantindo a reprodutibilidade dos ensaios subsequentes (Aykul & Martinez-Hackert, 2016).

A análise da razão GSH/GSSG revelou níveis elevados de glutathiona reduzida

(GSH), indicando resposta celular adaptativa frente ao insulto oxidativo, em linha com estudos prévios que descrevem a glutathione como um dos principais mecanismos de defesa celular contra EROs (Biswas & Rahman, 2009; Morris et al., 2013; Vašková et al., 2023). Essa resposta confirma a caracterização da menadiona como um modelo robusto de indução de estresse oxidativo em microglias murinas.

O foco central deste trabalho, no entanto, foi a avaliação da atividade antioxidante do peptídeo PaT-2. A síntese e validação estrutural do PaT-2 confirmaram a fidelidade da sequência, permitindo o início dos ensaios funcionais. Ensaios de viabilidade celular demonstraram que, nas concentrações testadas, o PaT-2 não apresentou efeito citotóxico, tampouco induziu proliferação celular. Essa ausência de toxicidade é considerada um pré-requisito essencial para qualquer biomolécula candidata ao desenvolvimento farmacêutico (Kamiloglu, Sari & Capanoglu, 2020).

De maneira notável, o PaT-2 exibiu atividade antioxidante significativa, evidenciada pela redução da formação de GSSG e manutenção da homeostase redox em células BV2. Esses achados reforçam resultados anteriores (Eder, 2021), que demonstraram o papel antioxidante do PaT-2 em modelos de inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS). A capacidade do PaT-2 em modular a resposta redox sugere um mecanismo associado à presença de resíduos aromáticos, como triptofano, conhecidos pela habilidade de doar hidrogênios e estabilizar radicais livres (Tran et al., 2021).

Assim, os dados apresentados neste estudo não apenas confirmam a relevância biológica das secreções cutâneas de anuros como reservatórios de biomoléculas funcionais, mas também evidenciam o potencial translacional do PaT-2 como agente antioxidante. Considerando que o estresse oxidativo é um fator central em diversas doenças humanas — incluindo processos inflamatórios crônicos, câncer e patologias neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Block, Zecca & Hong, 2007) — o PaT-2 se apresenta como um candidato promissor a ser explorado em estudos pré-clínicos futuros, tanto na área de saúde humana quanto veterinária.

De modo geral, as estruturas cutâneas de *P. oreades* e *P. azureus* apresentam grande similaridade e seguem o mesmo padrão descrito em outros anuros, caracterizado pela abundância de glândulas mucosas e granulares. Essas glândulas encontram-se

localizadas na derme e podem ser facilmente visualizadas tanto pela morfologia quanto por métodos histoquímicos, confirmando achados clássicos sobre a organização do tegumento em anfíbios (Toledo & Jared, 1995).

No presente estudo, verificou-se que o tamanho das glândulas serosas foi significativamente maior na região dorsal em comparação com as demais regiões do corpo. Resultados semelhantes foram descritos por Warburg (2000) em *Litoria caerulea*, e também por Andrade et al. (2018), ao avaliar o tecido cutâneo de *Telmatobius culeus*, onde foi evidenciada uma maior espessura dérmica e, conseqüentemente, uma maior concentração e dimensão das glândulas na região dorsal. Esses achados reforçam a hipótese de que a hipertrofia glandular nessas regiões está associada à proteção de áreas mais expostas, como dorso e cabeça, que são frequentemente as primeiras a entrar em contato com predadores ou a sofrer impactos ambientais durante atividades de forrageamento e repouso (Hata Rasit et al., 2018). Assim, essa distribuição diferencial de glândulas pode representar uma adaptação evolutiva, conferindo vantagem seletiva no contexto de defesa química.

