



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

PRISCILA MENDES FERREIRA

Avaliação das propriedades biológicas de um peptídeo antimicrobiano do anuro *Boana albopunctata* identificado a partir de banco de cDNAs

BRASÍLIA-DF

2025

PRISCILA MENDES FERREIRA

Avaliação das propriedades biológicas de um peptídeo antimicrobiano do anuro *Boana albopunctata* identificado a partir de banco de cDNAs

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

BRASÍLIA-DF

2025

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

PRISCILA MENDES FERREIRA

Avaliação das propriedades biológicas de um peptídeo antimicrobiano do anuro *Boana albopunctata* identificado a partir de banco de cDNAs

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Mariana S. Castro

Presidente

Departamento de Ciências Fisiológicas/IB

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo

Membro titular

Universidade Federal de São João Del Rei

Campus Centro-Oeste – Dona Lindu

Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Membro titular

Departamento de Biologia Celular/IB

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças nos momentos difíceis e renovar sempre minha coragem, quando o cansaço parecia maior que a vontade.

À minha orientadora, Professora Dra. Mariana, que esteve presente em cada etapa desta jornada, conduzindo-me com paciência, compreensão e apoio diante dos desafios, tempestades e reviravoltas do caminho. Obrigada por me mostrar que orientar é também cuidar, que a ciência se constrói com rigor, mas igualmente com empatia, e que, no fim, ela é feita por pessoas e para pessoas. Seu acolhimento e compreensão foram fundamentais para que este trabalho se tornasse possível.

À minha família, Zenia, Celso e Fernanda, que talvez nunca entendam exatamente o que são peptídeos, mas sempre entenderam o quanto este trabalho significava para mim. Obrigada por ouvirem, apoiarem e torcerem, mesmo sem a tradução do “cientifiquês”.

À minha tia Zirlene e à minha avó Maria, que já partiram, mas permanecem presentes em meu coração. Este trabalho é uma homenagem a quem me ensinou sobre força, amor e resiliência. Cada página guarda o aprendizado que deixaram em mim, e esta conquista também é delas.

Aos colegas de laboratório, especialmente Brunna, Joyce, Isabelle, Mariana e Gislene, que estiveram ao meu lado nos experimentos, análises e, principalmente, nas risadas, cafés e almoços que salvam dias difíceis. Vocês tornaram o processo mais leve e, muitas vezes, mais divertido. Obrigada por me mostrarem que a ciência também é feita de amizade e cooperação.

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para que esta dissertação se tornasse realidade, meu sincero agradecimento. Este trabalho carrega muito de cada um de vocês.

APOIO FINANCEIRO

A dissertação de mestrado intitulada “Avaliação das propriedades biológicas de um peptídeo antimicrobiano do anuro *Boana albopunctata* identificado a partir de banco de cDNAs” desenvolvida por Priscila Mendes Ferreira sob a orientação da Profa. Dra. Mariana de S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq, da CAPES, da FAPDF, da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são pequenas moléculas bioativas que desempenham papel crucial no sistema imunológico inato de uma ampla variedade de organismos, incluindo plantas, insetos e vertebrados. Eles apresentam ação direta contra microrganismos patogênicos, como bactérias, fungos, protozoários e vírus, e, em alguns casos, também atuam sobre células tumorais. Entre os PAMs mais estudados estão aqueles isolados das secreções cutâneas de anuros (sapos, rãs e pererecas), conhecidos por seu amplo espectro de ação antimicrobiana e notável potencial terapêutico. Esses peptídeos são sintetizados e armazenados nas glândulas granulosas da pele dos anuros, atuando como parte da primeira linha de defesa em ambientes ricos em patógenos. Seus mecanismos de ação incluem interação direta com as membranas celulares dos microrganismos, levando à desestabilização, permeabilização e eventual morte celular. Além disso, muitos PAMs podem penetrar nas células e atuar sobre alvos intracelulares essenciais à viabilidade microbiana, ampliando seu espectro de ação. A relevância terapêutica dos PAMs de anuros é intensificada pelo desafio global do aumento de patógenos multirresistentes. Sua comprovada eficácia contra linhagens resistentes a antibióticos convencionais os torna candidatos promissores para o desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos. Pesquisas também destacam suas propriedades imunomodulatórias, anti-inflamatórias e cicatrizantes, com aplicações no tratamento de doenças infecciosas, aceleração da regeneração tecidual e combate a infecções virais emergentes, como a COVID-19. No presente trabalho, uma raniseptina identificada a partir de uma biblioteca de cDNA produzida da pele do anuro *Boana albopunctata* foi sintetizada quimicamente utilizando a técnica Fmoc. Esse peptídeo foi denominado Raniseptina Ba-1 em virtude da alta similaridade com raniseptinas identificadas na espécie *Boana raniceps*. A Raniseptina Ba-1 inibiu o crescimento de seis cepas padrão de bactérias patogênicas, sendo observado um efeito mais proeminente contra bactérias Gram-negativas. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922) 2 μM ; *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) 4 μM ; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) 4 μM ; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) 32 μM ; *S. epidermidis* (ATCC 12228) 8 μM e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29292) 64 μM . Em ensaio de cristal violeta (48 h) com *P. aeruginosa* ATCC 27853, a Raniseptina Ba-1 reduziu a formação de biofilme em comparação ao controle. Além disso, o peptídeo reduziu a viabilidade de linhagens de células tumorais HeLa e MCF-7 (24 h, MTT; 1–128 μM), indicando efeito antiproliferativo/citotóxico dependente de concentração e também apresentou citotoxicidade concentração-dependente em RAW 264.7 (24 h, MTT), além de alterar a taxa de migração de neutrófilos. Nas análises de dicroísmo circular, apresentou conformação α -hélice na presença de trifluoroetanol e SDS. Em conclusão, a Raniseptina Ba-1 exibiu atividade antimicrobiana, conformação em α -hélice em ambientes membrano-miméticos e efeitos citotóxicos e imunomodulatórios, sugerindo potencial terapêutico como agente antimicrobiano.

Palavras-chave: Anuros; *Boana albopunctata*; Peptídeos antimicrobianos; Propriedades biológicas; Potencial terapêutico.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are small bioactive molecules that play a crucial role in the innate immune system of a wide range of organisms, including plants, insects, and vertebrates. They act directly against pathogenic microorganisms such as bacteria, fungi, protozoa, and viruses and, in some cases, also target tumor cells. Among the most studied AMPs are those isolated from the cutaneous secretions of anurans (toads, frogs, and tree frogs), known for their broad antimicrobial spectrum and remarkable therapeutic potential. These peptides are synthesized and stored in the granular glands of anuran skin, functioning as part of the first line of defense in pathogen-rich environments. Their mechanisms of action include direct interaction with microbial cell membranes, leading to destabilization, permeabilization, and eventual cell death. In addition, many AMPs can penetrate cells and act on intracellular targets essential for microbial viability, expanding their spectrum of action. The therapeutic relevance of anuran AMPs is heightened by the global challenge of increasing multidrug-resistant pathogens. Their proven efficacy against strains resistant to conventional antibiotics makes them promising candidates for the development of new anti-infective agents. Research also highlights their immunomodulatory, anti-inflammatory, and wound-healing properties, with applications in treating infectious diseases, accelerating tissue regeneration, and combating emerging viral infections such as COVID-19. In the present work, a raniseptin identified from a cDNA library produced from the skin of the anuran *Boana albopunctata* was chemically synthesized using the Fmoc strategy. This peptide was named Raniseptin Ba-1 due to its high similarity to raniseptins identified in the species *Boana raniceps*. Raniseptin Ba-1 inhibited the growth of six standard strains of pathogenic bacteria, with a more prominent effect against Gram-negative bacteria. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were: *Escherichia coli* (ATCC 25922) 2 μ M; *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) 4 μ M; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) 4 μ M; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) 32 μ M; *S. epidermidis* (ATCC 12228) 8 μ M; and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29292) 64 μ M. In a crystal violet assay (48 h) with *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Raniseptin Ba-1 reduced biofilm formation compared to the control. In addition, the peptide reduced the viability of HeLa and MCF-7 tumor cell lines (24 h, MTT; 1–128 μ M), indicating a concentration-dependent antiproliferative/cytotoxic effect, and also showed concentration-dependent cytotoxicity in RAW 264.7 cells (24 h, MTT), in addition to altering the neutrophil migration rate. Circular dichroism analyses revealed an α -helical conformation in the presence of trifluoroethanol and SDS. In conclusion, Raniseptin Ba-1 exhibited antimicrobial activity, an α -helical conformation in membrane-mimetic environments, and cytotoxic and immunomodulatory effects, suggesting therapeutic potential as an antimicrobial agent.

Keywords: Anurans; *Boana albopunctata*; Antimicrobial peptides; Biological properties; Therapeutic potential.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	12
1.2. ANFÍBIOS	15
1.3. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS COMO ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS FRENTE À CRISE DOS ANTIBIÓTICOS	17
1.3.1. Modelo <i>barrel-stave</i>	19
1.3.2. Modelo poro toroidal	19
1.3.3. Modelo <i>carpet-like</i>	19
1.3.4. Modelo de Shai–Matsuzaki–Huang	20
1.4. POTENCIAL TERAPÊUTICO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANUROS DO GÊNERO <i>Boana</i>	22
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVO GERAL E METAS ESTABELECIDAS	27
3.1. OBJETIVO GERAL	27
3.2. METAS ESTABELECIDAS	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5. PERSPECTIVAS FUTURAS	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
7. ANEXO: ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO <i>Toxins</i> (MDPI)	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Principais efeitos biológicos dos PAMs de anuros (Ferreira *et al.*, 2025) 18
- Figura 2.** Modos de ação dos PAMs sobre membranas bacterianas (Ferreira *et al.*, 2025). 20
- Figura 3.** Modelo de Shai-Matsuzaki-Huang de ação de peptídeos antimicrobianos (Figura modificada de Zasloff, 2002). 20
- FIGURAS DO ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO *Biomolecules* (MDPI)**
- Figura 1.** Alinhamento múltiplo da sequência do peptídeo maduro correspondente à Raniseptina Ba-1 com outras raniseptinas previamente identificadas. “*” indica resíduos de aminoácidos idênticos e “.” indicam substituições conservativas. 34
- Figura 2.** Representação em roda helicoidal da Raniseptina Ba-1. 34
- Figura 3.** Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (190 a 260 nm) de Raniseptina Ba-1 em água e em diferentes concentrações de (A) SDS e (B) TFE a 25 °C. A concentração empregada do peptídeo foi 0,22 mg/mL. 34
- Figura 4.** Efeitos da Raniseptina Ba-1 sobre a formação de biofilme de *P. aeruginosa*. 36
- Figura 5.** Efeito citotóxico de diferentes concentrações do peptídeo Raniseptina Ba-1 em cultura de células tumorais HeLa e MCF-7. 36
- Figura 6.** Efeito citotóxico de diferentes concentrações do peptídeo Raniseptina Ba-1 em cultura de células de macrófagos RAW 264.7. Dados foram expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, realizados em triplicata. **** $p < 0.0001$ quando comparado ao controle (*one-way* ANOVA, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni). 37
- Figura 7.** Avaliação do potencial quimiotático da Raniseptina Ba-1. As amostras foram monitoradas/analizadas por um período de 3 horas, com medições realizadas a cada 5 minutos. Condições experimentais: Migração espontânea: neutrófilos em HBSS na câmara superior e HBSS na câmara inferior (C-); Controle positivo (fMLP): neutrófilos em HBSS na câmara superior e fMLP na câmara inferior (C+); Efeito quimiotático do peptídeo: neutrófilos em HBSS na câmara superior e Ranaseptina Ba-1 na câmara inferior (CELL > PEP); Efeito comparativo: neutrófilos incubados com o peptídeo na câmara superior e fMLP na câmara inferior (CELL+PEP > fMLP). 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos complementares à região 3' de RNAs e cDNAs.	31
Tabela 2. Oligonucleotídeos complementares à região 5' de cDNAs que codificam peptídeos antimicrobianos em hílídeos.	31
Tabela 3. Propriedades físico-químicas de Raniseptina Ba-1.	33
Tabela 4. Conteúdo de estrutura α -hélice da Raniseptina Ba-1 em função do aumento das concentrações de TFE e SDS.	35
Tabela 5. Atividade antimicrobiana de Raniseptina Ba-1 (CIM, μ M)	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL – Microlitro

μM – Micromolar

ATCC – *American Type Culture Collection*

CFU – Unidade formadora de colônia

CIM – Concentração inibitória mínima

Da – Daltons

DC – Dicroísmo circular

DMSO – Dimetilsulfóxido

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

fMLP – N-Formilmetionil-leucil-fenilalanina

GRAVY – Índice médio de hidropaticidade

HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution*

IC₅₀ – Concentração inibitória semi-máxima

MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólico

nm – Nanômetro

PAMs – Peptídeos antimicrobianos

RTCA – Analisador de células em tempo real

TFE – Trifluoroetanol

1. INTRODUÇÃO

1.1. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência antimicrobiana (RAM) é a capacidade de microrganismos, como bactérias, fungos e parasitas, de resistirem aos efeitos de medicamentos antimicrobianos, como antibióticos, antifúngicos e antiparasitários. Isso ocorre quando esses patógenos sofrem mutações ou adquirem genes de resistência, tornando-se capazes de sobreviver e se proliferar mesmo na presença de tratamentos que anteriormente seriam eficazes (Laxminarayan *et al.*, 2022). A RAM é uma das maiores ameaças à saúde global, pois compromete a capacidade de tratar infecções, levando ao aumento da morbidade, mortalidade e custos de saúde (Murray *et al.*, 2022).

A resistência antimicrobiana emergiu como uma das maiores ameaças à saúde pública global, impulsionando a necessidade urgente de novos agentes antimicrobianos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a gravidade dessa crise ao listar os patógenos mais preocupantes que requerem o desenvolvimento imediato de novos antibióticos (Mulani *et al.*, 2019). Os patógenos do grupo ESKAPE, que incluem *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*, são particularmente preocupantes devido à sua capacidade de superar os efeitos dos antibióticos comercialmente disponíveis, sendo responsáveis por promoverem a maioria das infecções hospitalares resistentes. Esses patógenos apresentam uma variedade de mecanismos de resistência, como a modificação de alvos, inativação de antibióticos e a utilização de bombas de efluxo para expulsar os agentes antimicrobianos das células bacterianas. A crescente resistência observada nesses patógenos levou à busca por estratégias alternativas, como o uso de terapias adjuvantes que potencializam a ação dos antibióticos convencionais, bem como a investigação de novos compostos naturais e sintéticos com atividade antimicrobiana (Mulani *et al.*, 2019).

A crescente ameaça representada, por exemplo, pela resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa* é um desafio significativo para a saúde pública global. *P. aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa conhecida por sua capacidade de exibir resistência a uma ampla gama de antibióticos, um fenômeno impulsionado por diversos mecanismos, incluindo a

expressão de bombas de efluxo, modificação de alvos para antibióticos e a produção de enzimas que degradam antibióticos, como as β -lactamases. Além disso, apresenta a capacidade de formar biofilmes o que lhes confere resistência aumentada, dificultando a penetração dos antibióticos e facilitando a persistência da infecção. Dada a complexidade da resistência em *P. aeruginosa*, novas abordagens terapêuticas estão sendo exploradas, como a utilização de peptídeos antimicrobianos, bacteriófagos e a inibição de *quorum sensing*, uma estratégia que visa bloquear a comunicação celular bacteriana essencial para a formação de biofilmes (Pang *et al.*, 2019).

Outra preocupação significativa no contexto da resistência antimicrobiana é o problema representado por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). MRSA é responsável por infecções difíceis de tratar devido à sua resistência a vários antibióticos β -lactâmicos, o que limita severamente as opções terapêuticas disponíveis. O mecanismo de resistência em MRSA é principalmente mediado pela proteína PBP2a, que altera o local de ação dos antibióticos β -lactâmicos, impedindo sua ligação e ação bactericida. O problema de MRSA é exacerbado pelo uso indevido de antibióticos em ambientes hospitalares e pela capacidade deste patógeno de se disseminar rapidamente entre pacientes vulneráveis, destacando a necessidade urgente de novas estratégias de controle e tratamento, como o desenvolvimento de novas moléculas antimicrobianas e terapias combinadas (Vestergaard *et al.*, 2019).

A resistência antimicrobiana não apenas complica o tratamento de infecções, mas também aumenta o custo e a duração do tratamento, além de elevar a morbidade e mortalidade associadas. O impacto global é particularmente grave em ambientes hospitalares, onde as infecções por patógenos resistentes levam a longas internações e à necessidade de tratamentos mais agressivos. O uso excessivo e inadequado de antibióticos continua a ser o principal fator impulsionador da seleção de resistência em microrganismos patogênicos. Portanto, é crucial implementar políticas de uso racional de antibióticos, promover a educação sobre o risco da automedicação e reforçar a vigilância e o controle de infecções em ambientes hospitalares para mitigar a propagação desses patógenos resistentes (Pang *et al.*, 2019; Vestergaard *et al.*, 2019).

Milhões de vidas são perdidas anualmente devido a infecções, com a falha dos tratamentos antimicrobianos frequentemente não podendo ser explicada apenas pela

resistência genética. Mecanismos fundamentais, como a formação de biofilmes e a sepse, desempenham papéis cruciais em cenários clínicos onde os antibióticos não são eficazes. Biofilmes, responsáveis por 65% das infecções, apresentam resistência adaptativa a múltiplos fármacos, o que torna os tratamentos atuais ineficazes. A sepse, que contribui para 19,7% de todas as mortes, é outro exemplo em que os antibióticos, apesar de serem a principal terapia, falham em salvar 23% dos pacientes. Além disso, a microbiota subjacente e as terapias dirigidas ao hospedeiro emergem como áreas de pesquisa para enfrentar essa crise crescente. A limitação na disponibilidade de terapias eficazes e a potencial ineficácia de novos antibióticos ressaltam a necessidade urgente de desenvolver novos agentes anti-infecciosos que abordem diretamente a falha terapêutica, para mitigar esse problema persistente, mas cada vez mais grave (de la Fuente-Nunez *et al*, 2023).

Finalmente, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para combater a resistência antimicrobiana é de suma importância. Além de novas moléculas antimicrobianas, a combinação de terapias que utilizam múltiplos mecanismos de ação pode ajudar a reduzir a emergência de resistência. Adicionalmente, a modificação de moléculas existentes para superar a resistência também está sendo explorada. A pesquisa contínua e o desenvolvimento de novas estratégias são essenciais para enfrentar a crescente ameaça da resistência antimicrobiana e proteger a saúde pública global (Mulani *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de novos antibióticos é um processo demorado e caro, com poucos incentivos econômicos para a indústria farmacêutica. Desde 2014, apenas 18 novos antibióticos foram aprovados, destacando a lentidão do progresso frente à crescente ameaça da resistência (Pang *et al.*, 2019). A pesquisa e desenvolvimento de antibióticos exigem um investimento substancial em recursos financeiros e tempo, o que desestimula grandes empresas a investir nesse campo. Além disso, a rápida evolução da resistência em bactérias como *P. aeruginosa* e MRSA limita a eficácia dos novos tratamentos por períodos curtos, aumentando a urgência de se encontrar soluções alternativas (Pang *et al.*, 2019; Vestergaard *et al*, 2019).

A crise dos antibióticos exige um esforço global coordenado, tanto na pesquisa de novos agentes antimicrobianos quanto na implementação de políticas de prevenção e controle da resistência. O desenvolvimento de novas terapias deve ser acompanhado por práticas de

administração, que envolvem o uso prudente e responsável dos antibióticos disponíveis. Além disso, o financiamento adequado e o apoio governamental são essenciais para incentivar a pesquisa e superar os desafios econômicos associados ao desenvolvimento de novos medicamentos. A combinação de novas tecnologias, como a IA, com políticas eficazes de controle de resistência, pode oferecer uma solução viável para mitigar a crescente crise de resistência antimicrobiana e garantir que os tratamentos para infecções bacterianas permaneçam eficazes no futuro (Mulani *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2024).

1.2. ANFÍBIOS

A classe Amphibia é um grupo fascinante de vertebrados que ocupa um lugar crucial na história evolutiva dos animais terrestres. Essa classe é composta por três ordens principais: Anura, Caudata (ou Urodela), e Gymnophiona (ou Apoda). Os anuros, que incluem sapos, rãs e pererecas, são os mais diversos e conhecidos, caracterizados pela ausência de cauda na fase adulta, pernas traseiras longas adaptadas para o salto e um ciclo de vida que geralmente envolve uma fase larval aquática (girino) seguida de uma metamorfose para o estágio adulto terrestre. A ordem Caudata, composta por salamandras e tritões, é identificada pela presença de cauda ao longo da vida, corpos alongados e pernas de tamanho relativamente uniforme. Por fim, os gimnofionos, ou cobras-cegas, são os menos conhecidos e mais enigmáticos, caracterizados por corpos alongados e cilíndricos, semelhantes a serpentes, sem membros, e com uma vida predominantemente subterrânea ou aquática (Duellman & Trueb, 1994; Kardong, 2016). Essas três ordens ilustram a incrível diversidade de formas e modos de vida encontrados dentro da classe Amphibia, refletindo suas adaptações a uma ampla gama de habitats.

Esta classe, do grego *amphi* (ambos) e *βιο*, *bio* (vida), é pertencente a animais do filo Chordata e encontra-se em um grupo taxonômico formado por anuros, cecílias e salamandras. Recebem esse nome pelo fato de possuírem vida dupla: no ambiente aquático e no ambiente terrestre. Os anfíbios passam parte de sua vida no ambiente aquático, onde respiram através de brânquias. Em ambiente terrestre, a respiração é através da pele, que é permeável para que possa ocorrer as trocas gasosas (Kardong, 2016). Como foram os primeiros organismos vertebrados a

ocupar o ambiente terrestre, eles não dispõem de adaptações totalmente efetivas para serem independentes da água. Possuem pele fina, que não os protege contra a desidratação e, em relação aos ovos, se não ficarem em ambientes úmidos ou na água, ressecam. Com isso, possuem uma pele muito sensível, extremamente necessária para sua respiração cutânea, sendo vulnerável a fatores bióticos (microrganismos) e abióticos (resistência a dessecação) (Stebbin & Cohen, 1997).

O Brasil é considerado o país mais rico em biodiversidade do mundo, abrigando mais de 20% do número de espécies existentes no planeta. A classe Amphibia corresponde à classe mais representativa no Brasil, com mais de 1188 espécies já conhecidas, sendo 1144 espécies de anuros (sapos, rãs e pererecas), 39 espécies de ápodas (cecílias) e 5 espécies de caudatas (salamandras) (Segalla *et al.*, 2021). Essa extraordinária diversidade é atribuída à vasta extensão territorial do país, à variedade de biomas, como a Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Caatinga, e às condições climáticas tropicais que favorecem a sobrevivência e a diversificação desses animais. A complexa topografia e a heterogeneidade ambiental do Brasil também desempenham um papel fundamental na promoção de altos níveis de endemismo, com muitas espécies restritas a áreas específicas e isoladas (Silva *et al.*, 2012).