Além da morfologia, aspectos comportamentais também desempenham papel fundamental na eficácia dessas secreções. Barbeau & Lillywhite (2005) descreveram que espécies arborícolas de pererecas apresentam o comportamento de friccionar o corpo com as patas, movimento associado tanto à limpeza quanto à redistribuição das secreções glandulares. Entre os comportamentos mais frequentes observados, destaca-se o uso coordenado dos membros anteriores e posteriores para esfregar a região dorsal e a cabeça, progredindo até a região inguinal, olhos e narinas (figura 24). Esse padrão sugere que a estimulação tátil não apenas induz a produção de secreções cutâneas, mas também garante a sua distribuição homogênea por todo o tegumento. Dessa forma, o comportamento de esfregar o corpo potencializa a função das glândulas, assegurando a formação de uma barreira protetora uniforme contra desidratação, agentes infecciosos e possíveis predadores.

Considerando os dados obtidos neste trabalho em conjunto com os relatos da literatura, é possível inferir que a combinação entre características morfológicas (hipertrofia glandular em áreas estratégicas) e comportamentos adaptativos (autofricção

e redistribuição de secreções) constitui um mecanismo integrado de defesa, que contribui para a sobrevivência dos anuros em ambientes complexos e desafiadores.

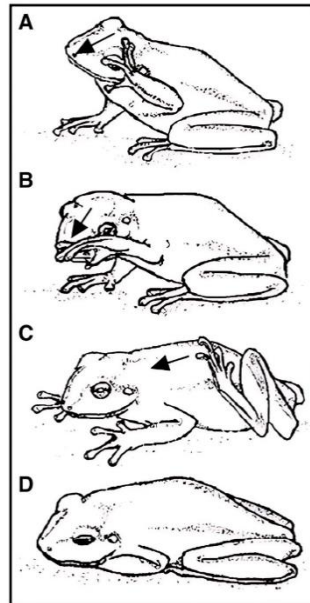


Figura 24. Movimentos de limpeza visualizados em rãs. **(A)** Início da limpeza na região da cabeça e pescoço **(B)** fim da limpeza na região da cabeça **(C)** Limpeza na região dorsal **(D)** após limpeza as rãs iniciam uma postura de conservação de água. As setas representam o sentido dos movimentos. Ilustração: T. Barbeau (2005).

No que diz respeito à função das glândulas cutâneas, as mucosas são responsáveis pela síntese, armazenamento e secreção de muco, desempenhando papéis fundamentais na proteção contra a desidratação e no suporte à respiração cutânea (Warburg, 2000). Por sua vez, a distribuição das glândulas granulares no tegumento dos anuros sugere forte relação com a defesa química, já que essas estruturas produzem secreções ricas em peptídeos bioativos e outras substâncias de relevância farmacológica (Asséf Millen Valente Teixeira, n.d.). Diversos exemplos corroboram essa interpretação: um deles é a BR-bombesina, isolada da secreção cutânea de *Boana raniceps*, cuja ação regulatória sobre a secreção gástrica reforça seu potencial como molécula candidata ao desenvolvimento de novos fármacos (Sousa et al., 2022).

Outro caso é a dermaseptina-PH, descrita por Huang et al. (2017) em *Pithecopus azureus*, que apresentou potente efeito antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de ação antiproliferativa, ainda que acompanhada de discreta citotoxicidade em células humanas, ressaltando a necessidade de otimização estrutural para viabilidade clínica.

Nesse contexto, a toxicidade intrínseca de alguns peptídeos de origem anfíbia

representa um desafio translacional. Estudos recentes apontam que a redução da toxicidade pode ser alcançada por meio de modificações estruturais dirigidas (como substituições de aminoácidos ou inserção de resíduos estabilizadores) ou pela incorporação em sistemas de liberação controlada, como nanopartículas ou carreadores lipídicos, capazes de reduzir a ação inespecífica e direcionar os compostos ao alvo terapêutico (Li et al., 2021). Tais estratégias estão no cerne da biotecnologia farmacêutica contemporânea e reforçam a aplicabilidade clínica de compostos anfíbios.