Como forma de proteção, apresentam uma derme rica em peptídeos e compostos bioativos que os auxiliam no sistema de defesa (Mandel, 2008). Além de sua importância ecológica, os anfíbios têm um valor inestimável na farmacologia. As secreções cutâneas de muitas espécies de anuros, por exemplo, contêm uma variedade de compostos bioativos com potencial terapêutico, incluindo antibióticos, analgésicos, e moléculas com atividade anticancerígena. As dermaseptinas, peptídeos antimicrobianos extraídos de rãs do gênero *Phyllomedusa*, têm mostrado promissora atividade contra bactérias resistentes a múltiplas drogas (Bartels *et al.*, 2019). As salamandras, por sua vez, têm uma capacidade de regeneração que desperta grande interesse científico, com pesquisas voltadas para entender os mecanismos celulares e moleculares que permitem a regeneração de membros inteiros, tecidos oculares e até partes do coração (Maden, 2023). Os gimnofionos, embora menos estudados, também possuem secreções com potenciais propriedades farmacológicas, ainda em fase de descoberta (Benítez-Prián *et al.*, 2024). Portanto, a classe Amphibia não só oferece *insights* valiosos para a biologia

evolutiva e ecológica, mas também representa uma fonte rica de compostos bioativos que podem ser explorados para o desenvolvimento de novos medicamentos, sublinhando a importância de sua conservação em face das crescentes ameaças ambientais.

1.3. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS COMO ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS FRENTE À CRISE DOS ANTIBIÓTICOS

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas de defesa encontradas em uma ampla variedade de organismos, desde bactérias até seres humanos. Esses peptídeos desempenham um papel crucial na imunidade inata, oferecendo uma primeira linha de defesa contra infecções microbianas. Eles são geralmente curtos, compostos por 12 a 50 aminoácidos, e apresentam uma estrutura anfipática que lhes permite interagir com membranas celulares, o que é essencial para sua atividade antimicrobiana. A maioria dos PAMs atua diretamente sobre a membrana dos patógenos, formando poros ou desestabilizando a membrana, levando à morte celular. Além disso, alguns peptídeos podem interferir na síntese de proteínas, ácidos nucleicos ou outras funções intracelulares essenciais dos microrganismos, além de apresentarem efeitos imunomoduladores (Luo & Song, 2022; Duarte-Mata & Salinas-Carmona, 2023).

No contexto da crise atual dos antibióticos, os PAMs têm ganhado destaque como potenciais alternativas ou complementos aos antibióticos convencionais. A resistência antimicrobiana, considerada uma das maiores ameaças à saúde pública global, tem levado à ineficácia de muitos antibióticos tradicionais. Os PAMs, com seus mecanismos de ação variados e muitas vezes diferentes dos antibióticos tradicionais, oferecem uma solução promissora. Eles têm a vantagem de atuar rapidamente sobre os patógenos e de possuir uma baixa propensão a induzir resistência, uma vez que seu alvo principal é a membrana celular, uma estrutura fundamental e menos susceptível a mutações que conferem resistência (Magana *et al.*, 2020; Erdem Büyükkiraz; Kesmen, 2022; Li *et al.*, 2022; Xuan *et al.*, 2023).

O mecanismo de ação dos PAMs é complexo e pode envolver a interação direta com as membranas celulares bacterianas, a desestabilização da integridade dessas membranas e a translocação para o interior da célula para interferir em processos vitais, como a síntese de proteínas e de ácidos nucleicos (Conlon, 2011; Patocka *et al.*, 2019). Além de seus efeitos

antimicrobianos diretos, os PAMs apresentam uma ampla variedade de propriedades terapêuticas, incluindo atividades antibiofilme, imunomoduladora, anti-inflamatória, cicatrizante, metabólica e anticâncer (Figura 1). Sua capacidade de desestabilizar membranas bacterianas os torna eficazes contra patógenos multirresistentes, enquanto suas funções imunomoduladoras ajudam a regular as respostas imunes do hospedeiro, reduzindo a inflamação excessiva (Chen *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2023).

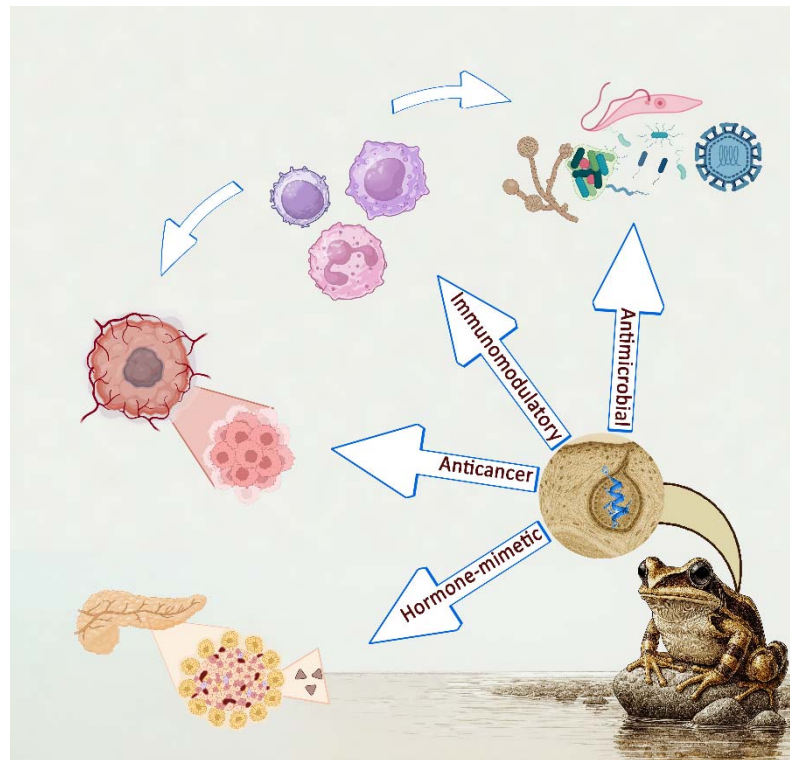


Figura 1. Principais efeitos biológicos dos PAMs de anuros (Ferreira *et al.*, 2025).

Os PAMs são geralmente classificados de acordo com sua estrutura secundária: 1) folha- β , 2) α -hélice e 3) peptídeos lineares ou estendidos. A maioria dos PAMs apresenta características catiônicas e anfipáticas, fatores importantes para a ligação desses PAMs às membranas dos microrganismos (Bechinger & Gorr, 2017). As características dos PAMs normalmente implicam no modo de ação em que essas moléculas se ligam na membrana dos microrganismos. Esses mecanismos de ação são: *carpet-like*, *barrel-stave* e poro toroidal (Figura 2A, 2B e 2C, respectivamente).

1.3.1. Modelo *carpet-like*

No modelo de *carpete*, peptídeos carregados positivamente ligam-se a regiões negativas da membrana, alinhando-se paralelamente à sua superfície e revestindo-a. As regiões hidrofóbicas interagem com o núcleo lipídico, enquanto as polares se ligam aos grupos carregados, induzindo curvatura na bicamada. O acúmulo de PAMs gera tensão, desestabilizando o empacotamento lipídico e comprometendo a integridade da membrana. Isso leva à formação de micelas mistas peptídeo-lipídio, em um mecanismo semelhante ao de detergentes, no qual alta densidade de peptídeos provoca micelização e lise celular (Oren & Shai, 1998; Teixeira *et al.*, 2012) (Figura 2A).

1.3.2. Modelo *barrel-stave*

O mecanismo *barrel-stave* é uma estratégia usada por peptídeos antimicrobianos (PAMs) para desestabilizar membranas bacterianas. Esse modelo envolve três passos: ligação dos monômeros na membrana; inserção na membrana para formação de poros e recrutamento de monômeros para aumentar o poro (Brogden, 2005; Matsuzaki, 2019). No modelo *barrel-stave*, os peptídeos se ligam à membrana alvo e se conectam entre eles para formar poros transmembrana revestido por esses peptídeos. Nessa estrutura de poro, os peptídeos estão dispostos com suas faces hidrofóbicas voltadas para o núcleo lipídico da membrana e suas regiões hidrofílicas orientadas para o interior do poro. Essa configuração provoca o vazamento do conteúdo celular, resultando, por fim, na morte da célula (Mahlapuu *et al.*, 2016) (Figura 2B).

1.3.3. Modelo poro toroidal

O modelo de poro toroide, semelhante ao *barrel-stave*, distingue-se pela cooperação direta entre lipídios e peptídeos. Nesse mecanismo, os PAMs induzem curvatura lipídica, dobrando as monocamadas para dentro e formando poros preenchidos por água, revestidos por peptídeos e grupos polares lipídicos, como a fosfatidilcolina. As regiões hidrofóbicas dos peptídeos interagem com as caudas lipídicas, enquanto as hidrofílicas estabilizam o interior do poro. Esse arranjo afina a membrana, reduz a energia de formação do poro e favorece uma interação peptídeo-membrana mais fluida, aumentando a eficiência da lise celular (Teixeira *et al.*, 2012; Mahlapuu *et al.*, 2016; Matsuzaki, 2019) (Figura 2C).

1.3.4. Modelo de Shai-Huang-Matsuzaki

O modelo de Shai-Matsuzaki-Huang (Figura 3) integra mecanismos prévios, propondo que PAMs atuam por interações dinâmicas e dependentes da concentração, moduladas pelas propriedades da membrana. Inicialmente, ligam-se eletrostaticamente a fosfolipídios aniônicos e inserem domínios hidrofóbicos na bicamada, alinhando-se paralelamente. Ao atingir concentração crítica, sofrem mudança conformacional, inserindo-se perpendicularmente e formando poros toroides transitórios. Em altas concentrações, atuam como detergentes, dissolvendo a membrana; em baixas, causam perturbações temporárias que permitem translocação sem lise imediata, atingindo alvos intracelulares como DNA. A formação transitória de poros facilita a penetração, sendo influenciada por propriedades dos peptídeos e composição da membrana. O modelo explica a seletividade antimicrobiana e a baixa toxicidade para células do hospedeiro (Zasloff, 2002; Giuliani *et al.*, 2008).

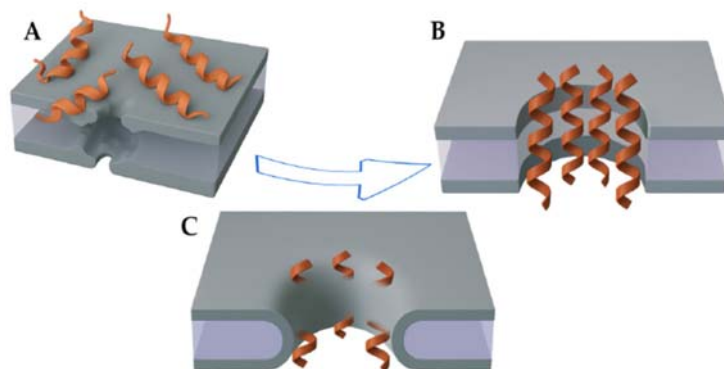


Figura 2. Modos de ação dos PAMs sobre membranas bacterianas (Ferreira *et al.*, 2025).

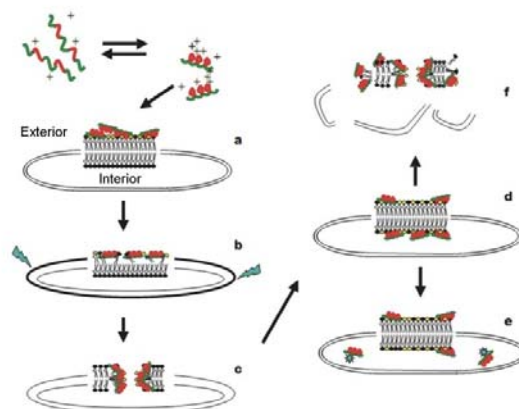


Figura 3. Modelo de Shai-Matsuzaki-Huang de ação de peptídeos antimicrobianos (Figura modificada de Zasloff, 2002).

As secreções cutâneas de anfíbios, especialmente de espécies da ordem Anura, são ricas fontes de peptídeos antimicrobianos e têm sido objeto de intensas pesquisas devido ao seu potencial terapêutico. Esses peptídeos são secretados principalmente pelas glândulas granulosas da pele e atuam como a primeira linha de defesa dos anuros em ambientes úmidos e ricos em patógenos. Muitos desses peptídeos demonstraram uma ampla gama de atividades terapêuticas, incluindo efeitos antimicrobianos, anticâncer, imunomoduladores e de regulação metabólica, tornando-os candidatos promissores para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Libério *et al.*, 2011; Oelkrug & Hartke, 2015; Guimarães *et al.*, 2016; Pantic *et al.*, 2017; Conlon *et al.*, 2018; Patoka *et al.*, 2019; de Amaral & Ienes-Lima, 2022).

Entre as principais famílias de peptídeos antimicrobianos de anuros, destacam-se as dermaseptinas, brevininas e temporinas. As dermaseptinas, por exemplo, foram inicialmente isoladas de rãs do gênero *Phyllomedusa* e são conhecidas por sua potente atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de fungos e protozoários (Azevedo Calderon *et al.*, 2011; Bartels *et al.*, 2019). As brevininas, encontradas em rãs do gênero *Rana*, apresentam atividade antibacteriana e antifúngica, enquanto as temporinas, também provenientes de rãs do gênero *Rana*, são notáveis por sua eficácia contra bactérias Gram-positivas (Zohrab *et al.*, 2019). As temporinas são peptídeos antimicrobianos que têm como alvo principal bactérias Gram-positivas, incluindo linhagens multi-resistentes (D'Andrea & Romanelli, 2023). A diversidade e a eficácia desses peptídeos fazem deles uma fonte promissora para a descoberta de novos medicamentos antimicrobianos.

Desse modo, os peptídeos antimicrobianos representam uma classe diversificada e poderosa de moléculas defensivas que têm um papel crucial no combate à resistência antimicrobiana. Sua capacidade de atuar sobre diferentes patógenos, aliada à baixa propensão para o desenvolvimento de resistência, torna-os candidatos ideais para o desenvolvimento de novas terapias. No caso específico dos anuros, os PAMs encontrados em sua pele destacam-se por sua atividade abrangente e versatilidade, oferecendo uma rica fonte de novos agentes terapêuticos em um momento crítico de crise global dos antibióticos.

1.4. POTENCIAL TERAPÊUTICO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANUROS DO GÊNERO *Boana*

O gênero *Boana* (anteriormente denominado *Hypsiboas*) foi reclassificado com base em uma análise taxonômica abrangente conduzida por Dubois (2017). Essa atualização representa um avanço no entendimento da diversidade e das relações filogenéticas na família *Hylidae*. A adoção do nome *Boana* não apenas corrige a nomenclatura anterior, mas também evidencia a importância das revisões taxonômicas contínuas para alinhar a classificação das espécies à sua história evolutiva e diversidade biológica (Dubois, 2017). Dessa forma, esta revisão inclui também peptídeos originalmente descritos em espécies de *Hypsiboas*, agora reclassificadas como *Boana*.

Os anuros do gênero *Boana* pertencem à família *Hylidae* e estão amplamente distribuídos em regiões tropicais e subtropicais das Américas, habitando principalmente florestas úmidas próximas a corpos d'água. Esses anfíbios apresentam grande diversidade morfológica e ecológica, com variações de tamanho, forma e padrões de coloração frequentemente relacionadas a adaptações aos respectivos habitats (Faivovich *et al.*, 2018). As cores vibrantes presentes em algumas espécies podem atuar como mecanismo de defesa, sinalizando toxicidade ou afastando predadores (Duellman & Trueb, 2019). Morfologicamente, as espécies de *Boana* possuem discos adesivos nos dedos, que facilitam a locomoção em superfícies verticais e na vegetação, além de membros longos que auxiliam no salto e na captura de presas (Haddad *et al.*, 2013). Sua dieta é predominantemente insetívora, composta principalmente por pequenos invertebrados encontrados em seus habitats naturais. Durante a estação reprodutiva, muitas espécies de *Boana* exibem comportamentos complexos, como vocalizações específicas usadas para atrair parceiros e defender territórios de reprodução (Köhler *et al.*, 2017).

Estudos recentes indicam significativa variabilidade genética dentro do gênero *Boana*, sugerindo uma história evolutiva diversa e adaptações a múltiplos nichos ecológicos (Fouquet *et al.*, 2018). Essas características tornam *Boana* um gênero de grande interesse para estudos sobre evolução e ecologia de anfíbios, contribuindo de forma relevante para a compreensão da biodiversidade e das estratégias adaptativas desses animais.

Pesquisas sobre peptídeos antimicrobianos extraídos da pele de anuros têm revelado uma riqueza de compostos com propriedades promissoras contra patógenos bacterianos, virais e fúngicos. O gênero *Boana* (anteriormente conhecido como *Hypsiboas*) destaca-se como uma excelente fonte de PAMs.

Hylaseptin P1 (HSP1), peptídeo α -helicoidal anfipático de 14 resíduos isolado de *Boana punctata*, apresentou atividade antimicrobiana comparável a antibióticos comerciais, com CIMs de 6,1 μ M (*S. aureus*), 24,4 μ M (*E. coli*) e 48,8 μ M (*P. aeruginosa*), além de inibir *Candida* spp. mais eficazmente que o fluconazol. Mostrou baixa hemólise ($\leq 5\%$ a 195,2 μ M) e mínima citotoxicidade (Prates *et al.*, 2004). Junior *et al.* (2017) sintetizaram derivados glicotriazolados de HSP1 com maior capacidade de ruptura de membranas, atividade antifúngica aprimorada e forte inibição da biossíntese de ergosterol em *Candida albicans*, associadas a interações específicas do anel sacarídico e grupos triazol/monossacarídeo.

Também foi identificada, na secreção cutânea de *Boana raniceps*, uma nova família de PAMs denominada raniseptinas. Nove cDNAs foram clonados e sequenciados, revelando peptídeos semelhantes às dermaseptinas, processados pós-traducionalmente em fragmentos inativos, possivelmente para reduzir toxicidade ou atuar na defesa contra predadores. A raniseptina-1 (Rsp-1), mais abundante na espécie, apresentou CIMs de 5 μ M (*E. coli*), 10 μ M (*P. aeruginosa*) e 20 μ M (*S. aureus*), com fragmentos pouco ativos, exceto contra *Xanthomonas axonopodis*. Os fragmentos apresentaram baixa hemólise, enquanto a Rsp-1 íntegra causou 20% a 80 μ M. Imagens de MALDI *imaging* indicaram armazenamento do peptídeo intacto e clivagem pós-secreção (Magalhães *et al.*, 2008).

Em *B. raniceps*, Popov *et al.* (2019) isolaram AC12, DK16 e RC11: apenas RC11 foi ativo contra *E. coli*. AC12 apresentou baixa toxicidade e eficácia anti-inflamatória em modelos *in vivo*, destacando-se como potencial terapêutico.

A figainina 1, novo peptídeo de *B. raniceps*, apresentou forte atividade antibacteriana contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (CIM: 2–16 μ M), exceto *P. aeruginosa* e *Candida*, mas mostrou efeito antiparasitário contra *T. cruzi* (IC₅₀ = 15,9 μ M) e citotoxicidade para fibroblastos e linhagens tumorais (Santana *et al.*, 2020a). O peptídeo figainina 2 exibiu amplo espectro de ação (antimicrobiana, antiparasitária, antiviral e

imunomoduladora), com destaque para *K. pneumoniae* multirresistente, *S. epidermidis* e *E. casseliflavus*, além de ação contra *T. cruzi* (IC₅₀ = 6,32 µM), câncer e vírus (CHIKV, DENV4, YFV), embora apresente hemólise moderada (Santana *et al.*, 2020b). Raniseptinas-3 e -6 apresentaram alta atividade contra bactérias Gram-negativas e cepas resistentes, baixa hemólise, mas citotoxicidade para fibroblastos e células tumorais murinas (Freitas *et al.*, 2023).

Da espécie *B. albopunctata* foi isolada a Hylina a1, com amplo espectro antimicrobiano e alta hemólise (Castro *et al.*, 2009). Estratégias como conjugação RGD e acoplamento a sílica reduziram toxicidade e aumentaram seletividade antitumoral (Cao *et al.*, 2017). Hylin-a1 também atuou contra *S. aureus* multirresistente, modulou citocinas inflamatórias e exibiu ampla atividade antiviral (incluindo SARS-CoV-2 e herpesvírus), com baixa hemólise e efeito sinérgico com aciclovir (Chianese *et al.*, 2023a; Chianese *et al.*, 2023b; Chianese *et al.*, 2023c; Chianese *et al.*, 2024).

Outros estudos destacaram peptídeos de *B. pulchella* (P1-Hp-1971, P2-Hp-1935 e P3-Hp-1891), ativos contra *E. coli* e *S. aureus* (Siano *et al.*, 2014); o Hs-1, de *B. semilineata*, seletivo para Gram-positivas e com atividade antiviral contra DENV-2 e DENV-3 (Nacif-Marçal *et al.*, 2015; Monteiro *et al.*, 2018); a família das pugninas, de *B. pugnax*, com ação antibacteriana e anticâncer (Liscano *et al.*, 2021); o hylaseptina-4, de *B. punctata*, com atividade dependente de pH (Nunes *et al.*, 2021); picturinas e pictuseptinas, de *B. picturata*, com amplo espectro antimicrobiano (Morán-Marcillo *et al.*, 2022); peptídeos de *B. boans*, como figainina 2BN, ativos, porém sem seletividade para células tumorais (Conlon *et al.*, 2023); e compostos de *B. platanera* (figainina 2PL, hylina PL, raniseptina PL, plasticina PL e peptídeo YL), com ação antimicrobiana, citotóxica para células tumorais e estímulo à liberação de insulina (Conlon *et al.*, 2024).

Esses estudos reforçam o potencial terapêutico dos peptídeos derivados de *Boana*, abrangendo aplicações antimicrobianas, antivirais, anticâncer, de regulação metabólica e imunomoduladoras.

2. JUSTIFICATIVA

O Brasil ocupa a primeira colocação na relação de países com maior riqueza de anfíbios, sendo o país com a maior biodiversidade de anfíbios do planeta, onde 60% das espécies de anuros são endêmicas. Já é sabido que a secreção cutânea de anuros contém uma ampla gama de classes de biomoléculas e metabólitos secundários, proteínas e peptídeos. Vários dos compostos presentes na secreção de anuros tem propriedades antimicrobianas com potencial para sua utilização terapêutica em humanos, gerando forte interesse voltado às pesquisas por novos agentes para o tratamento de infecções, principalmente àquelas causadas por microrganismos multirresistentes.