Do ponto de vista histoquímico, os resultados deste estudo estão em consonância com achados anteriores. Ensaio clássico, como o ácido periódico de Schiff (PAS), demonstraram a presença de polissacarídeos nas glândulas mucosas, evidenciando sua importância na retenção hídrica e na proteção cutânea, achado corroborado por Luiz & Fontana (2021) e Warburg (2000). O uso do corante Alcian Blue em diferentes pHs reforça a diversidade química das secreções serosas, revelando tanto polissacarídeos sulfatados (pH 1.0) quanto ácidos (pH 2.5) (Scott et al., 1964). Essa diversidade química é um indicativo da multifuncionalidade das secreções, que vão desde a hidratação e lubrificação do tegumento até a defesa química contra patógenos e predadores. Interessantemente, a presença de glândulas com pequenos grânulos lipídicos na derme papilar, como descrito neste trabalho, já havia sido relatada em Hylidae arborícolas (Barbeau & Lillywhite, 2005). Acredita-se que essa secreção lipídica forme uma barreira adicional contra a perda de água, funcionando de maneira sinérgica com mucos e peptídeos bioativos para garantir a homeostase e a proteção cutânea.

12. CONCLUSÃO

As análises histológicas da pele de *Pithecopus oreades* e *P. azureus* revelaram um padrão glandular típico de anuros, caracterizado pela abundância de glândulas mucosas e serosas, distribuídas principalmente na região dorsal e da cabeça. Essa disposição, também observada em outros anfíbios, sugere uma adaptação evolutiva voltada para a defesa, uma vez que as áreas mais expostas concentram maior número e volume de glândulas granulares. Além disso, aspectos comportamentais, como o ato de esfregar o corpo com as patas, parecem contribuir para a redistribuição das secreções cutâneas, ampliando sua eficácia protetora contra desidratação, agentes patogênicos e

predadores.

Do ponto de vista funcional, as glândulas mucosas desempenham papel essencial na hidratação e respiração cutânea, enquanto as granulares secretam peptídeos bioativos com atividades antimicrobianas, antiproliferativas e de interesse farmacológico. Os testes histoquímicos confirmaram a presença de polissacarídeos e lipídios, reforçando a importância dessas secreções tanto na manutenção fisiológica quanto na defesa química. Ressalta-se que este é o primeiro estudo a fornecer uma descrição histológica detalhada da pele de *P. oreades*, trazendo contribuições inéditas para o conhecimento morfológico e fisiológico dessa espécie.

Nos ensaios funcionais, a menadiona mostrou-se um indutor adequado de estresse oxidativo em células BV2, permitindo a avaliação da resposta antioxidante. O peptídeo PaT-2, sintetizado e validado experimentalmente, não apresentou citotoxicidade significativa e demonstrou efeito antioxidante, evidenciado pela inibição da oxidação de glutatona (GSSG). Esse resultado sugere que PaT-2 atua na neutralização de espécies reativas de oxigênio, possivelmente mediado pela presença de resíduos como triptofano, reconhecidos por sua capacidade de estabilizar radicais livres.

Em síntese, as glândulas cutâneas de *Pithecopus* não apenas são fundamentais para a sobrevivência e adaptação ecológica desses anfíbios, como também constituem uma fonte relevante de biomoléculas com potencial terapêutico. Entre elas, destaca-se o PaT-2, que desponta como candidato promissor no combate ao estresse oxidativo e pode, futuramente, ser explorado como agente inovador no tratamento de doenças inflamatórias e neurodegenerativas.

13. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

13.1 Resumo publicado e apresentado em congresso internacional

ARAUJO, F.G.; LEITE, J. R. S. A.; MOREIRA, D. C. **Effect of Menadione on Cell Viability and Redox Balance in Murine Microglial cells**. 2024. V Encontro Internacional de Inovação em Saúde - V INOVATEC.

13.2 Artigo submetido a revista internacional indexada

Araújo et al., Histological Analysis of *Pithecopus* spp. and Functional Characterization of the Tryptophyllin named PaT-2 as an Antioxidant Peptide (2025). **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology (Impact Factor 1.4)**.