A exploração da fauna de anuros brasileira para a busca de novos peptídeos antimicrobianos (PAMs) é de extrema importância devido à rica biodiversidade e à necessidade crescente de novas alternativas terapêuticas frente à resistência antimicrobiana global. O Brasil, com sua vasta diversidade de anuros, oferece um ambiente único para a descoberta de PAMs com potencial terapêutico inexplorado. Estudos têm evidenciado que tais peptídeos apresentam uma ampla gama de atividades antimicrobianas, incluindo eficácia contra bactérias resistentes e patógenos virais como o SARS-CoV-2 que podem ser fundamentais para o desenvolvimento de novos medicamentos. A diversidade química dos PAMs derivados de anuros oferece um arsenal de moléculas com diferentes mecanismos de ação, o que pode levar à descoberta de agentes terapêuticos inovadores para o tratamento de infecções difíceis de tratar com os antibióticos atuais. Além disso, os PAMs de anuros podem apresentar propriedades adicionais, como a capacidade de modular o sistema imune e promover a cicatrização de tecidos. Essas características são valiosas no contexto de doenças infecciosas e inflamatórias, proporcionando um potencial terapêutico além da simples atividade antimicrobiana. A coleta e a análise sistemática das secreções cutâneas de anuros são essenciais para identificar e caracterizar esses peptídeos. Além disso, o estudo dos mecanismos de ação dos PAMs de anuros pode revelar novas estratégias para superar a resistência antimicrobiana. Investir na pesquisa da fauna de anuros brasileira não apenas contribuirá para o avanço da ciência farmacológica, mas também ajudará na preservação e valorização da biodiversidade, promovendo a conservação desses animais e seus habitats.

A utilização de bibliotecas de cDNAs é crucial para a descoberta de novos peptídeos antimicrobianos em anuros, pois permite a identificação e caracterização de genes que codificam para essas moléculas bioativas. A construção de bibliotecas de cDNAs a partir das secreções cutâneas de anuros possibilita a clonagem e a expressão dos genes responsáveis pela produção de PAMs, facilitando a triagem de peptídeos com potenciais atividades antimicrobianas e antivirais. Essa abordagem tem sido utilizada com sucesso para isolar e identificar PAMs promissores com propriedades terapêuticas.

Assim, o uso de bibliotecas de cDNAs é uma ferramenta poderosa na busca por novos PAMs e reforça a importância de continuar explorando a fauna de anuros para o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas e antivirais.

Sendo assim, o presente estudo justifica-se ao pretender avaliar as propriedades biológicas de um peptídeo antimicrobiano derivado do banco de cDNAs de *Boana albopunctata* (Rocha, 2019), aumentando o leque de possíveis opções terapêuticas no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas.

3. OBJETIVO GERAL E METAS ESTABELECIDAS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente projeto teve por objetivo geral a caracterização das propriedades biológicas de uma raniseptina, denominada raniseptina Ba-1, identificada a partir de um banco de cDNAs obtido da pele do anuro *Boana albopunctata*.

3.2. METAS ESTABELECIDAS

3.2.1. Avaliar a composição de elementos de estrutura secundária do peptídeo raniseptina Ba-1 por meio de dicroísmo circular;

3.2.2. Avaliar os efeitos antimicrobianos do peptídeo raniseptina Ba-1 sobre bactérias planctônicas patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas;

3.2.3. Avaliar os efeitos inibitórios do peptídeo raniseptina Ba-1 sobre linhagem bacteriana produtora de biofilme;

3.2.4. Avaliar os efeitos citotóxicos do peptídeo raniseptina Ba-1 sobre linhagens tumorais (HeLa e MCF-7);

3.2.5. Avaliar os efeitos citotóxicos do peptídeo raniseptina Ba-1 sobre macrófagos RAW 264.7;

3.2.6. Avaliar os efeitos do peptídeo raniseptina Ba-1 sobre a quimiotaxia de neutrófilos humanos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia, os resultados e a discussão estão estruturados em formato de artigo científico, seguindo as normas de formatação do periódico *Biomolecules* (<http://www.mdpi.com/journal/biomolecules>). O texto encontra-se redigido em língua portuguesa, com exceção do título e do *abstract*. A versão integral em língua inglesa será preparada em etapa posterior para fins de submissão.

Article

Biological Characterization of a Novel Antimicrobial Peptide Identified from a Skin-Secretion-Derived cDNA Library of the Frog *Boana albopunctata*

Priscila Mendes Ferreira ^{1,2}, Mariah Ribeiro Rocha ^{1,2}, Carlos José Correia de Santana ¹, Joyce Silva dos Santos ^{1,2}, Brunna de Oliveira Silva ^{1,2}, Fernando Torres Araripe ³, Éder Alves Barbosa ⁴, José R. S. A. Leite ⁴, Bruna Gomes ¹, Keven Maciel ¹, Lucas Fontes ⁵, Isabelle Souza Luz ², Izadora Cristina Moreira de Oliveira ⁶, Sonia Maria de Freitas ⁶, Ricardo Bentes de Azevedo ⁷, Osmino Rodrigues Pires Júnior ¹, Wagner Fontes ² and Mariana S. Castro ^{1,2,*}

¹ Laboratory of Toxinology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70.910-900, Brazil

² Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70.910-900, Brazil

³ Laboratory of Molecular Biology, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70.910-900, Brazil

⁴ Research Center in Morphology and Applied Immunology, NuPMIA, Faculty of Medicine, University of Brasilia, UnB, Brasilia 70910-900, DF, Brazil.

⁵ Physics Institute, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70.910-900, Brazil

⁶ Laboratory of Biophysics, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70.910-900, Brazil

⁷ Laboratory of Nanobiotechnology, Department of Morphology and Genetics, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70.910-900, Brazil

* Correspondence: mscastro@unb.br

Abstract:

Antimicrobial peptides (AMPs) are small bioactive molecules that play a crucial role in the innate immune system of a wide range of organisms, including plants, insects, and vertebrates. They possess direct activity against pathogenic microorganisms—such as bacteria, fungi, protozoa, and viruses—and, in some cases, also act on tumor cells. Among the most studied AMPs are those isolated from the skin secretions of anurans (frogs, toads, and tree frogs), which are noteworthy for their broad-spectrum antimicrobial action and remarkable therapeutic potential. These peptides are synthesized and stored in the cutaneous granular glands of anurans, where they function as part of the animal's first line of defense in environments rich in pathogens. Their mechanisms of action involve direct interaction with the cell membranes of microorganisms, leading to membrane destabilization, permeabilization, and eventual cell death. In addition, many AMPs can penetrate cells and act on intracellular targets essential for microbial viability, further broadening their antimicrobial range. The therapeutic relevance of anuran AMPs is amplified by the urgent global challenge posed by the rise of multidrug-resistant pathogens. Their proven ability to remain effective against strains resistant to conventional antibiotics makes them promising candidates for the development of novel anti-infective agents. Moreover, research has highlighted their immunomodulatory, anti-inflammatory, and wound-healing properties, opening possibilities for their application in treating infectious diseases, accelerating tissue regeneration, and even combating emerging viral infections, such as COVID-19. This versatility positions anuran-derived AMPs as valuable tools in modern medicine, with potential applications that go far beyond traditional antimicrobial therapy. In the present work, a raniseptin identified from a cDNA library produced from the skin of the anuran *Boana albopunctata* was synthesized by chemical synthesis using the Fmoc technique. This peptide, called Raniseptin Ba-1, showed high similarity to raniseptins isolated from the species *Boana raniceps*. In assays of antimicrobial activity, it was shown to be capable of inhibiting the growth of several pathogenic bacteria and also inhibiting the formation of biofilm by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*.

It exhibited cytotoxic effects in RAW 264.7 macrophage cultures, cancer cell lines HeLa and MCF-7. The peptide was able to alter the neutrophil migration rate. In circular dichroism analyses, the peptide was able to adopt an α -helical conformation in the presence of trifluoroethanol and SDS. In conclusion, Raniseptin Ba-1 exhibited antimicrobial activity and α -helical conformation, as well as cytotoxic and immunomodulatory effects in cell cultures, suggesting its therapeutic potential as an antimicrobial agent.

Keywords: Anurans; *Boana albopunctata*; Antimicrobial peptides; Biological properties; Therapeutic potential.

1. Introdução

A resistência antimicrobiana (RAM) é a capacidade de microrganismos (bactérias, fungos e parasitas) de sobreviver à ação de antimicrobianos antes eficazes, resultado de mutações ou aquisição de genes de resistência (Laxminarayan et al., 2022). Trata-se de uma das maiores ameaças à saúde global, elevando morbidade, mortalidade e custos de saúde (Murray et al., 2022). A OMS destacou patógenos críticos, como o grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.), pela elevada resistência a antibióticos e relevância em infecções hospitalares (Mulani et al., 2019).

Além da resistência genética, fatores como biofilmes — responsáveis por 65% das infecções — e sepse (19,7% das mortes) contribuem para falhas terapêuticas (de la Fuente-Nunez et al., 2023). Estratégias incluem novas moléculas, terapias combinadas e modificação de compostos existentes. Contudo, o desenvolvimento de antibióticos é lento e caro, com poucos incentivos: desde 2014, apenas 18 novos antibióticos foram aprovados (Pang et al., 2019).

Os anfíbios (classe Amphibia), anuros, caudados e gimnofionos, possuem pele permeável e sensível, contendo glândulas que secretam compostos bioativos, incluindo peptídeos antimicrobianos (PAMs), que atuam na defesa contra microrganismos (Mandel, 2008). O Brasil abriga a maior diversidade mundial, com mais de 1188 espécies (Segalla et al., 2021). Esses peptídeos despertam interesse farmacológico por sua ação antimicrobiana, analgésica, anticâncer e imunomoduladora (Azevedo Calderon et al., 2011; Zohrab et al., 2019). Os PAMs, geralmente catiônicos e anfipáticos, interagem com membranas microbianas formando poros ou desestabilizando a bicamada lipídica, permitindo sua translocação para o interior da célula para interferir em processos vitais, como a síntese de proteínas e de ácidos nucleicos. Podem atuar pelos modelos *barrel-stave*, poro toroidal, *carpet-like* e Shai–Matsuzaki–Huang (Brogden, 2005; Matsuzaki, 2019; Oren & Shai, 1998; Zasloff, 2002).

Pesquisas sobre peptídeos antimicrobianos extraídos da pele de anuros têm revelado uma riqueza de compostos com propriedades promissoras contra patógenos bacterianos, virais e fúngicos. O gênero *Boana* (anteriormente conhecido como *Hypsiboas*) destaca-se como uma excelente fonte de PAMs com propriedades terapêuticas promissoras (Santana et al., 2020a; Chianese et al., 2023a; Chianese et al., 2023b; Chianese et al., 2023c; Chianese et al., 2024; Morán-Marcillo et al., 2022; Conlon et al., 2023; Conlon et al., 2024).

No presente trabalho, foi descrita a caracterização das propriedades biológicas de um novo peptídeo antimicrobiano, denominado Raniseptina Ba-1 obtido de uma biblioteca de cDNAs produzida a partir da pele da rã *Boana albopunctata*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Construção de banco de cDNA de precursores de PAMs expressos no tegumento do anuro *B. albopunctata*

Três exemplares de *B. albopunctata* foram eutanasiados, e o tecido cutâneo dorsal foi dissecado, pulverizado em nitrogênio líquido e submetido à extração de RNA com Trizol. A integridade foi avaliada em gel de agarose 1% e a quantificação realizada em espectrofotômetro NanoDrop. O cDNA foi sintetizado a partir de 2 μ L de RNA com SuperScript III e utilizado como molde em PCR com MyTaq DNA polimerase.

Oligonucleotídeos degenerados e específicos (Tabelas 1 e 2) foram empregados para amplificação das regiões-alvo. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e fragmentos de 250–400 pb foram purificados com Wizard SV Gel and PCR CleanUp System.

Células competentes de *E. coli* DH5 α (50 μ L) foram transformadas com 10 μ L de DNA plasmidial por choque térmico (42 °C, 60 s) e recuperadas em meio SOC a 37 °C por 1 h. Os transformantes foram selecionados em placas de LB-ágar contendo ampicilina (100 μ g/mL), X-Gal (40 μ g/mL) e IPTG (24 μ g/mL). Após incubação

(37 °C, 18 h), colônias brancas foram inoculadas em placas de 96 poços contendo meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e cultivadas a 37 °C, 300 rpm, por ~18 h.

Tabela 1. Oligonucleotídeos complementares à região 3' de RNAs e cDNAs.

Nome	Sequência (5'-3')	Aplicação
NOT-1-Primer	GACTAGTTCTAGATCGCGAGCGGCC GCCC(T)15	Síntese de cDNA para uso em PCR convencional
NOT-1-Reverse	TCGCGAGCGGCCGCCCTTTTT	PCR

Tabela 2. Oligonucleotídeos complementares à região 5' de cDNAs que codificam peptídeos antimicrobianos em hilídeos.

Nome	Sequência
PPS1	ATG GCT TTC CTG AAR AAR TCB CTT TTY CTT GTA CTA TTC CTT GS
PPS1A	ATG GCT TTC CTG AAG AAA TCT CTT TTC CTT GTA CTA TTC CTC GG
PPS2	ATG GCT TTC CTG AAR AAR TCB CTT TTY CTT GTA TTA TTT CTC GG
PPS2A	ATG GCT TTC CTG AAG AAA TCT CTT TTC CTT GTA TTA TTT CTC GC

Os plasmídeos foram isolados e sequenciados (Myleus Biotechnology, Brasil) pelo método de Sanger, utilizando o primer M13 Forward (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'). As sequências obtidas foram analisadas com EditSeq e SeqMan (DNASTAR, EUA), alinhadas com Clustal W e comparadas por similaridade via FASTA 3 (ExpASy) (<http://ca.expasy.org/>).

2.2. Síntese química

O peptídeo identificado a partir do banco de cDNAs foi produzido por síntese química em fase sólida por estratégia Fmoc pela empresa especializada Genone (<https://www.genone.com.br/>).

2.3. Quantificação empregando espectroscopia UV

As amostras peptídicas foram quantificadas com o emprego de espectroscopia UV nos comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm como descrito por Aitken & Learmonth (1996) em espectrofotômetro (UV-M51, Bel Photonics, Brazil). Em seguida, as amostras foram alíquotadas, secas em concentrador a vácuo (SpeedVac Modelo SC100, Savant) e armazenados a -20 °C até o momento de sua utilização.

2.4. Análises computacionais

As buscas de similaridades foram realizadas com BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para o alinhamento múltiplo das sequências, foi utilizada a ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo?stype=protein>). A projeção em roda helicoidal foi realizada empregando NetWheels (<http://tools.alanmol.com.br/NetWheels/>) (Mor; Castro; Fontes, 2018). Os parâmetros físicos-químicos para o peptídeo foram calculados com as ferramentas Compute pI/Mw (https://web.expasy.org/compute_pi/), ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) e PepCalc.com - Peptide property calculator (<https://pepcalc.com/>).

2.5. Análise por dicroísmo circular

O conteúdo da estrutura secundária da raniseptina Ba-1 foi avaliado por Dicroísmo Circular (CD) utilizando o Espectropolarímetro J-815 (Jasco Analytical Instruments, Tóquio, Japão), equipado com um sistema de controle de temperatura Peltier conectado a uma bomba de água (Jasco Analytical Instruments, Tóquio, Japão). Os espectros de CD no Far-UV do peptídeo, na faixa de 190 a 260 nm a 25 °C, foram registrados utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm, a uma concentração de 7,01 µM (0,022 mg/mL), em água e na presença de diferentes concentrações de SDS (0,1, 1 e 10 mM) e TFE (10, 20 e 50%), como mimetizador de membrana. Os parâmetros de varredura contínua foram: passo de dados de 0,2 nm, sensibilidade padrão, largura de banda de 0,85 nm, tempo de integração digital de 0,5 s e velocidade de varredura de 100 nm/min. Os

espectros de CD foram obtidos a partir da média de cinco leituras consecutivas e da subtração dos valores do sinal dicróico do espectro controle, sem a presença do peptídeo, utilizado como branco. Os valores de elipticidade (mdeg) foram convertidos para elipticidade molar (θ) ($\text{graus}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) com base na massa molecular média por resíduo de 115 Da. O conteúdo da estrutura secundária α -hélice em diferentes condições foi estimado considerando os valores de elipticidade molar ($\text{graus}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) em λ 222 nm.

2.6. Atividade antimicrobiana

Para a determinação da CIM, foram avaliados os efeitos antimicrobianos em seis bactérias sensíveis: três Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29292), e três Gram-negativas, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Os ensaios antibacterianos foram realizados de acordo com o CLSI M7-A6, com algumas modificações. Resumidamente, as culturas bacterianas foram cultivadas em 7 mL de meio Mueller Hinton (MH) (HiMedia, Mumbai, Maharashtra, Índia) sob agitação contínua a 37 °C até que a densidade óptica (DO) a 625 nm atingisse o intervalo de 0,08–0,1. Em seguida, as culturas foram diluídas 1:10 em meio MH, e o inóculo foi preparado por nova diluição dessa suspensão na proporção de 1:20 (5×10^5 células/mL). Cada fração foi dissolvida em água Milli-Q, e 50 μL da solução preparada foram transferidos para os poços de uma microplaca de fundo chato. Um volume igual (50 μL) da suspensão bacteriana foi então adicionado. Após incubação a 37 °C por 24 horas, as leituras de DO a 625 nm foram registradas utilizando um leitor de microplacas Multiskan® FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). Como controles, formaldeído a 0,8% (v/v) foi usado para representar ausência de crescimento bacteriano, enquanto água Milli-Q serviu como referência para crescimento total (100%), ambos incubados junto às suspensões bacterianas. A CIM foi determinada como a menor concentração sem crescimento detectável espectrofotometricamente.

2.7. Avaliação dos efeitos da Raniseptina Ba-1 sobre a inibição da formação de biofilme

O ensaio de inibição de biofilme foi realizado e o biofilme corado com cristal violeta. Para avaliar a atividade inibitória dos PAMs foi selecionada a bactéria formadora de biofilme *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 cultivada 7 mL de caldo de soja tríplico suplementado com 2,5 g/L de dextrose pH 7,3 a 37 °C até a densidade óptica igual a 1 em 620 nm em espectrofotômetro (UV-VIS Spectrophotometer UV-M51 Bel Photonics, Itália). Em fase logarítmica a suspensão de bactérias foi diluída na proporção de 1:100 para uma concentração final de aproximadamente 1×10^6 CFUs. O peptídeo foi incubado em microplacas de 96 poços em diluição seriada e 50 μL da suspensão de bactérias foram adicionados para um volume final de 100 μL /poço. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas para formação e adesão do biofilme na placa. Os controles para ausência de crescimento utilizaram 50 μL formaldeído 0,8% (v/v) e 50 μL de água deionizada estéril como controle de crescimento pleno. Completado o tempo de incubação os sobrenadantes foram removidos e as placas foram lavadas 3 vezes com água destilada estéril para a remoção de bactérias planctônicas e 125 μL de cristal violeta 0,1% foram adicionados e incubados por 15 minutos, seguindo por nova remoção do sobrenadante e 3 lavagens com água destilada estéril para a remoção do excesso de cristal violeta. Por fim, 125 μL de ácido acético 30% foram adicionados por 10 minutos para solubilizar o biofilme corado, o conteúdo dos poços foi transferido para uma nova microplaca e a absorbância foi medida em determinada pela leitura da densidade óptica a 570 nm com uma leitora de placas Multiskan® FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.8. Avaliação dos efeitos antiproliferativos sobre linhagens de células tumorais

As linhagens MCF-7 (ATCC HTB-22, linhagem celular de câncer de mama humano) e HeLa (ATCC CCL-2, linhagem celular de câncer cervical humano) foram cultivadas a 37 °C com 5% de CO_2 em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 100 UI/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado pelo calor (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). Para os ensaios, 5×10^3 células/poço foram semeadas em microplacas de 96 poços (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça) e incubadas durante a noite em DMEM completo. Em seguida, 50 μL do peptídeo (1–128 μM) ou água Milli-Q (controle negativo) foram adicionados aos poços. Após 24 horas, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-bifenil tetrazólio brometo; Invitrogen, EUA). Resumidamente, 15 μL da solução de MTT (5 mg/mL em PBS) e 135 μL de DMEM foram adicionados a cada poço, seguindo-se incubação por 3 horas a 37 °C com 5% de CO_2 . O meio foi então removido e 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados. A absorbância foi medida a 595 nm usando um leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA).

2.9. Avaliação dos efeitos citotóxicos sobre macrófagos RAW 264.7

Foi avaliada a citotoxicidade do peptídeo em linhagem de macrófagos RAW 264.7 de camundongos (ATCC, EUA). As células foram cultivadas em frascos de 75 cm² em meio DMEM, complementado com 10 % de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina), à temperatura de 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após atingirem confluência, as células foram retiradas do frasco e contadas em câmara de Neubauer utilizando o ensaio de exclusão de azul de tripano.

Para os ensaios de viabilidade, 2 x10⁴ células/poço foram cultivadas em placa de 96 poços por 24 h. As células foram então tratadas com diferentes concentrações do peptídeo (2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µM). Como controle, foi utilizado apenas meio DMEM completo. As células tratadas foram incubadas por 24 hrs à temperatura de 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após esse período, os sobrenadantes foram descartados e, então, foi adicionado 100 uL/poço de solução de MTT (0,5 mg/ml) em meio DMEM. Após 3 horas, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO. Foi realizada leitura em espectrofotômetro a 570 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem da viabilidade celular em relação aos controles.

2.10. Ativação de neutrófilos e avaliação do efeito quimiotático do peptídeo

Leucócitos polimorfonucleares (PMNs) foram obtidos de sangue venoso periférico de doadores masculinos em jejum, evitando influências hormonais e nutricionais. Os PMNs foram isolados por centrifugação em gradiente de densidade, avaliados quanto à viabilidade e ajustados para 7000 células/µL. A quimiotaxia foi avaliada no equipamento RTCA (*Real Time Cell Analyzer*, xCELLigence RTCA-DP) usando placa CIM de 16 poços. Na placa inferior, foram adicionados 160 µL de 100 nM fMLP (controle positivo), 160 µL de HBSS (controle negativo) ou 16 µM de ranatuerina-2PMe. A placa superior foi acoplada e recebeu 25 µL de HBSS em cada poço, seguida de incubação por 1 h para formação do gradiente quimiotático. Em seguida, adicionaram-se 60 µL de neutrófilos em HBSS (para avaliar migração ao peptídeo) ou 60 µL de neutrófilos + peptídeo (para avaliar o efeito do peptídeo na migração ao fMLP). A impedância entre câmaras foi registrada a cada 5 min por 3 h. A análise estatística incluiu comparações ponto a ponto, cálculo da área sob a curva, avaliação de parâmetros das curvas e modelagem matemática com parametrização por inteligência artificial. Todo o procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

3. Resultados e Discussão

3.1. Identificação da Raniseptina Ba-1 a partir do banco de cDNAs obtido do tegumento de *B. albopunctata*

O cDNA clonado codifica para um polipeptídeo composto por um peptídeo sinal (1–22 aa), um domínio ácido (23–51 aa) e um peptídeo maduro (52–80 aa). O peptídeo maduro apresenta massa molecular calculada de 3182,74 Da e ponto isoelétrico de 9,80, com carga líquida em pH 7 de +3 e valor de Gravy de -0,369 (Tabela 3).

Tabela 3. Propriedades físico-químicas de Raniseptina Ba-1.

Peptídeo	Mass Calc. (Da)	pI	Carga Líquida	GRAVY
Raniseptin Ba-1	3182,74	9,82	+3	-0.369

3.2. Caracterização estrutural da Raniseptina Ba-1

Buscas realizadas em bancos de sequências empregando o algoritmo Blastp permitiu identificar o peptídeo como pertencente à família das raniseptinas, peptídeos antimicrobianos isolados do anuro *Boana raniceps* por Magalhães *et al.* (2008), sendo assim denominado Raniseptina Ba-1. O alinhamento múltiplo entre a Raniseptinas Ba-1 e outras raniseptinas previamente descritas está apresentado na figura 1.

Magalhães *et al.* (2008) caracterizaram uma nova família de peptídeos antimicrobianos, denominados *raniseptinas*, presentes na secreção cutânea do anfíbio *Hypsiboas raniceps* (atualmente *Boana raniceps*). Foram clonados e sequenciados nove cDNAs correspondentes a precursores dessas raniseptinas, cuja estrutura pré-propeptídica se assemelha à das dermaseptinas da subfamília Phyllomedusinae e tal organização também se evidencia no precursor da Raniseptina Ba-1.

Raniseptin Ba-1	G WMD K L K Q I G K V A GR V AL G V A Q D Y L N P K Q	29
Raniseptin-2	A W L D K L K S L G K V V G K V A I G V A Q H Y L N P Q Q	29
Raniseptin-11	A W L D K L K S L G K V V G K V A F G V A Q N Y L N P R Q	29
Raniseptin-1	A W L D K L K S L G K V V G K V A L G V A Q N Y L N P Q Q	29
Raniseptin-5	A W L D K L K N L G K V V G K V A L G V V Q N Y L N P R Q	29
Raniseptin-10	A W L D K L K S L G K V V G K V A L G V V Q N Y L N P R Q	29

* : * * * * * : * * * * * * : * * * * * * * * * * * *

Figura 1. Alinhamento múltiplo da sequência do peptídeo maduro correspondente à Raniseptina Ba-1 com outras raniseptinas previamente identificadas. “*” indica resíduos de aminoácidos idênticos e “:” indicam substituições conservativas.

A projeção em roda helicoidal para a Raniseptina Ba-1 está representada na figura 2 e evidencia o caráter anfipático da molécula, característica bastante comum em peptídeos antimicrobianos de anuros (Santana *et al.*, 2020a; Santana *et al.*, 2020b; Freitas *et al.*, 2023).

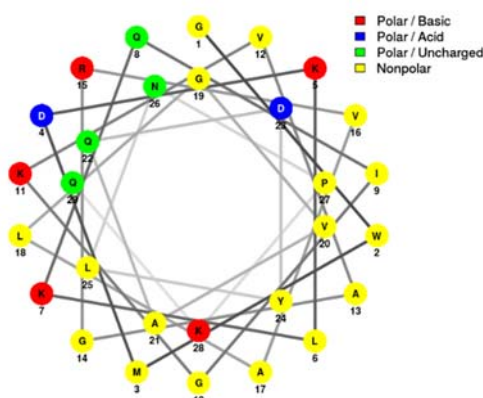


Figura 2. Representação em roda helicoidal da Raniseptina Ba-1.

O espectro de DC da Raniseptina Ba-1 em água apresentou uma banda dicróica negativa em 200 nm, indicando estrutura desordenada. Não houve alteração conformacional na presença de 10% de TFE. Entretanto, em 20% e 50% de TFE, observou-se estruturação em α -hélice, com o sinal dicróico típico: banda positiva em ~195 nm e negativa em 208 nm e 222 nm. De forma semelhante, o aumento das concentrações de SDS também induziu a conformação α -hélice do peptídeo (Figura 3A e 3B). A presença de aproximadamente 50% de resíduos de aminoácidos apolares na sequência pode explicar a ausência de estruturação na menor concentração de TFE, já que o SDS, por ser uma molécula anfifílica, favorece a interação com esses resíduos e apresenta maior eficiência na indução de estruturas em α -hélice.

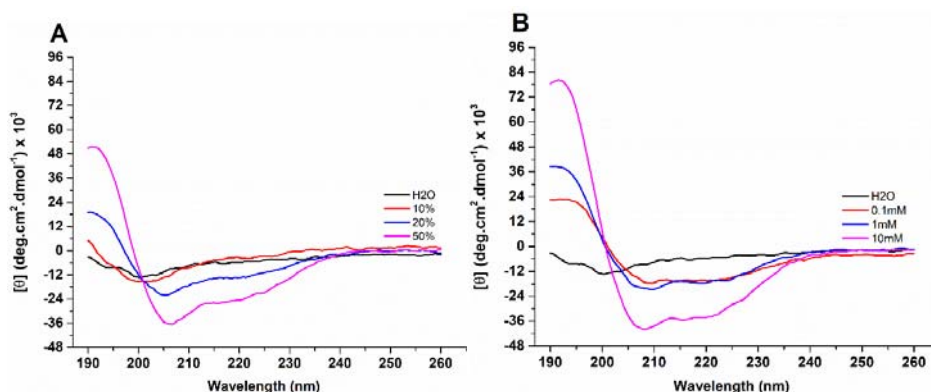


Figura 3. Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (190 a 260 nm) de Raniseptina Ba-1 em água e em diferentes concentrações de (A) SDS e (B) TFE a 25 °C. A concentração empregada do peptídeo foi 0,22 mg/mL.

O conteúdo de estrutura α -hélice da Raniseptina Ba-1 em função do aumento das concentrações de TFE e SDS é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Conteúdo de estrutura α -hélice da Raniseptina Ba-1 em função do aumento das concentrações de TFE e SDS.

Condição	Conteúdo de α -hélice (%)
Água	21.58
TFE 10%	17.91
TFE 20%	40.56
TFE 50%	66.47
SDS 0.1 mM	50.19
SDS 1 mM	49.82
SDS 10 mM	92.20

3.3. Caracterização das atividades biológicas da Raniseptina Ba-1

A Raniseptina Ba-1 inibiu o crescimento de seis cepas padrão de bactérias patogênicas, sendo observado um efeito mais proeminente contra bactérias Gram-negativas. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram: *E. coli* 2 μ M; *K. pneumoniae* 4 μ M; *P. aeruginosa* 4 μ M; *S. epidermidis* 8 μ M; *S. aureus* 32 μ M e *E. faecalis* 64 μ M (Tabela 5). Esse perfil de atividade antimicrobiana contra bactérias é bastante similar ao observado para as Raniseptinas-3 e -6 isoladas de *B. raniceps* (Freitas *et al.*, 2023).

A seletividade dos PAMs em relação a bactérias Gram-negativas é fundamentada pela presença de uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos, que atua como uma barreira inicial para a ligação, inserção e permeabilização dos peptídeos (Su *et al.*, 2025; Gong *et al.*, 2021). PAMs eficazes primeiramente atravessam essa membrana externa sem causar toxicidade excessiva às células hospedeiras e atacam a membrana citoplasmática para induzir fuga de conteúdos intracelulares (Gong *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021). Estratégias modernas de modificação estrutural, como terminação carboxílica ou substituição de resíduos de lisina por arginina têm mostrado aumentar tanto a capacidade de inserção na membrana quanto a atividade antibacteriana, mantendo seletividade para Gram-negativas (Zhu *et al.*, 2021). Ademais, as características estruturais dos peptídeos, como carga, hidrofobicidade e conformação, com suas modificações na superfície bacteriana influenciam diretamente a eficiência da ação antimicrobiana (Jenssen *et al.*, 2006).

Tabela 5. Atividade antimicrobiana de Raniseptina Ba-1 (CIM, μ M).

Microrganismos	Raniseptina Ba-1
Bactérias Gram-negativas	
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	2
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	4
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	4
Bactérias Gram-positivas	
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	32
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	8
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	64

Em ensaio de cristal violeta (48 h) com *P. aeruginosa* ATCC 27853, a Raniseptina Ba-1 reduziu a formação de biofilme em comparação ao controle, com leitura a 570 nm, sendo o efeito ainda evidente em doses baixas. Nas concentrações 128 a 32 μ M pode-se observar uma menor capacidade de inibição da formação do biofilme (Figura 4). Tal ocorrência pode ser atribuídas a uma maior agregação dos monômeros do peptídeo nessas concentrações, mas essa possibilidade precisa ser melhor investigada com técnicas que permitem observar a agregação do peptídeo como o espalhamento de luz dinâmico.

Os efeitos inibitórios observados estão de acordo com a capacidade de certos PAMs em inibir biofilmes de *P. aeruginosa*, inclusive em estágios iniciais e maduros. No estudo de Dosler & Karaaslan (2014), foi investigada a capacidade de antibióticos e peptídeos antimicrobianos catiônicos (como LL-37, CAMA:

cecropin(1-7)-melittin A(2-9) amide, melittin, defensin and magainin-II) em inibir e destruir biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, tanto de uma cepa laboratorial (ATCC 27853) quanto de quatro cepas clínicas. Os resultados demonstraram que esses PAMs, isolados ou em combinação com antibióticos como ceftazidima e colistina, apresentam eficácia significativa na redução da biomassa de biofilmes, superando os efeitos dos antibióticos sozinhos.

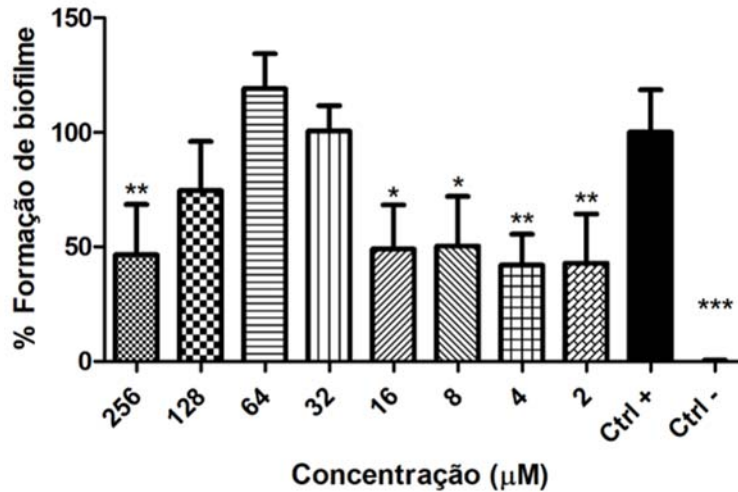


Figura 4. Efeitos da Raniseptina Ba-1 sobre a formação de biofilme de *P. aeruginosa*. Dados foram tratados com *one-way* ANOVA, seguido pelo Test T de Tukey.

A Raniseptina Ba-1 reduziu a viabilidade de linhagens de células tumorais HeLa e MCF-7 (24 h, MTT; 1–128 µM), indicando efeito antiproliferativo/citotóxico dependente de concentração (Figuras 5A e 5B) e também apresentou citotoxicidade concentração-dependente em RAW 264.7 (24 h, MTT), com diferença altamente significativa versus controle (Figura 6). PAMs anfipáticos de anuros, como raniseptinas e figaininas, frequentemente exibem efeitos citotóxicos variáveis conforme carga e anfipaticidade (Santana *et al.*, 2020a; Santana *et al.*, 2020b; Freitas *et al.*, 2023).

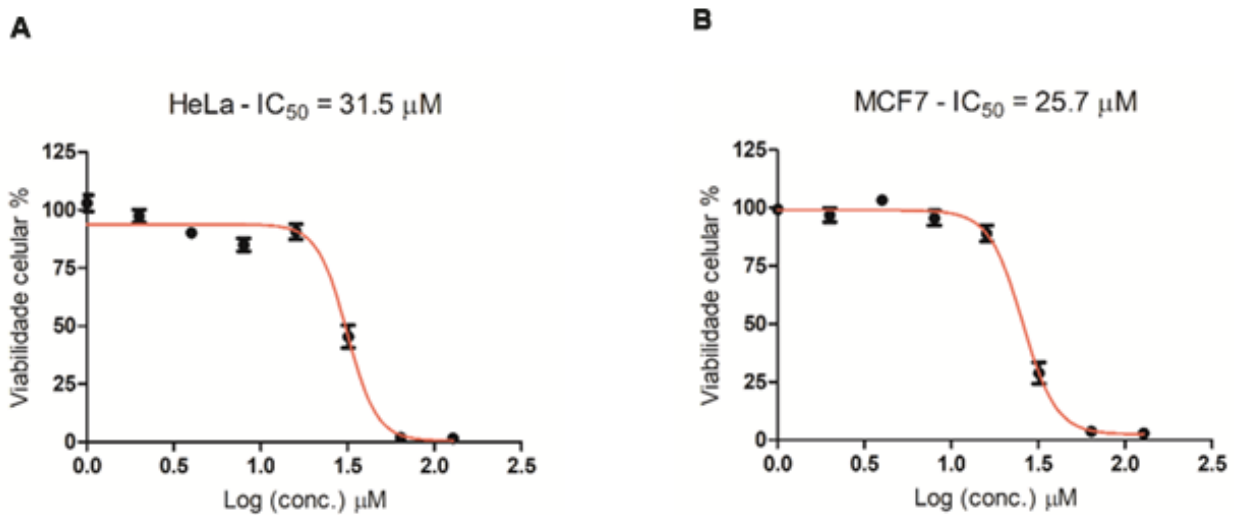


Figura 5. Efeito citotóxico de diferentes concentrações do peptídeo Raniseptina Ba-1 em cultura de células tumorais HeLa e MCF-7.

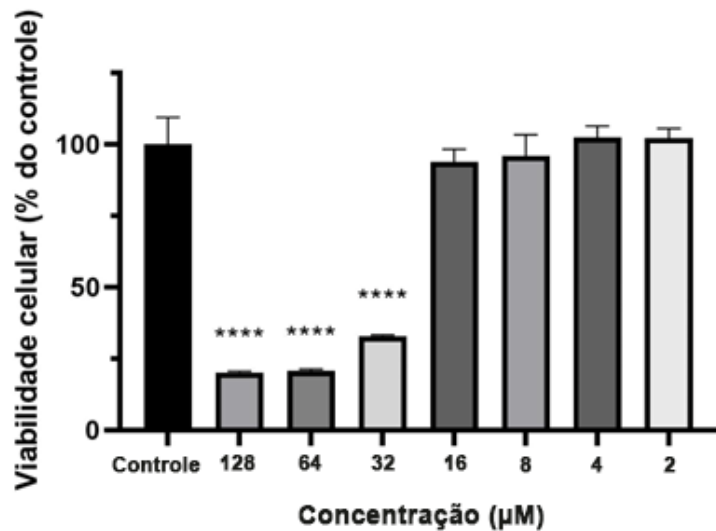


Figura 6. Efeito citotóxico de diferentes concentrações do peptídeo Ranisepina Ba-1 em cultura de células de macrófagos RAW 264.7. Dados foram expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes, realizados em triplicata. **** $p < 0.0001$ quando comparado ao controle (*one-way* ANOVA, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni).

O ensaio de RTCA mostrou que a Ranisepina Ba-1 exerce efeito quimiotático sobre neutrófilos. Na primeira etapa, o peptídeo foi adicionado à placa inferior e os neutrófilos, aos poços superiores, resultando em migração direcionada ao peptídeo (curva verde), superior ao controle negativo (azul). Na segunda etapa, o peptídeo foi incubado com neutrófilos na placa superior e fMLP na inferior, observando-se redução da migração para fMLP (curva roxa) em comparação ao controle positivo (vermelho) (Figura 7). Esse resultado indica competição quimiotática entre Ranisepina Ba-1 e fMLP, confirmando que o peptídeo não apenas atrai neutrófilos, mas também interfere na migração induzida por um agente quimiotático padrão. Tais resultados se assemelham com os obtidos por Santos (2023) em que se observou um padrão de migração semelhante para a Dermaseptina PR-1.

Cell index

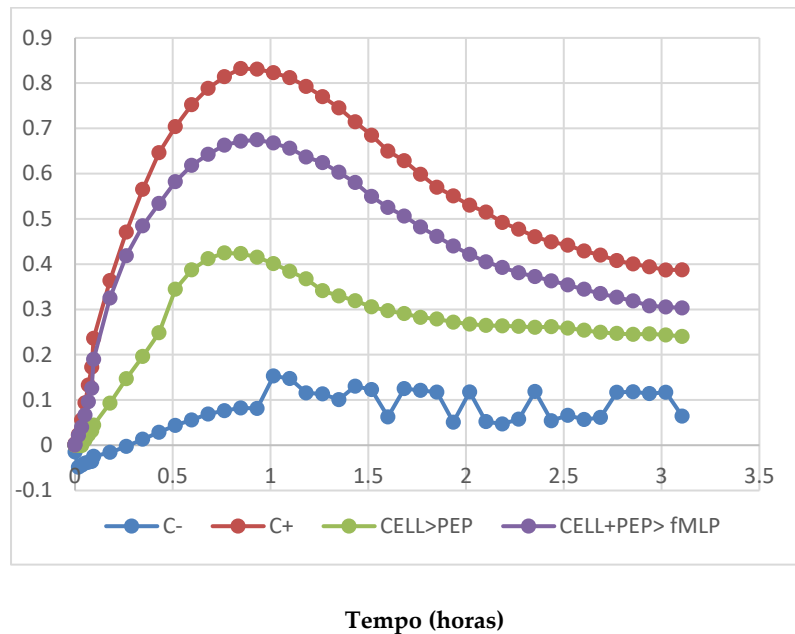


Figura 7. Avaliação do potencial quimiotático da Ranisepina Ba-1. As amostras foram monitoradas/analizadas por um período de 3 horas, com medições realizadas a cada 5 minutos. Condições experimentais: Migração espontânea: neutrófilos em HBSS na câmara superior e HBSS na câmara inferior (C-); Controle positivo (fMLP): neutrófilos em HBSS na câmara superior e fMLP na câmara inferior (C+); Efeito quimiotático do peptídeo: neutrófilos em HBSS na câmara superior e

Raniseptina Ba-1 na câmara inferior (CELL > PEP); Efeito comparativo: neutrófilos incubados com o peptídeo na câmara superior e fMLP na câmara inferior (CELL+PEP > fMLP).

4. Conclusão

No presente estudo, foi identificada uma raniseptina a partir de uma biblioteca de cDNA obtida da pele do anuro *Boana albopunctata*, a qual foi sintetizada quimicamente utilizando a técnica Fmoc. O peptídeo resultante, denominado Raniseptina Ba-1, apresentou elevada similaridade com raniseptinas previamente isoladas da espécie *Boana raniceps*. Os ensaios de atividade antimicrobiana revelaram que a Raniseptina Ba-1 foi capaz de inibir o crescimento de diversas bactérias patogênicas, além de impedir a formação de biofilme pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. O peptídeo também demonstrou efeitos citotóxicos em culturas de macrófagos RAW 264.7 e em linhagens celulares tumorais HeLa e MCF-7. Adicionalmente, verificou-se que a Raniseptina Ba-1 foi capaz de modificar a taxa de migração de neutrófilos. As análises de dicróismo circular indicaram que o peptídeo pode adotar uma conformação α -hélice na presença de trifluoroetanol e SDS. Em síntese, a Raniseptina Ba-1 apresentou propriedades antimicrobianas, adotou conformação α -hélice e exibiu efeitos citotóxicos e imunomodulatórios em culturas celulares. Esses resultados apontam para seu potencial terapêutico como agente antimicrobiano, especialmente diante da necessidade de novas estratégias contra patógenos resistentes.

5. Referências

- Aitken, A.; Learmonth, M. The Protein Protocols Handbook. Molecular Biotechnology. **1996**, *4*, 17-24.
- Azevedo Calderon, L.; Silva, A.; Ciancaglini, P.; Stábeli, R. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: From biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. *Amino Acids* **2011**, *40*, 29–49. doi: 10.1007/s00726-010-0622-3.
- Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238–250. doi: 10.1038/nrmicro1098.
- Chianese, A.; Zannella, C.; Foglia, F.; Nastri, B.M.; Monti, A.; Doti, N.; Franci, G.; De Filippis, A.; Galdiero, M. Hylin-a1: A host defense peptide with antibacterial potential against *Staphylococcus aureus* multi-resistant strains. *Pharmaceuticals* (Basel) **2023a**, *16*(4), 509. doi: 10.3390/ph16040509.
- Chianese, A.; Iovane, V.; Zannella, C.; Capasso, C.; Nastri, B.M.; Monti, A.; Doti, N.; Montagnaro, S.; Pagnini, U.; Iovane, G.; De Filippis, A.; Galdiero, M. Synthetic frog-derived-like peptides: A new weapon against emerging and potential zoonotic viruses. *Viruses*. **2023b**, *15*(9), 1804. doi: 10.3390/v15091804.
- Chianese, A.; Zannella, C.; Monti, A.; Doti, N.; Sanna, G.; Manzin, A.; De Filippis, A.; Galdiero, M. Hylin-a1: A pan-inhibitor against emerging and re-emerging respiratory viruses. *Int. J. Mol. Sci.* **2023c**, *24*(18), 13888. doi: 10.3390/ijms241813888.
- Chianese, A.; Giugliano, R.; Palma, F.; Nastri, B.M.; Monti, A.; Doti, N.; Zannella, C.; Galdiero, M.; De Filippis, A. The antiherpetic and anti-inflammatory activity of the frog-derived peptide Hylin-a1. *J. Appl. Microbiol.* **2024**, *135*(7), 1xae165. doi: 10.1093/jambio/1xae165.
- Conlon, J.M.; Guilhaudis, L.; Attoub, S.; Coquet, L.; Leprince, J.; Jouenne, T.; Mechkarska, M. Purification, conformational analysis and cytotoxic activities of host-defense peptides from the Giant Gladiator Treefrog *Boana boans* (Hylidae: Hylinae). *Antibiotics* (Basel). **2023**, *12*(7), 1102. doi: 10.3390/antibiotics12071102.
- Conlon, J.M.; Sridhar, A.; Khan, D.; Cunning, T.S.; Delaney, J.J.; Taggart, M.G.; Ternan, N.G.; Leprince, J.; Coquet, L.; Jouenne, T.; Attoub, S.; Mechkarska, M. Multifunctional host-defense peptides isolated from skin secretions of the banana tree dwelling frog *Boana platanera* (Hylidae; Hylinae). *Biochimie* **2024**, *223*, 23-30. doi: 10.1016/j.biochi.2024.03.012.
- de la Fuente-Nunez, C.; Cesaro, A.; Hancock, R.E.W. Antibiotic failure: Beyond antimicrobial resistance. *Drug Resist. Updat.* **2023**, *71*, 101012. doi: 10.1016/j.drug.2023.101012.
- Dosler, S.; Karaaslan, E. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. *Peptides* **2014**, *62*, 32-37. doi: 10.1016/j.peptides.2014.09.021.
- Freitas, G.G.; Barbosa, J.M.; Santana, C.J.C.; Magalhães, A.C.M.; Macedo, K.W.R.; Souza, J.O.; Castro, J.S.; Vasconcelos, I.A.; Souza, A.A.; Freitas, S.M.; Báó, S.N.; Costa, S.R.; Brand, G.D.; Chaves, I.M.; Costa, V.V.; Fontes, W.; Pires Júnior, O.R.; Castro, M.S. Purification and biological properties of Raniseptins-3 and -6, two antimicrobial peptides from *Boana raniceps* (Cope, 1862) Skin Secretion. *Biomolecules* **2023**, *13*, 576. doi: 10.3390/biom13030576.