14. REFERÊNCIAS

- Andrade, P., Elías, R. P., Grandez, R. R., & Mamani, J. P. (2018). Histological description of the skin of the titicaca water frog (*Telmatobius culeus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(1), 64–74. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14085>
- AmphibiaWeb. *Amphibian Species by the Numbers*. Berkeley: University of California, [s.d.]. Disponível em: <https://amphibiaweb.org/amphibian/speciesnums.html>. Acesso em: 16 set. 2025.
- Asséf Millen Valente Teixeira, S. (n.d.). *Stéphanie asséf millen valente teixeira morfologia do tegumento de anfíbios anuros da mata atlântica e sua aplicação em estudos comportamentais*.
- Aykul, S., & Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry*, 508, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.025>
- Azevedo Calderon, L. De, Silva, A. D. A. E., Ciancaglini, P., & Stábeli, R. G. (2011). Antimicrobial peptides from Phyllomedusa frogs: From biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. In *Amino Acids* (Vol. 40, Issue 1, pp. 29–49). <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0622-3>
- Barbeau, T. R., & Lillywhite, H. B. (2005). Body wiping behaviors associated with cutaneous lipids in hyliid tree frogs of Florida. *Journal of Experimental Biology*, 208(11), 2147–2156. <https://doi.org/10.1242/jeb.01623>
- Barbosa, E. A., Plácido, A., Moreira, D. C., Albuquerque, L., Dematei, A., Silva-Carvalho, A., Cabral, W. F., Báó, S. N., Saldanha-Araújo, F., Kuckelhaus, S. A. S., Borges, T. K., Portugal, C. C., Socodato, R., Teixeira, C., Lima, F. C. D. A., Batagin-Neto, A., Sebben, A., Eaton, P., Gomes, P., ... Leite, J. R. S. A. (2021). The peptide secreted at the water to land transition in a model amphibian has antioxidant effects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1962). <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1531>
- BCRJ. **Célula: BV-2**. [S. I.], 2024. Disponível em: <https://bcry.org.br/celula/bv-2/>. Acesso em: [data de acesso, ex: 28 ago. 2025].
- Biswas, S. K., & Rahman, I. (2009). Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: The role of glutathione. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 30, Issues 1–2, pp. 60–76). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.07.001>
- BLOCK ML, ZECCA L, Hong JSroglia. Mic -mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(1):57-69. doi:10.1038/nrn2038
- BRASIL. **Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)**. Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA. *Diário Oficial da União*, Brasília, 16 fev. 2018. Disponível em: <http://www.mcti.gov.br/concea>. Acesso em: 19 junho. 2025.

- Caramaschi, U. (2006). Redefinição do Grupo de *Phyllomedusa hypochondrialis*, com redescritção de *P. megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926), revalidação de *P. azurea* cope, 1862 e descrição de uma nova espécie (amphibia, anura, hylidae). *Arquivos Do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, v.64, p.159-179.
- Caricchio, R., Kovalenko, D., Kaufmann, W. K., & Cohen, P. L. (1999). *Apoptosis Provoked by the Oxidative Stress Inducer Menadione (Vitamin K 3) Is Mediated by the Fas/Fas Ligand System 1*. <http://www.idealibrary.com>
- Chen, T., Orr, D. F., O'Rourke, M., McLynn, C., Bjourson, A. J., McClean, S., Hirst, D., Rao, P., & Shaw, C. (2004). *Pachymedusa dacnicolor* tryptophyllin-1: Structural characterization, pharmacological activity and cloning of precursor cDNA. *Regulatory Peptides*, 117(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2003.08.004>
- Conlon, J. M. (2011). The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 343, Issue 1, pp. 201–212). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1014-4>
- Conlon, J. M., Guilhaudis, L., Attoub, S., Coquet, L., Leprince, J., Jouenne, T., & Mechkarska, M. (2023). Purification, Conformational Analysis and Cytotoxic Activities of Host-Defense Peptides from the Giant Gladiator Treefrog *Boana boans* (Hylidae: Hylinae). *Antibiotics*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071102>
- Conlon, J. M., Jouenne, T., Cosette, P., Cosquer, D., Vaudry, H., Taylor, C. K., & Abel, P. W. (2005). Bradykinin-related peptides and tryptophyllins in the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. *General and Comparative Endocrinology*, 143(2), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.04.006>
- Currie, T. L., Engler, M. M., Olsen, C. H., Krauthamer, V., Scott, J. M., Deuster, P. A., & Flagg, T. P. (2022). The Effects of Berry Extracts on Oxidative Stress in Cultured Cardiomyocytes and Microglial Cells: A Potential Cardioprotective and Neuroprotective Mechanism. *Molecules*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092789>
- de Sousa, et al. (2022). BR-bombesin: a novel bombesin-related peptide from the skin secretion of the Chaco tree frog (*Boana raniceps*) with physiological gastric effects. *Amino Acids*, 54(5), 733–747. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03114-4>
- Duellman, W. E., Marion, A. B., & Hedges, S. B. (2016). Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, 4104(1), 1–109. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4104.1.1>
- Duellman, W. E., & Trueb, L. (1994). *Biology of amphibians* (2°).
- Ellis-Steinborner, S. T., Scanlon, D., Musgrave, I. F., Tran, T. T. N., Hack, S., Wang, T., Abell, A. D., Tyler, M. J., & Bowie, J. H. (2011). An unusual kynurenine-containing opioid tetrapeptide from the skin gland secretion of the Australian red tree frog *Litoria rubella*. Sequence determination by electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(12), 1735–1740. <https://doi.org/10.1002/rcm.5041>
- Erspamer, V., Falconieri Erspamer, G., & Ceil, J. M. (1986). ACTIVE PEPTIDES IN THE SKINS OF TWO HUNDRED AND THIRTY AMERICAN AMPHIBIAN SPECIES. In *Biochem.*

Physiol.: Vol. UC (Issue I).

- Erspamer, V., Melchiorri, P., Falconieri Erspamer, G., Montecucchi, P. C., & de Castiglione, R. (1985). Phyllomedusa skin: A huge factory and store-house of a variety of active peptides. *Peptides*, 6(SUPPL. 3), 7–12. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90343-2](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90343-2)
- FROST, Darrel R. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Versão 6.2 (acesso em 22 de agosto de 2025). Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Ge, L., Lyu, P., Zhou, M., Zhang, H., Wan, Y., Li, B., Li, R., Wang, L., Chen, T., & Shaw, C. (2014). AcT-2: A novel myotropic and antimicrobial type 2 tryptophyllin from the skin secretion of the central American red-eyed leaf frog, *Agalychnis callidryas*. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/158546>
- Haddad, C. F. B. (2008). *Uma Análise da Lista Brasileira de Anfíbios Ameaçados de Extinção*.
- Hata Rasit, A., Amirah Md Sungif, N., Zainudin, R., Zulkarnaen, M., & Narihan, A. (2018). THE DISTRIBUTION AND AVERAGE SIZE OF GRANULAR GLAND IN POISONOUS ROCK FROG, *Odorrana hosii*. In *Malays. Appl. Biol* (Vol. 47, Issue 1).
- Huang, L., Chen, D., Wang, L., Lin, C., Ma, C., Xi, X., Chen, T., Shaw, C., & Zhou, M. (2017). Dermaseptin-PH: A Novel Peptide with Antimicrobial and Anticancer Activities from the Skin Secretion of the South American Orange-Legged Leaf Frog, *Pithecopus* (Phyllomedusa) hypochondrialis. *Molecules*, 22(10), 1805. <https://doi.org/10.3390/molecules22101805>
- IBRAM – Instituto Brasília Ambiental. *APA Gama e Cabeça de Veado*. Brasília Ambiental, 22 de fevereiro de 2018. Disponível em: <https://www.ibram.df.gov.br/apa-gama-e-cabeca-de-veado/>. Acesso em: 22 de agosto de 2025.
- Kamiloglu S, SARI G, OZDAL T, CAPANOGLU E. Guidelines for cell viability assays. *Food Front*. 2020;1:332-349. doi:10.1002/fft2.44
- Langsdorf, M., Ghassempour, A., Römpf, A., & Spengler, B. (2010). Characterization of a peptide family from the skin secretion of the middle east tree frog *Hyla savignyi* by composition-based de novo sequencing. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(19), 2885–2899. <https://doi.org/10.1002/rcm.4717>
- Leite, J. R. S. A., Brand, G. D., Silva, L. P., Kückelhaus, S. A. S., Bento, W. R. C., Araújo, A. L. T., Martins, G. R., Lazzari, A. M., & Bloch, C. (2008). Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 151(3), 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.03.016>
- Lima Hermes, C. (2013). *Universidade federal de santa maria centro de ciências da saúde programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas automação e validação do método de oxidação do nadph para a mensuração da atividade da glutatona redutase: determinação dos limites de referência e avaliação da influência da lipemia, hemoglobina e bilirrubina dissertação de mestrado*.