- Gong, H.; Hu, X.; Liao, M.; Fa, K.; Ciumac, D.; Clifton, L.A.; Sani, M.A.; King, S.M.; Maestro, A, Separovic F, Waigh TA, Xu H, McBain AJ, Lu JR. Structural disruptions of the outer membranes of Gram-negative bacteria by rationally designed amphiphilic antimicrobial peptides. *ACS Appl Mater Interfaces*. **2021**, 13(14), 16062-16074. doi: 10.1021/acsami.1c01643.
- Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R.E. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. **2006**, 19(3), 491-511. doi: 10.1128/CMR.00056-05.
- Laxminarayan, R.; Sridhar, D.; Blaser, M.; Wang, M.; Woolhouse, M. Achieving global targets for antimicrobial resistance. *Science* **2016**, 353, 874–875. doi: 10.1126/science.aaf9286.
- Magalhães, B.S.; Melo, J.A.; Leite, J.R.; Silva, L.P.; Prates, M.V.; Vinecky, F.; Barbosa, E.A.; Verly, R.M.; Mehta, A.; Nicoli, J.R.; Bemquerer, M.P.; Andrade, A.C.; Bloch, C. Jr. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochem Biophys Res Commun*. **2008**, 377(4), 1057-1061. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.102.
- Mandel, S.M.S. Prospecção de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*. **2008**. Brasília, 85p. *Dissertação* (Mestrado) – Biologia Animal, Universidade de Brasília.
- Matsuzaki, K. Membrane permeabilization mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol*. **2019**, 1117, 9–16. doi: 10.1007/978-981-13-3588-4_2.
- Morán-Marcillo, G.; Sánchez Hinojosa, V.; de Los Monteros-Silva, N.E.; Blasco-Zúñiga, A.; Rivera, M.; Naranjo, R.E.; Almeida, J.R.; Wang, L.; Zhou, M.; Chen, T.; Shaw, C.; Proaño-Bolaños, C. Picturins and Pictuseptins, two novel antimicrobial peptide families from the skin secretions of the Chachi Treefrog, *Boana picturata*. *J. Proteomics* **2022**, 264, 104633. doi: 10.1016/j.jprot.2022.104633.
- Mulani, M.S.; Kamble, E.E.; Kumkar, S.N.; Tawre, M.S.; Pardesi, K.R. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front. Microbiol*. **2019**, 10, 539. doi: 10.3389/fmicb.2019.00539.
- Murray, C.J.L.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Aguilar, G.R.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet* **2022**, 399, 629–655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- Oren, Z.; Shai, Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **1998**, 47(6), 451-463. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<451::AID-BIP4>3.0.CO;2-F.
- Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B.R.; Lin, T.J.; Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **2019**, 37, 177–192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.
- Santana, C.J.C.; Magalhães, A.C.M.; Dos Santos Júnior, A.C.M.; Ricart, C.A.O.; Lima, B.D.; Álvares, A.D.C.M.; Freitas, S.M.; Pires Júnior, O.R.; Fontes, W.; Castro, M.S. Figainin 1, a novel amphibian skin peptide with antimicrobial and antiproliferative properties. *Antibiotics* **2020a**, 9, 625. doi: 10.3390/antibiotics9090625.
- Santana, C.J.C.; Magalhães, A.C.M.; Prias-Márquez, C.A.; Falico, D.A.; Dos Santos Júnior, A.C.M.; Lima, B.D.; Ricart, C.A.O.; de Pilger, D.R.B.; Bonotto, R.M.; Moraes, C.B.; Freitas-Júnior, L.H.; Álvares, A.D.C.M.; Freitas, S.M.; Luz, I.S.; Pires Júnior, O.R.; Fontes, W.; Castro, M.S. Biological properties of a novel multifunctional host defense peptide from the skin secretion of the Chaco tree frog, *Boana raniceps*. *Biomolecules* **2020b**, 10, 790. doi: 10.3390/biom10050790.
- Santos, J.S. Caracterização das propriedades biológicas de uma dermaseptina isolada da secreção cutânea de *Pithecopus rohdei* (Anura: Phyllomedusinae). **2023**. Brasília, 59p. *Dissertação* (Mestrado) – Biologia Animal, Universidade de Brasília.
- Segalla, M.V.; Berneck, B.V.M.; Abrunhosa, P.A.; Ananias, F.; et al. List of Brazilian amphibians. *Herpetologia Brasileira* **2021**; 10(2), 1-66. doi: 10.5281/zenodo.4716176.
- Vestergaard, M.; Frees, D.; Ingmer, H. Antibiotic resistance and the MRSA problem. *Microbiol. Spectr*. **2019**, 7. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018.
- Su, Z.; Yu, H.; Lv, T.; Chen, Q.; Luo, H.; Zhang, H. Progress in the classification, optimization, activity, and application of antimicrobial peptides. *Front. Microbiol*. **2025**, 16, 1582863. doi: 10.3389/fmicb.2025.1582863.
- Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, 415, 389–395. doi: 10.1038/415389a.
- Zohrab, F.; Askarian, S.; Jalili, A.; Kazemi Oskuee, R. Biological properties, current applications and potential therapeutic applications of brevinin peptide superfamily. *Int J Pept Res Ther*. **2019**, 25(1), 39-48. doi: 10.1007/s10989-018-9723-8.

Zhu, N.; Zhong, C.; Liu, T.; Zhu, Y.; Gou, S.; Bao, H.; Yao, J.; Ni, J. Newly designed antimicrobial peptides with potent bioactivity and enhanced cell selectivity prevent and reverse rifampin resistance in Gram-negative bacteria. *Eur J Pharm Sci.* **2021**, *158*, 105665. doi: 10.1016/j.ejps.2020.105665.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho tem como perspectivas futuras:

- ✓ Avaliar os efeitos antimicrobianos da Raniseptina Ba-1 em microrganismos resistentes pertencentes ao grupo ESKAPE e seus possíveis efeitos sinérgicos com antibióticos comercialmente disponíveis.
- ✓ Avaliar os efeitos hemolíticos da Raniseptina Ba-1 sobre eritrócitos humanos.
- ✓ Avaliar as propriedades imunomodulatórias como a produção de EROs, indução de fagocitose e indução de NETs, assim como, indução de citocinas pré e pro-inflamatórias da Raniseptina Ba-1.
- ✓ Avaliar os efeitos da Raniseptina Ba-1 sobre protozoários de interesse médico e veterinário, como *Leishmania* sp., *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azevedo Calderon, L.; Silva, A.; Ciancaglini, P.; Stábeli, R. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: From biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. *Amino Acids* **2011**, *40*, 29–49. doi: 10.1007/s00726-010-0622-3.

Bartels, E.J.H.; Dekker, D.; Amiche, M. Dermaseptins, multifunctional antimicrobial peptides: a review of their pharmacology, effectivity, mechanism of action, and possible future directions. *Front Pharmacol.* **2019**, *10*, 1421. doi: 10.3389/fphar.2019.01421.

Benítez-Prián, M.; Lorente-Martínez, H.; Agorreta, A.; Gower, D.J.; Wilkinson, M.; Roelants, K.; San Mauro, D. Diversity and molecular evolution of antimicrobial peptides in caecilian amphibians. *Toxins (Basel)*. **2024**, *16*(3), 150. doi: 10.3390/toxins16030150.

Bechinger, B.; Gorr, S.U. Antimicrobial peptides: Mechanisms of action and resistance. *J Dent Res.* 2017, *96*(3), 254-260. doi: 10.1177/0022034516679973.

Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238–250. doi: 10.1038/nrmicro1098.

Cao, J.; Zhang, Y.; Shan, Y.; Wang, J.; Liu, F.; Liu, H.; Xing, G.; Lei, J.; Zhou, J. A pH-dependent antibacterial peptide release nano-system blocks tumor growth *in vivo* without toxicity. *Sci Rep.* **2017**, *7*(1), 11242. doi: 10.1038/s41598-017-11687-y.

Castro, M.S.; Ferreira, T.C.; Cilli, E.M.; Crusca, E. Jr; Mendes-Giannini, M.J.; Sebben, A.; Ricart, C.A.; Sousa, M.V.; Fontes, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). *Peptides* **2009**, *30*(2), 291-296. doi: 10.1016/j.peptides.2008.11.003.

Chen, C.; Shi, J.; Wang, D.; Kong, P.; Wang, Z.; Liu, Y. Antimicrobial peptides as promising antibiotic adjuvants to combat drug-resistant pathogens. *Crit. Rev. Microbiol.* **2024**, *50*, 267–284. doi: 10.1080/1040841X.2023.2186215.

Chianese, A.; Zannella, C.; Foglia, F.; Nastro, B.M.; Monti, A.; Doti, N.; Franci, G.; De Filippis, A.; Galdiero, M. Hylin-a1: A host defense peptide with antibacterial potential against *Staphylococcus aureus* multi-resistant strains. *Pharmaceuticals (Basel)* **2023a**, *16*(4), 509. doi: 10.3390/ph16040509.

Chianese, A.; Iovane, V.; Zannella, C.; Capasso, C.; Nastri, B.M.; Monti, A.; Doti, N.; Montagnaro, S.; Pagnini, U.; Iovane, G.; De Filippis, A.; Galdiero, M. Synthetic frog-derived-like peptides: A new weapon against emerging and potential zoonotic viruses. *Viruses*. **2023b**, *15*(9), 1804. doi: 10.3390/v15091804.

Chianese, A.; Zannella, C.; Monti, A.; Doti, N.; Sanna, G.; Manzin, A.; De Filippis, A.; Galdiero, M. Hylin-a1: A pan-inhibitor against emerging and re-emerging respiratory viruses. *Int. J. Mol. Sci.* **2023c**, *24*(18), 13888. doi: 10.3390/ijms241813888.

Chianese, A.; Giugliano, R.; Palma, F.; Nastri, B.M.; Monti, A.; Doti, N.; Zannella, C.; Galdiero, M.; De Filippis, A. The antiherpetic and anti-inflammatory activity of the frog-derived peptide Hylin-a1. *J. Appl. Microbiol.* **2024**, *135*(7), lxae165. doi: 10.1093/jambio/lxae165.

Conlon, J.M. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. *Cell Mol Life Sci.* **2011**, *68*(13), 2303-2315. doi: 10.1007/s00018-011-0720-8.

Conlon, J.M.; Mechkarska, M.; Abdel-Wahab, Y.H.; Flatt, P.R. Peptides from frog skin with potential for development into agents for Type 2 diabetes therapy. *Peptides* **2018**, *100*, 275-281. doi: 10.1016/j.peptides.2017.09.001.

Conlon, J.M.; Guilhaudis, L.; Attoub, S.; Coquet, L.; Leprince, J.; Jouenne, T.; Mechkarska, M. Purification, conformational analysis and cytotoxic activities of host-defense peptides from the Giant Gladiator Treefrog *Boana boans* (Hylidae: Hyliinae). *Antibiotics (Basel)*. **2023**, *12*(7), 1102. doi: 10.3390/antibiotics12071102.

Conlon, J.M.; Sridhar, A.; Khan, D.; Cunning, T.S.; Delaney, J.J.; Taggart, M.G.; Ternan, N.G.; Leprince, J.; Coquet, L.; Jouenne, T.; Attoub, S.; Mechkarska, M. Multifunctional host-defense peptides isolated from skin secretions of the banana tree dwelling frog *Boana platanera* (Hylidae; Hyliinae). *Biochimie* **2024**, *223*, 23-30. doi: 10.1016/j.biochi.2024.03.012.

D'Andrea, L.D.; Romanelli, A. Temporins: multifunctional peptides from frog skin. *Int J Mol Sci.* **2023**, *24*(6), 5426. doi: 10.3390/ijms24065426.

de Amaral, M.; Ienes-Lima, J. Anurans against SARS-CoV-2: A review of the potential antiviral action of anurans cutaneous peptides. *Virus Res.* **2022**, *315*, 198769. doi: 10.1016/j.virusres.2022.198769.

de la Fuente-Nunez, C.; Cesaro, A.; Hancock, R.E.W. Antibiotic failure: Beyond antimicrobial resistance. *Drug Resist. Updat.* **2023**, *71*, 101012. doi: 10.1016/j.drup.2023.101012.

Duarte-Mata, D.I.; Salinas-Carmona, M.C. Antimicrobial peptides' immune modulation role in intracellular bacterial infection. *Front Immunol.* **2023**, *14*, 1119574. doi: 10.3389/fimmu.2023.1119574.

Dubois, A. The nomenclatural status of *Hysaplesia*, *Hylaplesia*, *Dendrobates*, and related nomina (Amphibia, Anura), with general comments on zoological nomenclature and its governance, as well as on taxonomic databases and websites. *Bionomina* **2017**, *11*, 1–48. Disponível em: < <https://www.mapress.com/bn/article/view/bionomina.11.1.1>>.

Duellman, W.E.; Trueb, L. *Biology of Amphibians*. Johns Hopkins University Press. **2019**.

Erdem Büyükkiraz, M.; Kesmen, Z. Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *J Appl Microbiol.* **2022**, *132*(3), 1573-1596. doi: 10.1111/jam.15314.

Faivovich, J.; Haddad, C.; Garcia, P.; Frost, D.; Campbell, J.; Wheeler, W.C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **2005**, *294*, 1–240. doi: 10.1206/0003-0090(2005)294[0001:SROTF]2.0.CO;2.

Freitas, G.G.; Barbosa, J.M.; Santana, C.J.C.; Magalhães, A.C.M.; Macedo, K.W.R.; Souza, J.O.; Castro, J.S.; Vasconcelos, I.A.; Souza, A.A.; Freitas, S.M.; Bão, S.N.; Costa, S.R.; Brand, G.D.; Chaves, I.M.; Costa, V.V.; Fontes, W.; Pires Júnior, O.R.; Castro, M.S. Purification and biological properties of Raniseptins-3 and -6, two antimicrobial peptides from *Boana raniceps* (Cope, 1862) Skin Secretion. *Biomolecules* **2023**, *13*, 576. doi: 10.3390/biom13030576.

Fouquet, A.; Courtois, E.A.; Baudain, D.; Lima, J.D.; Souza, S.M.; Noonan, B.P.; Rodrigues, M.T. The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. *Journal of Biogeography* **2018**, *45*(4), 826-837. doi: 10.1017/S0266467415000206.

Giuliani, A.; Pirri, G.; Bozzi, A.; Di Giulio, A.; Aschi, M.; Rinaldi, A.C. Antimicrobial peptides: Natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cell Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2450–2460.

Guimarães, A.B.; Costa, F.J.; Pires, O.R.; Fontes, W.; Castro, M.S. The amazing world of peptide engineering: The example of antimicrobial peptides from frogs and their analogues. *Protein Pept. Lett.* **2016**, *23*, 722–737. doi: 10.2174/0929866523666160530185137.

Haddad, C.F.B.; Toledo, L.F.; Prado, C.P.A.; Loebmann, D.; Gasparini, J.L.; Sazima, I. *Guia dos Anfíbios da Mata Atlântica: Diversidade e Biologia*; Editora Anolis Books: São Paulo, Brasil, **2013**.

Junior, E.F.C.; Guimarães, C.F.R.C.; Franco, L.L.; Alves, R.J.; Kato, K.C.; Martins, H.R.; de Souza Filho, J.D.; Bemquerer, M.P.; Munhoz, V.H.O.; Resende, J.M.; Verly, R.M. Glycotriazole-peptides derived from the peptide HSP1: Synergistic effect of triazole and saccharide rings on the antifungal activity. *Amino Acids* **2017**, *49*(8), 1389–1400. doi: 10.1007/s00726-017-2441-2.

Kardong, K.V. *Vertebrados - Anatomia Comparada, Função e Evolução*. Roca; 7^a edição. **2016**.

Köhler, J.; Jansen, M.; Rodríguez, A.; Kok, P.J.R.; Toledo, L.F.; Emmrich, M.; Vences, M. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: Theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa* **2017**, *4251*(1), 1-124. doi: 10.11646/zootaxa.4251.1.1.

Gong, H.; Hu, X.; Liao, M.; Fa, K.; Ciumac, D.; Clifton, L.A.; Sani, M.A.; King, S.M.; Maestro, A, Separovic F, Waigh TA, Xu H, McBain AJ, Lu JR. Structural disruptions of the outer membranes of Gram-negative bacteria by rationally designed amphiphilic antimicrobial peptides. *ACS Appl Mater Interfaces.* **2021**, *13*(14), 16062-16074. doi: 10.1021/acsami.1c01643.

Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R.E. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* **2006**, *19*(3), 491-511. doi: 10.1128/CMR.00056-05.

Laxminarayan, R.; Sridhar, D.; Blaser, M.; Wang, M.; Woolhouse, M. Achieving global targets for antimicrobial resistance. *Science* **2016**, *353*, 874–875. doi: 10.1126/science.aaf9286.

Libério, M.S.; Joanitti, G.A.; Azevedo, R.B.; Cilli, E.M.; Zanotta, L.C.; Nascimento, A.C.; Sousa, M.V.; Pires Júnior, O.R.; Fontes, W.; Castro, M.S. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. *Amino Acids* **2011**, *40*, 51–59. doi: 10.1007/s00726-009-0384-y.

Liscano, Y.; Medina, L.; Oñate-Garzón, J.; Gúzman, F.; Pickholz, M.; Delgado, J.P. In silico selection and evaluation of Pugnins with antibacterial and anticancer activity using skin transcriptome of Treefrog (*Boana pugnax*). *Pharmaceutics* **2021**, *13*(4), 578. doi: 10.3390/pharmaceutics13040578.

Liu, G.Y.; Yu, D.; Fan, M.M.; Zhang, X.; Jin, Z.Y.; Tang, C.; Liu, X.F. Antimicrobial resistance crisis: Could artificial intelligence be the solution? *Mil. Med. Res.* **2024**, *11*, 7. doi: 10.1186/s40779-024-00510-1.

Li X, Zuo S, Wang B, Zhang K, Wang Y. Antimicrobial mechanisms and clinical application prospects of antimicrobial peptides. *Molecules*. **2022**, *27*(9), 2675. doi: 10.3390/molecules27092675.

Luo, Y.; Song, Y. Mechanism of antimicrobial peptides: antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities. *Int J Mol Sci.* **2021**, *22*(21), 11401. doi: 10.3390/ijms222111401.

Maden, M. Salamanders as key models for development and regeneration research. *Methods Mol Biol.* **2023**, *2562*, 1-23. doi: 10.1007/978-1-0716-2659-7_1.

Magana, M.; Pushpanathan, M.; Santos, A.L.; Leanse, L.; Fernandez, M.; Ioannidis, A.; Giulianotti, M.A.; Apidianakis, Y.; Bradfute, S.; Ferguson, A.L.; Cherkasov, A.; Seleem, M.N.; Pinilla, C.; de la Fuente-Nunez, C.; Lazaridis, T.; Dai, T.; Houghten, R.A.; Hancock, R.E.W.; Tegos, G.P. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *Lancet Infect Dis.* **2020**, *20*(9), e216-e230. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30327-3.

Mahlapuu, M.; Håkansson, J.; Ringstad, L.; Björn, C. Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 194. doi: 10.3389/fcimb.2016.00194.

Magalhães, B.S.; Melo, J.A.; Leite, J.R.; Silva, L.P.; Prates, M.V.; Vinecky, F.; Barbosa, E.A.; Verly, R.M.; Mehta, A.; Nicoli, J.R.; Bemquerer, M.P.; Andrade, A.C.; Bloch, C. Jr. Post-

secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochem Biophys Res Commun.* **2008**, 377(4), 1057-1061. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.102.

Mandel, S.M.S. Prospecção de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*. **2008**. Brasília, 85p. *Dissertação* (Mestrado) – Biologia Animal, Universidade de Brasília.

Matsuzaki, K. Membrane permeabilization mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, 1117, 9–16. doi: 10.1007/978-981-13-3588-4_2.

Monteiro, J.M.C.; Oliveira, M.D.; Dias, R.S.; Nacif-Marçal, L.; Feio, R.N.; Ferreira, S.O.; Oliveira, L.L.; Silva, C.C.; Paula, S.O. The antimicrobial peptide HS-1 inhibits dengue virus infection. *Virology* **2018**, 514, 79-87. doi: 10.1016/j.virol.2017.11.009.

Morán-Marcillo, G.; Sánchez Hinojosa, V.; de Los Monteros-Silva, N.E.; Blasco-Zúñiga, A.; Rivera, M.; Naranjo, R.E.; Almeida, J.R.; Wang, L.; Zhou, M.; Chen, T.; Shaw, C.; Proaño-Bolaños, C. Picturins and Pictuseptins, two novel antimicrobial peptide families from the skin secretions of the Chachi Treefrog, *Boana picturata*. *J. Proteomics* **2022**, 264, 104633. doi: 10.1016/j.jprot.2022.104633.

Mulani, M.S.; Kamble, E.E.; Kumkar, S.N.; Tawre, M.S.; Pardesi, K.R. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front. Microbiol.* **2019**, 10, 539. doi: 10.3389/fmicb.2019.00539.

Murray, C.J.L.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Aguilar, G.R.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet* **2022**, 399, 629–655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.

Nacif-Marçal, L.; Pereira, G.R.; Abranches, M.V.; Costa, N.C.; Cardoso, S.A.; Honda, E.R.; de Paula, S.O.; Feio, R.N.; Oliveira, L.L. Identification and characterization of an antimicrobial peptide of *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) (Amphibia, Hylidae). *Toxicon* **2015**, 99, 16-22. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.03.006.

Nunes, L.O.; Munhoz, V.H.O.; Sousa, A.A.; de Souza, K.R.; Santos, T.L.; Bemquerer, M.P.; Ferreira, D.E.C.; de Magalhães, M.T.Q.; Resende, J.M.; Alcântara, A.F.C.; Aisenbrey, C.; Veloso, D.P.; Bechinger, B.; Verly, R.M. High-resolution structural profile of hylaseptin-4:

Aggregation, membrane topology and pH dependence of overall membrane binding process. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2021**, 1863(5), 183581. doi: 10.1016/j.bbamem.2021.183581.

Oelkrug, C.; Hartke, M.; Schubert, A. Mode of action of anticancer peptides (ACPs) from amphibian origin. *Anticancer Res.* **2015**, 35, 635–643. Disponível em: <<https://ar.iijournals.org/content/35/2/635.long>>.

Oren, Z.; Shai, Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **1998**, 47(6), 451-463. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<451::AID-BIP4>3.0.CO;2-F.

Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B.R.; Lin, T.J.; Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **2019**, 37, 177–192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.

Pantic, J.M.; Jovanovic, I.P.; Radosavljevic, G.D.; Arsenijevic, N.N.; Conlon, J.M.; Lukic, M.L. The potential of frog skin-derived peptides for development into therapeutically valuable immunomodulatory agents. *Molecules* **2017**, 22, 2071. doi: 10.3390/molecules22122071.

Patocka, J.; Nepovimova, E.; Klimova, B.; Wu, Q.; Kuca, K. Antimicrobial peptides: Amphibian host defense peptides. *Curr. Med. Chem.* **2019**, 26, 5924–5946. doi: 10.2174/0929867325666180713125314.

Prates, M.V.; Sforça, M.L.; Regis, W.C.; Leite, J.R.; Silva, L.P.; Pertinhez, T.A.; Araújo, A.L.; Azevedo, R.B.; Spisni, A.; Bloch, C., Jr. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 13018–13026. doi: 10.1074/jbc.M310838200.

Popov, C.S.F.C.; Magalhães, B.S.; Goodfellow, B.J.; Bocca, A.L.; Pereira, D.M.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Pereira, P.J.B.; Rodrigues, J.E.; de Holanda Veloso, P.H. Júnior; Rezende, T.M.B. Host-defense peptides AC12, DK16 and RC11 with immunomodulatory activity isolated from *Hypsiboas raniceps* skin secretion. *Peptides* **2019**, 113, 11-21. doi: 10.1016/j.peptides.2018.12.007.

Rocha, M.R. Investigação dos componentes da pele do anuro *Boana albopunctata* (Spix, 1824) empregando abordagens moleculares e bioquímicas. **2019**. Brasília, 70p. *Dissertação* (Mestrado) – Biologia Animal, Universidade de Brasília.

Santana, C.J.C.; Magalhães, A.C.M.; Dos Santos Júnior, A.C.M.; Ricart, C.A.O.; Lima, B.D.; Álvares, A.D.C.M.; Freitas, S.M.; Pires Júnior, O.R.; Fontes, W.; Castro, M.S. Figainin 1, a novel amphibian skin peptide with antimicrobial and antiproliferative properties. *Antibiotics* **2020a**, *9*, 625. doi: 10.3390/antibiotics9090625.

Santana, C.J.C.; Magalhães, A.C.M.; Prías-Márquez, C.A.; Falico, D.A.; Dos Santos Júnior, A.C.M.; Lima, B.D.; Ricart, C.A.O.; de Pilger, D.R.B.; Bonotto, R.M.; Moraes, C.B.; Freitas-Júnior, L.H.; Álvares, A.D.C.M.; Freitas, S.M.; Luz, I.S.; Pires Júnior, O.R.; Fontes, W.; Castro, M.S. Biological properties of a novel multifunctional host defense peptide from the skin secretion of the Chaco tree frog, *Boana raniceps*. *Biomolecules* **2020b**, *10*, 790. doi: 10.3390/biom10050790.

Segalla, M.V.; Berneck, B.V.M.; Abrunhosa, P.A.; Ananias, F.; *et al.* List of Brazilian amphibians. *Herpetologia Brasileira* **2021**; *10*(2), 1-66. doi: 10.5281/zenodo.4716176.

Siano, A.; Húmpola, M.V.; de Oliveira, E.; Albericio, F.; Simonetta, A.C.; Lajmanovich, R.; Tonarelli, G.G. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hyliidae). *Journal of Natural Products* **2014**, *77*, 831-841. doi: 10.1021/np4009317.

Silva, F.R.; Almeida-Gomes, M.; Rocha, C.F.D. Conservação dos anuros brasileiros: O desafio de conservar uma biodiversidade inequívoca. *Natureza & Conservação* **2012**; *10*(1), 30-34.

Stebbin, R.C.; Cohen, N.W. *A Natural History of Amphibians*. Princeton University Press. **1997**.

Su, Z.; Yu, H.; Lv, T.; Chen, Q.; Luo, H.; Zhang, H. Progress in the classification, optimization, activity, and application of antimicrobial peptides. *Front. Microbiol.* **2025**. *16*, 1582863. doi: 10.3389/fmicb.2025.1582863.

Teixeira, V.; Feio, M.J.; Bastos, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.* **2012**, *51*, 149–177. doi: 10.1016/j.plipres.2011.12.005.

Vestergaard, M.; Frees, D.; Ingmer, H. Antibiotic resistance and the MRSA problem. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7*. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018.

Xuan, J.; Feng, W.; Wang, J.; Wang, R.; Zhang, B.; Bo, L.; Chen, Z.S.; Yang, H.; Sun, L. Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. *Drug Resist Updat.* **2023**, *68*, 100954. doi: 10.1016/j.drup.2023.100954.

Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, *415*, 389-395.

Zhang, Q.-Y.; Yan, Z.-B.; Meng, Y.-M.; Hong, X.-Y.; Shao, G.; Ma, J.-J.; Cheng, X.-R.; Liu, J.; Kang, J.; Fu, C.-Y. Antimicrobial peptides: Mechanism of action, activity and clinical potential. *Mil. Med. Res.* **2023**, *10*, 48. doi: 10.1186/s40779-021-00343-2.

Zohrab, F.; Askarian, S.; Jalili, A.; Kazemi Oskuee, R. Biological properties, current applications and potential therapeutic applications of brevinin peptide superfamily. *Int J Pept Res Ther.* **2019**, *25*(1), 39-48. doi: 10.1007/s10989-018-9723-8.

Zhu, N.; Zhong, C.; Liu, T.; Zhu, Y.; Gou, S.; Bao, H.; Yao, J.; Ni, J. Newly designed antimicrobial peptides with potent bioactivity and enhanced cell selectivity prevent and reverse rifampin resistance in Gram-negative bacteria. *Eur J Pharm Sci.* **2021**, *158*, 105665. doi: 10.1016/j.ejps.2020.105665.

7. ANEXO: ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO *Toxins* (MDPI)

Ferreira, P.M.; Silva, F.F.M.D.; Santos, J.S.D.; Silva, B.O.; Santana, C.J.C.; Pires Júnior, O.R.; Fontes, W.; Castro, M.S. The therapeutic potential of antimicrobial peptides isolated from the skin secretions of anurans of the genus *Boana* in the face of the global antimicrobial resistance crisis. *Toxins (Basel)* **2025**, *17*(7), 312. doi: 10.3390/toxins17070312.

Review

The Therapeutic Potential of Antimicrobial Peptides Isolated from the Skin Secretions of Anurans of the Genus *Boana* in the Face of the Global Antimicrobial Resistance Crisis

Priscila Mendes Ferreira ^{1,†}, Fabiano Fagundes Moser da Silva ^{1,†} , Joyce Silva dos Santos ¹,
Brunna de Oliveira Silva ¹, Carlos José Correia de Santana ¹ , Osmindo Rodrigues Pires Júnior ¹ ,
Wagner Fontes ²  and Mariana S. Castro ^{1,2,*} 

¹ Laboratory of Toxinology, Physiological Sciences Department, Biological Sciences Institute, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, DF, Brazil; primendesf@gmail.com (P.M.F.); fabiano.biomedico@gmail.com (F.F.M.d.S.); joycee.silva1709@gmail.com (J.S.d.S.); brunna.oliveira014@gmail.com (B.d.O.S.); osmind@unb.br (O.R.P.J.)

² Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, Cellular Biology Department, Biological Sciences Institute, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, DF, Brazil; wagnerf@unb.br

* Correspondence: mscastro@unb.br

† These authors contributed equally to this work.

Abstract

Microorganisms play a dual role in human health, serving as both essential allies and serious threats. Their association with infections led to the development of antimicrobials like penicillin, which revolutionized medicine. However, the emergence of antimicrobial resistance (AMR) has created a global health crisis, rendering many treatments ineffective due to pathogen mutations and acquired resistance mechanisms, particularly among ESKAPE pathogens. This resistance increases morbidity, mortality, and healthcare costs, exacerbated by antibiotic overuse and globalization. Biofilms and sepsis further complicate treatment. Addressing AMR requires new therapies, rational antibiotic use, and innovative approaches for drug discovery. Coordinated global action is essential to ensure future access to effective treatments. Antimicrobial peptides (AMPs) derived from *Boana* species (Anura, Hylidae) represent a promising alternative in the fight against AMR. These peptides exhibit activity against multidrug-resistant pathogens. Unlike conventional antibiotics, *Boana* peptides act through a broad mechanism that limits resistance development. Their ability to disrupt bacterial membranes and modulate immune responses makes them ideal candidates for the development of new treatments. These peptides may offer valuable alternatives for treating resistant infections and addressing the global AMR crisis.

Keywords: Anurans; *Boana*; skin secretion; antimicrobial resistance crisis; antimicrobial peptides; therapeutic properties

Key Contribution: Microorganisms are both allies and threats, with antimicrobial resistance (AMR) emerging as a global crisis that undermines treatments and increases healthcare burdens. Antimicrobial peptides from *Boana* species offer a promising solution, acting broadly against resistant pathogens, while innovative strategies could contribute to infection control and address the AMR crisis.



Received: 8 May 2025
Revised: 5 June 2025
Accepted: 12 June 2025
Published: 20 June 2025

Citation: Ferreira, P.M.; Silva, F.F.M.d.; Santos, J.S.d.; Silva, B.d.O.; Santana, C.J.C.d.; Pires Júnior, O.R.; Fontes, W.; Castro, M.S. The Therapeutic Potential of Antimicrobial Peptides Isolated from the Skin Secretions of Anurans of the Genus *Boana* in the Face of the Global Antimicrobial Resistance Crisis. *Toxins* **2025**, *17*, 312. <https://doi.org/10.3390/toxins17070312>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Microorganisms play a dual role in human health—as both essential allies and serious threats. Since the pioneering work of Leeuwenhoek, whose innovations laid the foundation for microbiology, our understanding of their role in human disease has significantly expanded, particularly in identifying them as causative agents of infections [1]. To combat microbial infections, antimicrobial agents have become a cornerstone of treatment strategies globally. The discovery of the first antibiotic, penicillin, drastically reduced infectious diseases and saved millions of lives, especially during World War II. Following this discovery, Sir Alexander Fleming warned of the potential for the emergence of bacterial resistance to antibacterial treatments, and soon cases of treatment failures were reported [2].

Multidrug-resistant organisms now spread rapidly across regions and continents through humans, animals, and water [3]. In the 21st century, with globalization and urbanization, treatments can no longer confine resistant strains solely to healthcare settings. Many infectious diseases have become increasingly difficult to control. Major surgeries pose a greater risk due to infection complications. Resistant strains now circulate not only in clinical settings but also in the environment—via agriculture, livestock, and the general population [4].

2. Antimicrobial Resistance

Antimicrobial resistance (AMR) refers to the ability of microorganisms—including bacteria, fungi, and parasites—to withstand the effects of drugs designed to eliminate them, such as antibiotics, antifungals, and antiparasitics. This occurs through mutations or the acquisition of resistance genes, allowing pathogens to survive treatments that were once effective [5]. AMR is one of the greatest threats to global health, as it compromises the ability to treat infections, leading to increased morbidity, mortality, and healthcare costs [6].

This growing resistance has intensified the need for new antimicrobial agents. The World Health Organization (WHO) has highlighted this crisis by listing priority pathogens urgently requiring new antibiotics [7]. The ESKAPE pathogens—*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp.—are particularly concerning. In response, researchers are exploring alternative strategies, including adjuvant therapies to boost antibiotic efficacy and the discovery of novel natural and synthetic antimicrobial compounds [7].

The increasing threat of AMR in pathogens like *Pseudomonas aeruginosa*, for instance, presents a major challenge to global public health. *P. aeruginosa* is a Gram-negative bacterium capable of resisting a broad range of antibiotics. This resistance is driven by mechanisms such as efflux pump expression, target site modification, and the production of degrading enzymes like β -lactamases. These bacteria also form biofilms, which hinder antibiotic penetration and promote persistent infection. Given the complexity of resistance in *P. aeruginosa*, new strategies such as antimicrobial peptides (AMPs), bacteriophage therapy, and quorum sensing inhibition—which disrupts bacterial communication required for biofilm formation—are being investigated [8]. AMR not only complicates infection management but also increases treatment duration, healthcare costs, and patient morbidity and mortality. This impact is especially critical in hospital settings, where resistant infections lead to longer hospitalizations and the need for more aggressive interventions. Overuse and misuse of antibiotics are key drivers of resistance. Addressing this requires policies promoting rational use, public education to discourage self-medication, and stronger surveillance and infection control in healthcare settings [8,9].

Millions of deaths from infections occur each year, and treatment failure cannot always be attributed to genetic resistance alone. Fundamental mechanisms, such as biofilm formation and sepsis, play crucial roles in clinical scenarios where antibiotics are ineffective.

Biofilms, which are implicated in approximately 65% of infections, confer adaptive resistance by limiting drug penetration and enhancing microbial persistence. Sepsis accounts for nearly 20% of global mortality. Despite being the first-line treatment, antibiotics fail in approximately 23% of cases. Emerging research also highlights the role of host microbiota and immune-modulating therapies as adjunct strategies to address treatment failure. The limited availability of effective therapies and the potential inefficacy of new antibiotics underscore the urgent need to develop new anti-infective agents that directly address therapeutic failure, to mitigate this persistent and increasingly severe problem [10].

Ultimately, developing new therapeutic strategies to combat AMR is critical. In addition to discovering novel antimicrobial compounds, combining therapies with different mechanisms of action can help minimize resistance emergence. Another promising approach involves modifying existing molecules to overcome resistance. Sustained research and innovative strategies are vital to counter this escalating threat and safeguard global public health [7].

The development of new antibiotics is a lengthy and costly process, with few economic incentives for the pharmaceutical industry. Since 2014, only 18 new antibiotics have been approved, highlighting the slow progress despite rising resistance threats [8]. Antibiotic research and development require substantial investment in financial resources and time, which discourages large companies from investing in this field. The rapid evolution of resistance—particularly in *P. aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)—can render new drugs ineffective within short timeframes, increasing urgency for alternatives [8,9].

The antibiotic crisis requires a coordinated global response, combining the search for new antimicrobials with robust resistance prevention and control policies. Developing new therapies must go hand-in-hand with antimicrobial stewardship programs to ensure prudent and responsible antibiotic use. Crucially, sustained funding and government support are needed to overcome the economic barriers in drug development. Integrating advanced technologies like artificial intelligence and machine learning with effective resistance management strategies could provide a sustainable solution to the AMR crisis, helping preserve effective bacterial treatments for future generations [7,11].

3. AMPs from Anurans as Therapeutic Alternatives for the Antibiotic Crisis

AMPs are defense molecules found in a wide variety of organisms, from bacteria to humans. These peptides play a crucial role in innate immunity, offering a first line of defense against microbial infections. They are typically short peptides, from 10 to 50 amino acids in length, and possess an amphipathic structure—having both hydrophilic and hydrophobic regions—that enables interaction with cell membranes. Most AMPs act directly on the membranes of pathogens, forming pores or destabilizing the membrane, leading to cell death. Some AMPs also interfere with protein synthesis, nucleic acid functions, or other essential intracellular pathways. In addition, many exhibit immunomodulatory activity [12–14].

In the context of the current antibiotic crisis, AMPs have gained prominence as potential alternatives or complements to conventional antibiotics. Given the growing global threat of AMR, AMPs are increasingly viewed as promising therapeutic options. AMPs act rapidly and are less likely to induce resistance, as they primarily target cell membranes—structures less susceptible to resistance-conferring mutations [15–19].

AMPs exert their effects through multiple mechanisms, including direct interaction with bacterial cell membranes, disruption of membrane integrity, and translocation into the cell to interfere with vital processes such as protein and nucleic acid synthesis [20].

Beyond their direct antimicrobial effects, AMPs exhibit a wide range of therapeutic properties, including antibiofilm, immunomodulatory, anti-inflammatory, wound-healing, and anticancer activities. Their ability to disrupt bacterial membranes makes them effective against multidrug-resistant pathogens, while their immunomodulatory functions help regulate host immune responses, reducing excessive inflammation [19,21].

The skin secretions of amphibians, especially species from the order Anura, are rich sources of AMPs and have been the subject of intense research due to their therapeutic potential. Produced in the granular glands of the skin, these peptides serve as the first line of defense for anurans in pathogen-rich, humid environments. Many of these peptides have shown a broad range of therapeutic activities, including antimicrobial, anticancer, immunomodulatory, and metabolic regulatory effects, making them promising candidates for the development of new therapeutic agents [20,22–28] (Figure 1).

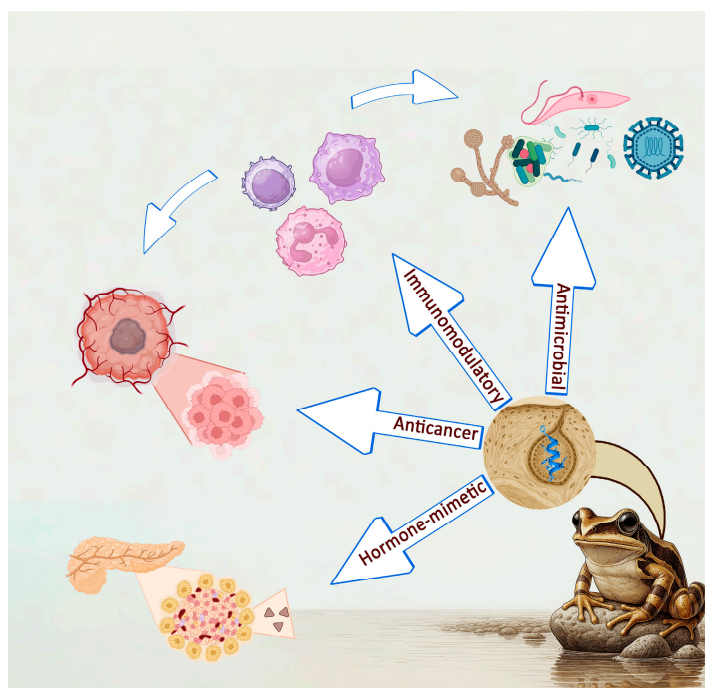


Figure 1. The main biological activities exhibited by anuran AMPs.

Several frog skin peptides enhance both innate and adaptive immunity by stimulating cytokine production in macrophages and lymphoid cells. Some, like frenatin 2D [29] and plasticin-L1 [30], lack direct antimicrobial effects but strongly activate macrophages. Others, including esculentin-2Cha [31], magainin-AM1 [32], and frenatins [33], exhibit both antimicrobial and immunostimulatory properties, making them promising pharmaceutical candidates.

AMPs promote tissue regeneration by enhancing cell migration and angiogenesis, making them valuable in chronic wound therapy [34]. Due to their small size and low production cost, amphibian-derived peptides are promising agents for treating chronic wounds. These peptides accelerate wound healing by promoting keratinocyte and fibroblast proliferation, immune cell recruitment, and immune response regulation [35]. Some, like MSI-1 [36] and brevinin-2PN [37], also exhibit antimicrobial activity, aiding infected wound healing. Their efficiency and defined mechanisms make them strong candidates for novel wound-healing therapies, offering potential for innovative treatments in regenerative medicine and antimicrobial applications.

Furthermore, some AMPs demonstrate selective cytotoxicity toward cancer cells [23,38]. For example, temporin-1CEa, an anticancer peptide from *Rana chensinensis*, binds negatively

charged cancer cell membranes, inducing necrosis. Researchers designed 12 derivative peptides via double-cysteine scanning, with most showing enhanced anticancer activity. Nu-7 exhibited the strongest activity, possessing greater α -helicity than temporin-1CEa. Linked to podophyllotoxin, Nu-7-1 demonstrated superior anticancer effects, lower toxicity to normal HUVECs, and reduced hemolytic activity at therapeutic concentrations. Nu-7-1 damages cancer cell membranes and induces apoptosis. These modifications significantly enhanced anticancer activity and provide valuable insights for designing safer, more potent peptide-based therapies [39].

These multifunctional properties highlight their potential as versatile therapeutic agents in combating infections, chronic diseases, and even cancer.

Bioprospecting anuran skin secretions has yielded numerous peptides with promising therapeutic potential. Frogs, particularly those from the Leptodactylidae and Hylidae families, produce a wide range of peptides that serve as innate immune defense molecules, offering new templates for drug development [28,40]. These discoveries highlight the importance of biodiversity conservation, as many amphibian species are threatened by habitat loss and climate change [41,42]. Bioprospecting AMPs from anuran skin secretions involves a series of technical procedures to isolate, characterize, and evaluate their bioactivity. The process typically begins with non-invasive skin secretion collection, often induced by mild electrical stimulation or norepinephrine injection—both ethically approved methods that trigger peptide release. The crude secretion is then subjected to fractionation using high-performance liquid chromatography (HPLC), allowing for the separation of individual peptides based on their physicochemical properties such as hydrophobicity and charge [43,44]. Once isolated, peptide sequences are determined via mass spectrometry (MS) and Edman degradation, enabling structural identification [45]. De novo sequencing approaches, combined with bioinformatics tools, facilitate the classification of novel AMPs and their relationship with known antimicrobial sequences. Functional characterization includes antimicrobial assays against clinically significant pathogens, evaluating the minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal effects, including activity against biofilms. Additionally, hemolysis and cytotoxicity assays assess selectivity toward microbial cells over mammalian cells, ensuring therapeutic potential [25,46]. Advancements in peptide synthesis and engineering further enhance AMP stability, biological activity, and bioavailability, contributing to drug development efforts [47–51]. Integrating these methodologies ensures a systematic and efficient approach to discovering novel therapeutic peptides from amphibians.