- Li, T., Li, L., Du, F., Sun, L., Shi, J., Long, M., & Chen, Z. (2021). Activity and Mechanism of Action of Antifungal Peptides from Microorganisms: A Review. *Molecules*, 26(11), 3438. <https://doi.org/10.3390/molecules26113438>
- Luiz, P., & Fontana, M. (n.d.). *DISSERTAÇÃO 2*.
- Montecucchi, P. C. (1985a). Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins. *Peptides*, 6(SUPPL. 3), 187–195. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90373-0](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90373-0)
- Montecucchi, P. C. (1985b). Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins. *Peptides*, 6(SUPPL. 3), 187–195. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90373-0](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90373-0)
- Morris, D., Khurasany, M., Nguyen, T., Kim, J., Guilford, F., Mehta, R., Gray, D., Saviola, B., & Venketaraman, V. (2013). Glutathione and infection. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1830, Issue 5, pp. 3329–3349). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.012>
- Neiva, M., Vargas, D. C., Conceição, K., Rádis-Baptista, G., Assakura, M. T., Jared, C., & Hayashi, M. A. F. (2013). Gene expression analysis by ESTs sequencing of the Brazilian frog *Phyllomedusa nordestina* skin glands. *Toxicon*, 61(1), 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.10.016>
- Nogueira, A., Brango-Vanegas, J., Vasconcelos, A. G., Coleone, A. P., Barbosa, É. A., Moreira, D. C., da Silva, M. da G., Cabral, W. F., Nascimento, J. D., Vinícius de Sousa França, J., Arcanjo, D. D. R., Lima, F. C. D. A., Batagin-Neto, A., Kückelhaus, S. A. S., Brand, G. D., Plácido, A., & Leite, J. R. S. A. (2025). Novel tryptophyllin peptides from *Physalaemus centralis* inhibit oxidative stress-induced endothelial dysfunction in rat aorta preparation. *Toxicon*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2025.108234>
- Perseo, G., & DE CASTIGLIONE, R. (1984). Syntheses of tetra- and pentapeptides from skin extracts of *Phyllomedusa rhodei* (tryptophyllins). *International Journal of Peptide and Protein Research*, 24(2), 155–160. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1984.tb00941.x>
- Plácido, A., do Pais do Amaral, C., Teixeira, C., Nogueira, A., Brango-Vanegas, J., Alves Barbosa, E., C. Moreira, D., Silva-Carvalho, A., da Silva, M. da G., do Nascimento Dias, J., Albuquerque, P., Saldanha-Araújo, F., C. D. A. Lima, F., Batagin-Neto, A., Kuckelhaus, S., Bessa, L. J., Freitas, J., Dotto Brand, G., C. Santos, N., ... Eaton, P. (2022). Neuroprotective effects on microglia and insights into the structure–activity relationship of an antioxidant peptide isolated from *Pelophylax perezii*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(10), 2793–2807. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17292>
- Prates, I., Antoniazzi, M. M., Sciani, J. M., Pimenta, D. C., Toledo, L. F., Haddad, C. F. B., & Jared, C. (2012). Skin glands, poison and mimicry in dendrobatid and leptodactylid amphibians. *Journal of Morphology*, 273(3), 279–290. <https://doi.org/10.1002/jmor.11021>
- Pukala, T. L., Bowie, J. H., Maselli, V. M., Musgrave, I. F., & Tyler, M. J. (2006). Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: Structure and activity. In *Natural Product Reports* (Vol. 23, Issue 3, pp. 368–393). <https://doi.org/10.1039/b512118n>