Constructing cDNA libraries from anuran skin secretions enables the cloning and characterization of AMP-encoding genes, facilitating the discovery of peptides with antimicrobial and antiviral properties. This approach has been successfully used to isolate and identify promising AMPs with therapeutic properties. For example, studies involving peptidomics and genomics analyses of *Odorrana grahami* identified 372 cDNA sequences encoding 107 novel AMPs across 30 families, including 24 new groups. This unprecedented diversity, driven by genetic mutations and recombination, challenges AMP redundancy in host defense. The peptides displayed diverse structures and antimicrobial mechanisms, including membrane disruption and DNA condensation. Forty AMPs were synthesized, revealing potential as antibiotic templates and emphasizing amphibian innate immunity [52]. Another relevant study is that by Ma et al. (2023) [53], which identified a dermaseptin-SS1 (SS1), a novel AMP, from *Phyllomedusa tarsius* skin secretions using a cDNA library and ‘shotgun’ cloning. Chemically synthesized, SS1 displayed broad activity against Gram-negative bacteria with low hemolytic potential. Its analog, 14V5K, demonstrated faster killing kinetics and lower salt sensitivity. Both peptides targeted bacterial membranes and

displayed significant antiproliferative activity against lung cancer cells, highlighting their therapeutic potential.

The application of these techniques (Figure 2) can accelerate the identification of new AMPs, providing new treatment options and contributing to biodiversity conservation while offering innovative therapeutic alternatives.

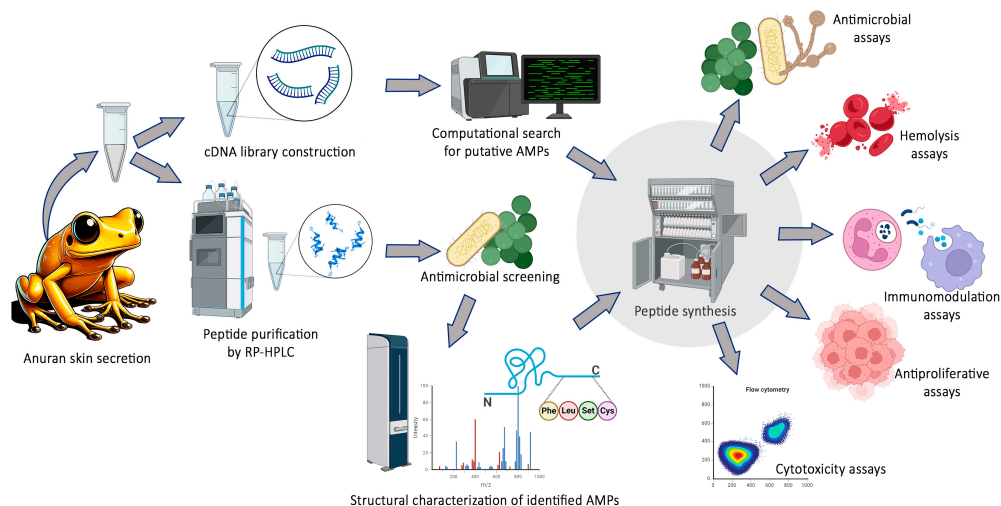


Figure 2. Workflow for the identification and characterization of novel AMPs.

AMPs are generally classified by their secondary structures: β -sheets, α -helices, and linear or extended peptides. Most AMPs are cationic and amphipathic, properties that facilitate their interaction with microbial membranes [54,55]. The structural properties of AMPs largely dictate their membrane-targeting mechanisms of action. These mechanisms of action include the barrel-stave, toroidal pore, and carpet-like models described below (Figure 3).

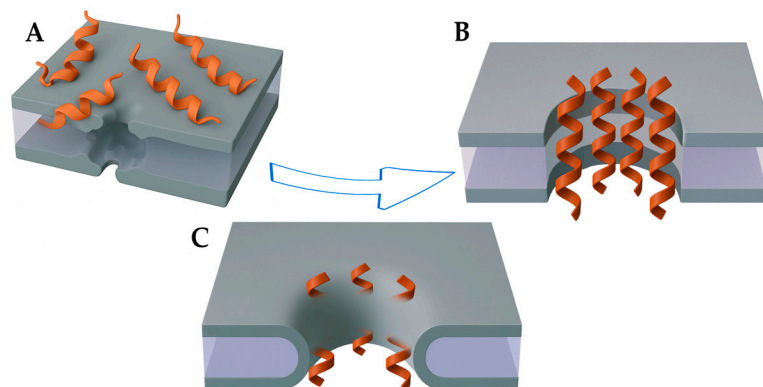


Figure 3. Membrane mode of action of AMPs. (A) Carpet-like model. (B) Barrel-stave model. (C) Toroidal pore model.

3.1. Barrel-Stave Model

In the barrel-stave model, AMPs disrupt bacterial membranes by forming trans-membrane pores. This model involves three key steps: (1) binding of monomers to the membrane, (2) insertion into the membrane to form pores, and (3) recruitment of additional monomers to expand the pore [56,57]. In the barrel-stave model, peptides insert perpendicularly into the lipid bilayer, and the subsequent recruitment of additional peptides leads to the formation of a transmembrane pore lined by these peptides. In this pore structure, the peptides are arranged with their hydrophobic sides facing the membrane’s lipid core

and their hydrophilic regions oriented toward the pore's interior. This configuration causes cellular contents to leak, ultimately resulting in cell death [58].

3.2. Toroidal Pore Model

The toroidal pore model shares structural similarities with the barrel-stave model but differs in its lipid–peptide interactions. In this model, monomers are also recruited, causing the pore to enlarge. Unlike barrel-stave pores, toroidal pores involve direct lipid–peptide cooperation: as AMPs insert into the membrane, they induce lipid curvature, continuously bending the monolayers inward. This results in a water-filled pore lined by both peptides and lipid headgroups, such as phosphatidylcholine. The peptides embed in the membrane, with hydrophobic regions interacting with lipid tails and hydrophilic regions stabilizing the pore interior. This process thins the membrane, reducing the energy required for pore formation and resulting in a configuration that allows for more fluid peptide–membrane interaction, increasing the efficiency of pore formation and subsequent cell lysis [57–59].

3.3. Carpet-like Model

In the carpet model, peptides interact electrostatically with the cell membrane: the positively charged regions bind to the negatively charged areas of the phospholipid layer. The peptides align parallel to the membrane surface, coating it in a carpet-like fashion. In this arrangement, the hydrophobic regions of the peptides contact the lipid core, while the polar faces interact with the charged groups of phospholipids, inducing curvature in the lipid bilayer. In the carpet model, the accumulation of AMPs on the membrane surface generates tension within the lipid bilayer. This tension destabilizes the membrane structure, ultimately leading to disruption of lipid packing, loss of membrane integrity, and formation of mixed peptide–lipid micelles. The process resembles a detergent-like mechanism, where high peptide density overwhelms the membrane, causing micellization and cell lysis [59].

3.4. Shai-Huang-Matsuzaki Model

The Shai–Matsuzaki–Huang model unifies key aspects of previous AMP mechanisms, proposing that AMPs act through dynamic, concentration-dependent interactions influenced by the properties of the membrane environment. According to this model, AMPs first accumulate on the membrane surface, where their cationic regions electrostatically bind to anionic phospholipids, while their hydrophobic domains integrate into the lipid bilayer. Initially, peptides align parallel to the membrane, but, upon reaching a critical concentration, they undergo a conformational shift, inserting perpendicularly into the bilayer. This structural rearrangement disrupts membrane integrity, forming transient toroidal pores—short-lived openings lined by peptides and lipid headgroups [60,61]. The model emphasizes the role of peptide-to-lipid ratio: at high concentrations, AMPs exhibit detergent-like behavior, leading to complete membrane dissolution, while, at lower concentrations, they induce transient perturbations, facilitating peptide translocation without immediate lysis. This translocation enables AMPs to access intracellular targets, including DNA, expanding their antimicrobial range beyond membrane disruption. The transient nature of these pores enhances peptide penetration, as frequent pore formation increases AMP translocation across the membrane. This process is influenced by peptide properties (e.g., size, charge, amphipathicity) and membrane composition. By integrating electrostatic interactions, amphiphilic insertion, and dynamic pore formation, the Shai–Matsuzaki–Huang model explains how AMPs selectively disrupt microbial membranes while enhancing selectivity toward microbial membranes, minimizing host cell toxicity [13,60,61].

Among the most studied AMP families from anurans, dermaseptins, brevinins, and temporins stand out. Dermaseptins, for example, were initially isolated from frogs of the genus *Phyllomedusa* and are known for their potent activity against Gram-positive and

Gram-negative bacteria, as well as fungi and protozoa [40,62]. Brevinins, found in frogs of the genus *Rana*, exhibit high antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as fungal pathogens [63]. Temporins are small AMPs (typically ranging from 10 to 13 amino acids) from frog skin, particularly from *Rana* species. They primarily targeted Gram-positive bacteria, including multi-resistant strains, by disrupting microbial membranes. Their immunomodulatory properties further enhance their value as potential therapeutic agents [38]. The diversity and efficacy of these peptides make them a promising source for the discovery of new antimicrobial drugs.

In summary, AMPs represent a diverse and powerful class of defensive molecules that play a crucial role in combating AMR. Their ability to act on different pathogens, combined with their low propensity to induce resistance, makes them ideal candidates for next-generation therapeutics. In the specific case of anurans, the AMPs found in their skin stand out for their broad activity and versatility, offering an abundant and underexplored source of new therapeutic agents at a critical time of global antibiotic crisis.

4. The Therapeutic Potential of AMPs from Anurans of the Genus *Boana*

Anurans of the genus *Boana* (formerly classified as *Hypsiboas*) were reclassified following a thorough taxonomic analysis by Dubois (2017) [64], which validated *Boana* as the correct scientific name for this group. The reclassification underscores an improved understanding of the diversity and phylogenetic relationships within the family Hylidae. Adopting the name *Boana* not only rectifies prior nomenclature but also emphasizes the critical role of ongoing taxonomic revisions in aligning species classification with their evolutionary history and biological diversity [64]. Accordingly, this review will also include peptides initially identified in *Hypsiboas* species that have since been reclassified as *Boana*.

Boana frogs are found across tropical and subtropical Americas, primarily inhabiting humid forests near water bodies. They show diverse morphology and ecology, with adhesive toe discs, long limbs, and color patterns often related to adaptations to their respective habitats [65,66]. *Boana* species display complex vocal behaviors during breeding to attract mates and defend territories [67].

Research on AMPs extracted from anuran skin has revealed a wealth of compounds with promising activity against bacterial, viral, and fungal pathogens. Among these, the genus *Boana* has emerged as a particularly rich source of AMPs.

The following section presents examples of peptides with therapeutic potential isolated from species of the *Boana* genus. The peptides are presented in chronological order, except when publications are directly related to the peptide under discussion.

Hylaseptin P1 (HSP1), a 14-residue amphipathic α -helical peptide from *Boana punctata* (previously *Hypsiboas punctatus*), showed comparable activity to commercial antibiotics: MICs of 6.1 μ M for *S. aureus*, 24.4 μ M for *Escherichia coli*, and 48.8 μ M for *P. aeruginosa*. It also inhibited *Candida* spp. more effectively than fluconazole. At 195.2 μ M (32 \times its MIC against *S. aureus*), it caused $\leq 5\%$ hemolysis and showed minimal cytotoxicity on white cells or platelets in cytometric assays [68].

Junior et al. (2017) [69] developed a strategy to glycosylate HSP1-NH₂ using solid-phase peptide synthesis and copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, producing two glycotriazole-peptides and a triazole derivative. Biophysical assays confirmed stronger membrane disruption and lytic activity for glycotriazole-peptides. Biological tests showed enhanced antifungal activity and strong ergosterol biosynthesis inhibition in *Candida albicans*, attributed to membrane disruption (saccharide ring) and ergosterol inhibition (triazole and monosaccharide presence). These findings highlight glycotriazole-peptides as promising antifungal agents.

A new family of AMPs, Raniseptins, was identified in the skin secretion of *Boana raniceps* (previously *Hypsiboas raniceps*) [70] (Figure 4). Nine cDNAs were cloned, sequenced, and peptides characterized. Raniseptins resemble dermaseptins in structure and are post-translationally cleaved into inactive fragments, likely to reduce toxicity or serve defensive functions. Raniseptin-1 (Rsp-1), the most abundant raniseptin in *B. raniceps* skin secretions, showed antimicrobial activity against *E. coli* (MIC = 5 μ M), *P. aeruginosa* (MIC = 10 μ M), and *S. aureus* (MIC = 20 μ M), comparable to dermaseptins. Its fragments had weak or no activity, except against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. (MIC = 5 μ M for Rsp-1(1–14)). The Rsp-1 fragments showed negligible hemolytic activity, while full-length Rsp-1 caused 20% hemolysis at 80 μ M. MALDI imaging revealed intact peptide storage in glandular domains, with post-secretory cleavage generating inactive fragments, suggesting a role in predator defense rather than antimicrobial action.



Figure 4. Adult specimen of *Boana raniceps*. Photo by Carlos José Correia de Santana.

Popov et al. (2019) [71] isolated three peptides (AC12, DK16, and RC11) from *B. raniceps* skin secretion. RC11 showed antimicrobial activity against *E. coli*, while AC12 and DK16 had no effect. AC12 was non-cytotoxic to RAW 264.7 cells, whereas DK16 and RC11 reduced cell viability. Hemolysis was minimal for AC12 and RC11, but DK16 demonstrated high hemolytic activity. AC12 and DK16 significantly reduced TNF- α and IL-12, with DK16 showing stronger effects. Both peptides also lowered IL-10 levels. Additionally, AC12 and DK16 inhibited NO production in a dose-dependent manner. In the in vivo carrageenan-induced paw edema assay, AC12 effectively reduced inflammation and edema, similar to dexamethasone. In the carrageenan-induced peritonitis assay, AC12 and RC11 reduced TNF- α , while AC12 also increased IL-10. Overall, AC12 was the most effective in reducing inflammation, highlighting its therapeutic potential.

Figainin 1, a novel peptide from *B. raniceps*, showed strong antibacterial activity against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, and *E. casseliflavus* (with MICs ranging from 2 μ M to 16 μ M). Although Figainin 1 was ineffective against *P. aeruginosa* and *Candida*, it exhibited antiparasitic activity (*Trypanosoma cruzi* epimastigotes, IC₅₀ = 15.9 μ M) and cytotoxicity against both fibroblasts and multiple cancer cell lines (B16F10, MCF-7, HeLa). Despite its toxicity to noncancerous cells, Figainin 1 holds potential for developing novel anticancer and anti-infective agents [46].

A study on the multifunctional peptide Figainin 2, also derived from the frog *B. raniceps*, revealed broad-spectrum biological activities, including antimicrobial, antiparasitic, antiviral, and immunomodulatory effects. The peptide demonstrated potent antibacterial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria, notably including multidrug-resistant *K. pneumoniae*, with particularly strong efficacy against *S. epidermidis* and *E. casseliflavus* (though inactive against *Candida* spp.). Figainin 2 exhibited significant antiparasitic activity against *T. cruzi* epimastigotes (IC₅₀ = 6.32 μ M) and displayed moderate hemolysis (23% at 32 μ M). It also showed promising anticancer effects, inhibiting murine

melanoma (B16F10, $IC_{50} = 12.8 \mu\text{M}$) and human breast cancer cells (MCF-7, $IC_{50} = 15.3 \mu\text{M}$). Additionally, Figainin 2 exhibited dose-dependent antiviral activity against CHIKV, DENV4, and YFV ($EC_{50} = 17\text{--}21.8 \mu\text{M}$) without cytotoxicity to noninfected Huh7 cells at $25 \mu\text{M}$. At $8 \mu\text{M}$, it stimulated reactive oxygen species (ROS) production in human neutrophils, comparable to the bacterial peptide fMLP [43]. These findings position Figainin 2 as a candidate for development in anti-infective, anticancer, and immunomodulatory therapies—pending optimization to reduce hemolytic effects.

Raniseptins-3 and -6 are cationic peptides from *B. raniceps* skin secretions that adopt α -helical conformations in membrane-mimetic environments, consistent with membrane-disruptive mechanisms. They showed strong antibacterial activity, particularly against *E. coli*, *K. pneumoniae*, and a carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strain, with MICs as low as $1\text{--}4 \mu\text{M}$. Raniseptin-3 was notably more effective against *S. aureus* than Raniseptin-6. Despite high concentrations, neither peptide effectively inhibited *C. albicans*. Hemolytic assays demonstrated low toxicity toward human erythrocytes at therapeutic levels ($<5\%$ hemolysis). However, both peptides showed cytotoxic effects against murine fibroblasts (NIH3T3) and melanoma cells (B16F10), with low IC_{50} values. In antiviral assays against MHV-3, a murine hepatitis virus that shares the same genus (*Betacoronavirus*) with the SARS-CoV-2 virus, neither peptide improved cell viability or reduced viral cytotoxicity. These findings underscore their antimicrobial and anticancer potential [45].

The skin secretion of *Boana albopunctata* (previously *Hypsiboas albopunctatus*) led to the isolation of Hylin a1, a cytolytic 18-residue amidated peptide. Hylin a1 displayed broad-spectrum antimicrobial activity, particularly against Gram-positive bacteria (*S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, MICs: $8\text{--}16 \mu\text{M}$) and was also active against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. It also exhibited high hemolytic activity ($HC_{50} = 18 \mu\text{M}$) [72].

Hylin a1's antitumor effects were evaluated, and its targeting was enhanced by RGD conjugation, forming RGD-hylin a1, which was loaded onto mesoporous silica (HMS-COOH). The RGD-hylin a1-HMS system induced cancer cell apoptosis at pH 5.5, remained harmless at pH 7, and reduced hemolysis by $50\text{--}100\%$. In tumor-bearing mice, it inhibited tumor growth by $50\text{--}60\%$, highlighting its potential as a targeted antitumor therapy [73].

The antibacterial activity of Hylin-a1 against *S. aureus* multi-resistant strains was assessed. Hylin-a1 exhibited bacteriostatic effects, inhibiting 90% of bacterial growth at $6.25 \mu\text{M}$, with enhanced potency ($\sim 3 \mu\text{M}$) against β -lactam- and methicillin-resistant strains. It modulated inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8) and altered *S. aureus* cell morphology, suggesting therapeutic potential for diverse *S. aureus* infections, including resistant strains [74].

Hylin-a1 was found to inhibit the entry of several viruses, including canine distemper virus (CDV, *Paramyxoviridae*), bovine viral diarrhoea virus (BVDV, *Flaviviridae*), Schmallenberg virus (SBV, *Bunyaviridae*), and animal herpesviruses, namely bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and caprine herpesvirus type 1 (CpHV-1). It likely acts through physical interaction with the hydrophobic viral surfaces. Further in vitro and in vivo studies are required to assess its clinical potential for human application [75].

In another study, Hylin-a1 demonstrates broad-spectrum antiviral activity against enveloped respiratory viruses (SARS-CoV-2, HCoV-229E, MeV, HPIV-3, RSV, influenza) by disrupting viral envelopes. Its ability to irreparably damage these pathogens suggests potential as a pan-inhibitor, offering a promising tool to combat current and future pandemics caused by enveloped viruses [76].

Recently, Chianese et al. (2024) [77] described that Hylin-a1 inhibits herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) by disrupting viral envelopes at early infection stages, including acyclovir-resistant strains. With low hemolysis, anti-inflammatory effects,

serum stability, and synergistic action with acyclovir, Hylin-a1 emerges as a promising clinical antiherpetic agent.

Another study conducted by Siano et al. (2014) [78] identified and characterized several AMPs in the skin of *Boana pulchella* (previously *Hypsiboas pulchellus*) using LC-MS-MS. Twenty-three novel sequences were identified, with three peptides selected for synthesis: P1-Hp-1971, P2-Hp-1935, and P3-Hp-1891. These peptides inhibited the growth of *E. coli* and *S. aureus*, with P1-Hp-1971 and P3-Hp-1891 showing the highest activity. P1-Hp-1971 exhibited the best therapeutic indices, particularly against *S. aureus*.

Nacif-Marçal et al. (2015) [79] isolated and characterized the peptide Hs-1 from the skin of *Boana semilineata* (previously *Hypsiboas semilineatus*). Hs-1 showed selective antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, with a MIC range from 11 to 46 μM , but it did not show any effect against Gram-negative bacteria. Transmission electron microscopy analysis revealed that Hs-1 affects bacterial cells in a distinct manner, suggesting a specific mechanism of action.

In addition to antibacterial applications, the antiviral activity of peptide Hs-1 has also been a focus of research. Monteiro et al. (2018) [80] found that it effectively inhibits infection by dengue virus serotypes 2 and 3, demonstrating promising antiviral potential. The Hs-1 peptide inhibited dengue-2 (DENV-2) and dengue-3 (DENV-3) infection in adsorption assays (90–100%, dose-dependent). Internalization assays showed 95–100% inhibition for DENV-2 and 80–90% for DENV-3. qPCR confirmed fewer viral genome copies, especially for DENV-2. Hs-1 likely prevents viral attachment by neutralizing heparan sulfate. In vivo, Hs-1 provided 100% protection against DENV-2 and 40% against DENV-3, supporting viral envelope disruption as its mechanism. Further studies on other serotypes are needed for broader efficacy [80].

A novel peptide family named Pugnins was discovered by Liscano et al. (2021) [81] in the skin transcriptome of *Boana pugnax*, displaying dual antibacterial and anticancer activities. Molecular docking and dynamics simulations revealed strong interactions between Pugnins and bacterial membranes, as well as anticancer targets, suggesting their potential as therapeutic agents. Experimental studies verified their effectiveness against both Gram-positive and Gram-negative bacterial strains with MIC values ranging from 2 μM to 16 μM . The peptides also showed promising cytotoxicity against cancer cell lines, suggesting anticancer potential. While Pugnins displayed moderate hemolytic effects, the findings emphasize the value of amphibian-derived peptides in therapeutics and demonstrate how computational methods can accelerate the discovery of bioactive drug candidates.

Another example is the work by Nunes et al. (2021) [82], who investigated the peptide Hylaseptin-4, an AMP isolated from *B. punctata*, which displays a well-defined α -helical conformation in biomimetic environments, forming aggregates at elevated concentrations. The peptide demonstrates pH-dependent antibacterial activity, with MIC values of 22 μM against both *E. coli* and *S. aureus*, and 44 μM against *P. aeruginosa* at acidic to neutral pH (5.0–6.7). Notably, its antimicrobial efficacy diminishes at pH 8.0, corresponding to reduced helical stability. Molecular dynamics simulations indicate that self-aggregation may contribute to both structural integrity and enhanced antimicrobial activity under physiological conditions.

In *Boana picturata*, new families of AMPs, such as picturins and pictuseptins, were identified. Pictuseptins, in particular, demonstrated broad antimicrobial and antifungal activity, with low hemolytic activity, suggesting good selectivity [83].