- Renda, T., D'Este, L., Buffa, R., Usellini, L., Capella, C., Vaccaro, R., & Melchiorri, P. (1985). Tryptophyllin-like immunoreactivity in rat adenohypophysis. *Peptides*, 6(SUPPL. 3), 197–202. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90374-2](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90374-2)
- Reuber, D. R., & Brandão, A. (2008). *Taxonomia, distribuição geográfica potencial e conservação das espécies de Phyllomedusa do grupo Hypochobdrialis*.
- Samgina, T. Y., Gorshkov, V. A., Artemenko, K. A., Kovalev, S. V., Ogourtsov, S. V., Zubarev, R. A., & Lebedev, A. T. (2010). Novel natural peptides from *Hyla arborea* schelkownikowi skin secretion. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(12), 1749–1754. <https://doi.org/10.1002/rcm.4571>
- Samgina, T. Y., Kovalev, S. V., Gorshkov, V. A., Artemenko, K. A., Poljakov, N. B., & Lebedev, A. T. (2010). N-Terminal Tagging Strategy for De Novo Sequencing of Short Peptides by ESI-MS/MS and MALDI-MS/MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(1), 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.09.008>
- Scott, J. E., Quintarelli, G., & Dellovo, M. C. (n.d.). *Histochemie* 4, 73-85 (1964) *THE CHEMICAL AND HISTOCHEMICAL PROPERTIES OF ALCIANBLUE I. THE MECHANISM OF ALCIAN BLUE STAINING**.
- Shi, D., Xi, X., Wang, L., Gao, Y., Ma, C., Chen, H., Zhou, M., Chen, T., & Shaw, C. (2016). Baltikinin: A new myotropic tryptophyllin-3 peptide isolated from the skin secretion of the purple-sided leaf frog, *Phyllomedusa baltea*. *Toxins*, 8(7), 1–10. <https://doi.org/10.3390/toxins8070213>
- Simas, B., Co-Orientador:, M., Chaves Barreto, C., Beatriz, O. :, & Magalhães, S. (n.d.). *UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS GENÔMICAS E BIOTECNOLOGIA Mestrado TRANSCRIPTOMA DA DERME DE Phyllomedusa distincta Autora: Cláudia Sofia de Freitas Correia Popov BRASÍLIA 2012 Autora: Cláudia Popov*.
- Silva, H.A.M., Silva-Soares, T. & Brito-Gitirana, L. (2018). Comparative analysis of the integument of different tree frog species from *Ololygon* and *Scinax* genera (Anura: Hylidae). *Zoologia*, 34: 2017.
- Steinborner, S. T., Wabnitz, P. A., Bowie, J. H., & Tyler, M. J. (1996). The application of mass spectrometry to the study of evolutionary trends in amphibians. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(1), 92–95. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19960115\)10:1<92::AID-RCM443>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19960115)10:1<92::AID-RCM443>3.0.CO;2-3)
- Toledo, R. C., & Jared, C. (1995). Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 111(1), 1–29. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)98515-I](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)98515-I)
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. AlamarBlue Cell Viability Reagent for Microplates Protocol.** Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/alamarblue-cell-viability-reagent-for-microplates-protocol.html>. Acesso em: [data de acesso, 22 jun. 2025].
- Tran, T. T. N., Tran, D. P., Nguyen, T. M. A., Tran, T. H., Phan, N. N. A., Nguyen, V. C., Nguyen, V. T., & Bowie, J. H. (2022). Virtual screening and rational design of antioxidant peptides

- based on tryptophyllin L structures isolated from the *Litoria rubella* frog. *Journal of Peptide Science*, 28(4). <https://doi.org/10.1002/psc.3380>
- Tran, T. T. N., Tran, D. P., Nguyen, V. C., Tran, T. D. T., Bui, T. T. T., & Bowie, J. H. (2021). Antioxidant activities of major tryptophyllin L peptides: A joint investigation of Gaussian-based 3D-QSAR and radical scavenging experiments. *Journal of Peptide Science*, 27(4). <https://doi.org/10.1002/psc.3295>
- van Eck, N. J., & Waltman, L. (2010). Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics*, 84(2), 523–538. <https://doi.org/10.1007/s11192-009-0146-3>
- Vaz-Silva, W., Maciel, N. M., Nomura, F., Morais, A. R. de, Batista, V. G., Santos, D. L., Andrade, S. P., Oliveira, A. Â. B. de, Brandão, R. A., & Bastos, R. P. (2020). *Guia de identificação das espécies de anfíbios (Anura e Gymnophiona) do estado de Goiás e do Distrito Federal, Brasil Central*. Sociedade Brasileira de Zoologia. <https://doi.org/10.7476/9786587590011>
- Wang, L., Zhou, M., Chen, T., Walker, B., & Shaw, C. (2009). PdT-2: A novel myotropic Type-2 tryptophyllin from the skin secretion of the Mexican giant leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. *Peptides*, 30(8), 1557–1561. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.04.019>
- Wang, R., Chen, T., Zhou, M., Wang, L., & Shaw, C. (2013). PsT-1: A new tryptophyllin peptide from the skin secretion of Waxy Monkey Leaf Frog, *Phyllomedusa sauvagei*. *Regulatory Peptides*, 184, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2013.03.017>
- Wang, R., Lin, Y., Chen, T., Zhou, M., Wang, L., & Shaw, C. (2014). Molecular cloning of a novel tryptophyllin peptide from the skin of the orange-legged monkey frog, *phyllomedusa hypochondrialis*. *Chemical Biology and Drug Design*, 83(6), 731–740. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12287>
- Wang, R., Zhou, Y., Chen, T., Zhou, M., Wang, L., & Shaw, C. (2015). Identification and functional analysis of a novel tryptophyllin peptide from the skin of the red-eye leaf frog, *agalychnis callidryas*. *International Journal of Biological Sciences*, 11(2), 209–219. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10143>
- Warburg, M. R. (2000). (Warburg 2000) Cutaneous glands in the Australian hyliid. *Anat Embryol*.
- Winzor, D. J. (2003). Analytical exclusion chromatography. In *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* (Vol. 56, Issues 1–3, pp. 15–52). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(03\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(03)00071-X)
- Wiraswati, H. L., Hangen, E., Belén Sanz, A., Lam, N.-V., Reinhardt, C., Sauvat, A., Mogha, A., Ortiz, A., Kroemer, G., & Modjtahedi, N. (2016). *Apoptosis inducing factor (AIF) mediates lethal redox stress induced by menadione* (Vol. 7, Issue 47). www.impactjournals.com/oncotarget
- Yokoyama, H., Kudo, N., Todate, M., Shimada, Y., Suzuki, M., & Tamura, K. (2018). Skin regeneration of amphibians: A novel model for skin regeneration as adults. *Development, Growth & Differentiation*, 60(6), 316–325. <https://doi.org/10.1111/dgdd.12544>

Zugibe, F. T. (n.d.). *Positive periodic acid-Schiffstaining of acid mucopolysaccharides* (Vol. 2, Issue 1970).