Another study focused on *Boana boans* revealed the presence of host defense peptides with therapeutic potential, including figainin 2BN, which exhibited strong antimicrobial and cytotoxic activity, albeit without cancer cell selectivity—limiting therapeutic application [84].

The natural peptide BcI-1003 from *Boana cordobae* shows promise as a multi-target therapeutic agent for Alzheimer's disease (AD). It inhibits BChE (butyrylcholinesterase, $IC_{50} = 669 \mu\text{M}$) and MAO-B (monoamine oxidase B, $IC_{50} = 570 \mu\text{M}$) and shows potent antioxidant activity ($EC_{50} = 7.24 \mu\text{M}$). BcI-1003 also acts against drug-resistant bacteria, particularly *E. coli* MDR-1 ($MIC = 8 \mu\text{M}$), and is non-toxic to human erythrocytes. These properties support its potential for treating AD and microbial infections [85].

Studies with *Boana platanera* identified multifunctional host defense peptides that exhibited rapid bactericidal and cytotoxic activities against human tumor cells, as well as stimulated insulin release, suggesting their potential as new anti-infective and antidiabetic agents. Five host-defense peptides (figainin 2PL, hylin PL, raniseptin PL, plasticin PL, and peptide YL) were isolated from the skin secretions of the frog *Boana platanera*. Raniseptin PL and figainin 2PL exhibited strong bactericidal activity against ESKAPE pathogens and *Clostridioides difficile*, as well as potent cytotoxic effects on human tumor cell lines (A549, MDA-MB-231, and HT29) with low hemolytic activity against mouse erythrocytes. The peptides hylin PL, raniseptin PL, and peptide YL enhanced insulin release from β -cells, with peptide YL showing the greatest effect, suggesting its potential for developing new anti-diabetic drugs [86].

Table 1 presents the peptides isolated from the skin secretion of anurans of the genus *Boana* described in this review article, along with their primary structures, charge and main biological activities.

Table 1. AMPs isolated from the skin secretion of *Boana* species.

Peptide	Sequence	Species	Biological Activity	Charge ^a	Reference
Hylaseptin P1	GILDAIKAIKAAG ^b	<i>Boana punctata</i>	Antibacterial Antifungal	+1	[68]
Raniseptin-1	AWLDKLSLKGKVVVGKVALGVAQNYL NPQQ	<i>Boana raniceps</i>	Antibacterial	+3	[70]
AC12	ACFLTRLGTYVC-NH ₂	<i>Boana raniceps</i>	Immunomodulatory	+2	[71]
DK16	DKERPICSNTFRGRKC-NH ₂	<i>Boana raniceps</i>	Immunomodulatory	+4	[71]
RC11	RCFRRRGKLTIC-NH ₂	<i>Boana raniceps</i>	Antibacterial Immunomodulatory	+6	[71]
Figainin 1	FIGTLIPLALGALTCLFK-NH ₂	<i>Boana raniceps</i>	Antibacterial Anti- <i>T. cruzi</i> Anticancer	+3	[46]
Figainin 2	FLGAILKIGHALAKTVLPMVTNAFK PKQ	<i>Boana raniceps</i>	Antibacterial Anti- <i>T. cruzi</i> Anticancer Antiviral Immunomodulatory	+4	[43]
Raniseptin-3	AWLDKLSIGKVVVGKVAIGVAKNLL NPQ	<i>Boana raniceps</i>	Antibacterial Anticancer	+4	[45]
Raniseptin-6	ALLDKLSLKGKVVVGKVALGVVQNY LNPRQ	<i>Boana raniceps</i>	Antibacterial Anticancer	+4	[45]
Hylin a1	IFGAILPLALGALKNLIK-NH ₂	<i>Boana albopunctata</i>	Antibacterial Antifungal Antiviral Immunomodulatory	+3	[72,74–77]
P1-Hp-1971	TKPTLLGLPLGAGPAAGPGKR-NH ₂	<i>Boana pulchella</i>	Antibacterial	+4	[78]
P2-Hp-1935	KLSPSLGPVSKGKLLAGQR-NH ₂	<i>Boana pulchella</i>	Antibacterial	+5	[78]

Table 1. Cont.

Peptide	Sequence	Species	Biological Activity	Charge ^a	Reference
P3-Hp-1891	RLGTALPALLKTLLAGLNG-NH ₂	<i>Boana pulchella</i>	Antibacterial	+3	[78]
Hs-1	FLPLILPSIVTALSSFLKQG-NH ₂	<i>Boana semilineata</i>	Antibacterial Antiviral	+2	[79,80]
Pugnin A	RLMRIFRILKLAR	<i>Boana pugnax</i>	Antibacterial Anticancer	+5	[81]
Pugnin B	RMMRIFWVIKLAR	<i>Boana pugnax</i>	Antibacterial Anticancer	+4	[81]
Hylaseptin-4	GIGDILKNLAKAAGKAALHAVGESL-NH ₂	<i>Boana punctata</i>	Antibacterial	+2	[82]
Picturin-1	GVFKDALKQLGAALLDKAANALKPK	<i>Boana picturata</i>	Antibacterial Antifungal	+3	[83]
Picturin-2	GVFKDALKQFGAALLDKAANALKPK	<i>Boana picturata</i>	Antibacterial Antifungal	+3	[83]
Picturin-3	GVFKDALKQFGAALLDQAANALKPK	<i>Boana picturata</i>	Antibacterial Antifungal	+2	[83]
Pictuseptin-1	GFLDTLKNIGKTVGRIALNVLT-NH ₂	<i>Boana picturata</i>	Antibacterial Antifungal	+3	[83]
Pictuseptin-2	GFLDTLKNIGKTVGGIALNVLT-NH ₂	<i>Boana picturata</i>	Antibacterial Antifungal	+2	[83]
Pictuseptin-3	GFLDTLKNIGKTVGKVALDVAKNVLT-NH ₂	<i>Boana picturata</i>	Antibacterial Antifungal	+3	[83]
Figainin 2BN	FLGVALKLGKVLGKALLPLASSLLHSQ	<i>Boana boans</i>	Antibacterial Anticancer	+3	[84]
Picturin 1BN	GIFKDTLKKVVAAVLTTVADNIHPK	<i>Boana boans</i>	Antibacterial Anticancer	+2	[84]
Picturin 2BN	GLMDMLKKVVGKVALTVAKSALLP	<i>Boana boans</i>	Antibacterial Anticancer	+3	[84]
BcI-1003	GSKKTKCPR-NH ₂	<i>Boana cordobae</i>	Antibacterial Antioxidant BChE inhibition MAO-B Inhibition	+5	[85]
Raniseptin PL	GVFDTVKKIGKAVGKFEALGVAKNYLNS-NH ₂	<i>Boana platanera</i>	Antibacterial Anticancer Antidiabetic	+5	[86]
Figainin 2PL	FLGTVLKLKGAIAKTVPMLTNAMQPKQ-NH ₂	<i>Boana platanera</i>	Antibacterial Anticancer	+5	[86]
Hysin PL	FLGLIPALAGAIGNLIK-NH ₂	<i>Boana platanera</i>	Antidiabetic	+2	[86]
Peptide YL	YVPGVIESLL-NH ₂	<i>Boana platanera</i>	Antidiabetic	0	[86]

^a Net charge at pH 7.0. Calculated with the peptide calculator tool at <https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/> (accessed on 4 June 2025). ^b Unless mentioned, peptides exhibit free C-terminus (-COOH).

5. Concluding Remarks

Exploring anuran biodiversity for novel AMPs is essential in the face of rising global AMR. Secreted through the skin, these peptides display broad antimicrobial and antiviral activity, positioning them as strong candidates for next-generation therapeutics. Studies

highlight their effectiveness against drug-resistant bacteria and emerging viral threats, including SARS-CoV-2 [27,28].

The chemical diversity of anuran-derived AMPs presents a valuable pool of molecules with varied mechanisms of action, offering potential breakthroughs in treating infections that current antibiotics struggle to manage. Beyond antimicrobial action, many AMPs modulate immune responses and promote tissue repair, making them attractive candidates for treating inflammatory and infectious conditions [35,87]. These multifunctional properties support their use in therapies for cancer, metabolic disorders, and chronic inflammation—beyond infection control.

Realizing their full therapeutic potential depends on systematic bioprospecting, peptide characterization, and mechanistic studies. Investment in this research not only advances pharmacological innovation but also promotes biodiversity conservation by highlighting the ecological importance of these species, since preserving amphibian biodiversity is not only vital for ecosystem health, but also fuels pharmacological innovation through AMP discovery.

Recent studies on *Boana* species underscore their value as sources of bioactive peptides with diverse therapeutic potential. *Boana*-derived AMPs represent a powerful and versatile class of bioactive molecules with demonstrated efficacy against pathogens, inflammation, and tumor cells and represent a promising foundation for developing alternative therapies. Integrating structural and functional studies is essential to harness their full potential in addressing microbial resistance and unmet medical needs.

Author Contributions: Conceptualization, M.S.C.; Writing—Original Draft Preparation, P.M.F., F.F.M.d.S., W.F. and M.S.C.; Writing—Review and Editing, J.S.d.S., B.d.O.S., C.J.C.d.S. and O.R.P.J.; Funding acquisition, M.S.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This manuscript was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPDF (Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal, Brazil), DPG, and DPI—FUB/UnB (Fundação Universidade de Brasília, Brazil).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study.

Acknowledgments: Figures 1–3 were created using elements from [BioRender.com](https://www.biorender.com).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

AI	Artificial intelligence
AD	Alzheimer’s disease
AMPs	Antimicrobial peptides
AMR	Antimicrobial resistance
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
HC ₅₀	Hemolytic concentration 50
HPLC	High-performance liquid chromatography
MIC	Minimum inhibitory concentration
MS	Mass spectrometry
WHO	World Health Organization

References

1. Antony, A.; Purayil, A.K.; Olakkaran, S.; Dhannura, S.; Shekh, S.; Gowd, K.H.; Gurushankara, H.P. Antimicrobial and antitumor properties of anuran peptide Temporin-SHF induce apoptosis in A549 lung cancer cells. *Amino Acids* **2024**, *56*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Abraham, E.P.; Chain, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Rev. Infect. Dis.* **1988**, *10*, 677–678. [[CrossRef](#)]
3. Decker, A.P.; Mechesso, A.F.; Wang, G. Expanding the landscape of amino acid-rich antimicrobial peptides: Definition, deployment in nature, implications for peptide design and therapeutic potential. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Brunetti, A.E.; Fuzo, C.A.; Aguilar, S.; Rivera-Correa, M.; Marani, M.M.; Lopes, N.P. The significance of hypervariability and conserved motifs in antimicrobial peptides from tree frogs. *J. Nat. Prod.* **2023**, *86*, 1761–1769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Laxminarayan, R.; Sridhar, D.; Blaser, M.; Wang, M.; Woolhouse, M. Achieving global targets for antimicrobial resistance. *Science* **2016**, *353*, 874–875. [[CrossRef](#)]
6. Murray, C.J.L.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Aguilar, G.R.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet* **2022**, *399*, 629–655. [[CrossRef](#)]
7. Mulani, M.S.; Kamble, E.E.; Kumkar, S.N.; Tawre, M.S.; Pardesi, K.R. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 539. [[CrossRef](#)]
8. Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B.R.; Lin, T.J.; Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 177–192. [[CrossRef](#)]
9. Vestergaard, M.; Frees, D.; Ingmer, H. Antibiotic resistance and the MRSA problem. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7*. [[CrossRef](#)]
10. de la Fuente-Nunez, C.; Cesaro, A.; Hancock, R.E.W. Antibiotic failure: Beyond antimicrobial resistance. *Drug Resist. Updat.* **2023**, *71*, 101012. [[CrossRef](#)]
11. Liu, G.Y.; Yu, D.; Fan, M.M.; Zhang, X.; Jin, Z.Y.; Tang, C.; Liu, X.F. Antimicrobial resistance crisis: Could artificial intelligence be the solution? *Mil. Med. Res.* **2024**, *11*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kumar, P.; Kizhakkedathu, J.N.; Straus, S.K. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules* **2018**, *8*, 4. [[CrossRef](#)]
13. Luo, Y.; Song, Y. Mechanism of antimicrobial peptides: Antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11401. [[CrossRef](#)]
14. Duarte-Mata, D.I.; Salinas-Carmona, M.C. Antimicrobial peptides' immune modulation role in intracellular bacterial infection. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1119574. [[CrossRef](#)]
15. Magana, M.; Pushpanathan, M.; Santos, A.L.; Leanse, L.; Fernandez, M.; Ioannidis, A.; Giulianotti, M.A.; Apidianakis, Y.; Bradfute, S.; Ferguson, A.L.; et al. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, e216–e230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Erdem Büyükkiraz, M.; Kesmen, Z. Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *J. Appl. Microbiol.* **2022**, *132*, 1573–1596. [[CrossRef](#)]
17. Li, X.; Zuo, S.; Wang, B.; Zhang, K.; Wang, Y. Antimicrobial mechanisms and clinical application prospects of antimicrobial peptides. *Molecules* **2022**, *27*, 2675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Xuan, J.; Feng, W.; Wang, J.; Wang, R.; Zhang, B.; Bo, L.; Chen, Z.S.; Yang, H.; Sun, L. Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. *Drug Resist. Updat.* **2023**, *68*, 100954. [[CrossRef](#)]
19. Chen, C.; Shi, J.; Wang, D.; Kong, P.; Wang, Z.; Liu, Y. Antimicrobial peptides as promising antibiotic adjuvants to combat drug-resistant pathogens. *Crit. Rev. Microbiol.* **2024**, *50*, 267–284. [[CrossRef](#)]
20. Patocka, J.; Nepovimova, E.; Klimova, B.; Wu, Q.; Kuca, K. Antimicrobial peptides: Amphibian host defense peptides. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 5924–5946. [[CrossRef](#)]
21. Zhang, Q.-Y.; Yan, Z.-B.; Meng, Y.-M.; Hong, X.-Y.; Shao, G.; Ma, J.-J.; Cheng, X.-R.; Liu, J.; Kang, J.; Fu, C.-Y. Antimicrobial peptides: Mechanism of action, activity and clinical potential. *Mil. Med. Res.* **2023**, *10*, 48. [[CrossRef](#)]
22. Pantic, J.M.; Jovanovic, I.P.; Radosavljevic, G.D.; Arsenijevic, N.N.; Conlon, J.M.; Lukic, M.L. The potential of frog skin-derived peptides for development into therapeutically valuable immunomodulatory agents. *Molecules* **2017**, *22*, 2071. [[CrossRef](#)]
23. Oelkrug, C.; Hartke, M.; Schubert, A. Mode of action of anticancer peptides (ACPs) from amphibian origin. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 635–643.
24. Guimarães, A.B.; Costa, F.J.; Pires, O.R.; Fontes, W.; Castro, M.S. The amazing world of peptide engineering: The example of antimicrobial peptides from frogs and their analogues. *Protein Pept. Lett.* **2016**, *23*, 722–737. [[CrossRef](#)]
25. Libério, M.S.; Joanitti, G.A.; Azevedo, R.B.; Cilli, E.M.; Zanotta, L.C.; Nascimento, A.C.; Sousa, M.V.; Pires Júnior, O.R.; Fontes, W.; Castro, M.S. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. *Amino Acids* **2011**, *40*, 51–59. [[CrossRef](#)]
26. Conlon, J.M.; Mechkarska, M.; Abdel-Wahab, Y.H.; Flatt, P.R. Peptides from frog skin with potential for development into agents for Type 2 diabetes therapy. *Peptides* **2018**, *100*, 275–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. de Amaral, M.; Ienes-Lima, J. Anurans against SARS-CoV-2: A review of the potential antiviral action of anurans cutaneous peptides. *Virus Res.* **2022**, *315*, 198769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Carrillo, J.F.C.; Boaretto, A.G.; Santana, D.J.; Silva, D.B. Skin secretions of Leptodactylidae (Anura) and their potential applications. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2024**, *30*, e20230042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Conlon, J.M.; Mechkarska, M.; Pantic, J.M.; Lukic, M.L.; Coquet, L.; Leprince, J.; Nielsen, P.F.; Rinaldi, A.C. An immunomodulatory peptide related to frenatin 2 from skin secretions of the Tyrrhenian painted frog *Discoglossus sardus* (Alytidae). *Peptides* **2013**, *40*, 65–71. [[CrossRef](#)]
30. Scorciapino, M.A.; Manzo, G.; Rinaldi, A.C.; Sanna, R.; Casu, M.; Pantic, J.M.; Lukic, M.L.; Conlon, J.M. Conformational analysis of the frog skin peptide, plasticin-L1, and its effects on production of proinflammatory cytokines by macrophages. *Biochemistry* **2013**, *52*, 7231–7241. [[CrossRef](#)]
31. Attoub, S.; Mechkarska, M.; Sonnevend, A.; Radosavljevic, G.; Jovanovic, I.; Lukic, M.L.; Conlon, J.M. Esculentin-2ChA: A host-defense peptide with differential cytotoxicity against bacteria, erythrocytes and tumor cells. *Peptides* **2013**, *39*, 95–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. McLean, D.T.; McCrudden, M.T.; Linden, G.J.; Irwin, C.R.; Conlon, J.M.; Lundy, F.T. Antimicrobial and immunomodulatory properties of PGLa-AM1, CPF-AM1, and magainin-AM1: Potent activity against oral pathogens. *Regul. Pept.* **2014**, *194–195*, 63–68. [[CrossRef](#)]
33. Conlon, J.M.; Mechkarska, M.; Radosavljevic, G.; Attoub, S.; King, J.D.; Lukic, M.L.; McClean, S. A family of antimicrobial and immunomodulatory peptides related to the frenatins from skin secretions of the Orinoco lime frog *Sphaenorhynchus lacteus* (Hylidae). *Peptides* **2014**, *56*, 132–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mangoni, M.L.; McDermott, A.M.; Zasloff, M. Antimicrobial peptides and wound healing: Biological and therapeutic considerations. *Exp. Dermatol.* **2016**, *25*, 167–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wang, X.; Duan, H.; Li, M.; Xu, W.; Wei, L. Characterization and mechanism of action of amphibian-derived wound-healing-promoting peptides. *Front. Cell Dev. Biol.* **2023**, *11*, 1219427. [[CrossRef](#)]
36. Ma, L.; Xie, X.; Liu, H.; Huang, Y.; Wu, H.; Jiang, M.; Xu, P.; Ye, X.; Zhou, C. Potent antibacterial activity of MSI-1 derived from the magainin 2 peptide against drug-resistant bacteria. *Theranostics* **2020**, *10*, 1373–1390. [[CrossRef](#)]
37. Fan, X.L.; Yu, S.S.; Zhao, J.L.; Li, Y.; Zhan, D.J.; Xu, F.; Lin, Z.H.; Chen, J. Brevinin-2PN, an antimicrobial peptide identified from dark-spotted frog (*Pelophylax nigromaculatus*), exhibits wound-healing activity. *Dev. Comp. Immunol.* **2022**, *137*, 104519. [[CrossRef](#)]
38. D'Andrea, L.D.; Romanelli, A. Temporins: Multifunctional peptides from frog skin. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 5426. [[CrossRef](#)]
39. Han, Z.; Wang, Y.; Wang, W.; Cheng, M.; Yang, H.; Liu, Y. Design, synthesis and activity evaluation of reduction-responsive anticancer peptide temporin-1CEa drug conjugates. *Bioorg. Chem.* **2025**, *154*, 108103. [[CrossRef](#)]
40. Azevedo Calderon, L.; Silva, A.; Ciancaglini, P.; Stábéli, R. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: From biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. *Amino Acids* **2011**, *40*, 29–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Rollins-Smith, L.A.; Le Sage, E.H. Heat stress and amphibian immunity in a time of climate change. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2023**, *378*, 20220132. [[CrossRef](#)]
42. Becker, C.G.; Greenspan, S.E.; Martins, R.A.; Lyra, M.L.; Prist, P.; Metzger, J.P.; São Pedro, V.; Haddad, C.F.B.; Le Sage, E.H.; Woodhams, D.C.; et al. Habitat split as a driver of disease in amphibians. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **2023**, *98*, 727–746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Santana, C.J.C.; Magalhães, A.C.M.; Prías-Márquez, C.A.; Falico, D.A.; Dos Santos Júnior, A.C.M.; Lima, B.D.; Ricart, C.A.O.; de Pilger, D.R.B.; Bonotto, R.M.; Moraes, C.B.; et al. Biological properties of a novel multifunctional host defense peptide from the skin secretion of the Chaco tree frog, *Boana raniceps*. *Biomolecules* **2020**, *10*, 790. [[CrossRef](#)]
44. Barbosa, G.G.; Santana, C.J.C.; Silva, T.L.; Santana, B.C.G.; Paiva, P.M.G.; de Freitas, G.G.; Brand, G.D.; Júnior, O.R.P.; Castro, M.S.; Napoleão, T.H. A new temporin with antibacterial activity and cytotoxicity from the skin secretion of *Lithobates palmipes* (Spix, 1824) (Amphibia: Ranidae) from Brazilian Atlantic Forest. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2025**, *275*, 111041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Freitas, G.G.; Barbosa, J.M.; Santana, C.J.C.; Magalhães, A.C.M.; Macedo, K.W.R.; Souza, J.O.; Castro, J.S.; Vasconcelos, I.A.; Souza, A.A.; Freitas, S.M.; et al. Purification and biological properties of Raniseptins-3 and -6, two antimicrobial peptides from *Boana raniceps* (Cope, 1862) skin secretion. *Biomolecules* **2023**, *13*, 576. [[CrossRef](#)]
46. Santana, C.J.C.; Magalhães, A.C.M.; Dos Santos Júnior, A.C.M.; Ricart, C.A.O.; Lima, B.D.; Álvares, A.D.C.M.; Freitas, S.M.; Pires Júnior, O.R.; Fontes, W.; Castro, M.S. Figainin 1, a novel amphibian skin peptide with antimicrobial and antiproliferative properties. *Antibiotics* **2020**, *9*, 625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Triana-Vidal, L.E.; Castro, M.S.; Pires Júnior, O.R.; Álvares, A.C.M.; de Freitas, S.M.; Fontes, W.; Vargas, J.A.G.; Zúñiga-Baos, J.A.; Correia Batista, I.F.; Grellier, P.; et al. Dendropsophin 1, a novel antimicrobial peptide from the skin secretion of the endemic Colombian frog *Dendropsophus columbianus*. *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32*, 1383–1389. [[CrossRef](#)]

48. Aguilar, S.; Moreira, D.; Pereira Lourenço, A.L.; Wilke, N.; Crosio, M.A.; Vasconcelos, A.; Barbosa, E.A.; Bispo, E.C.I.; Saldanha-Araujo, F.; Ramada, M.H.S.; et al. Enhancing antimicrobial peptides from frog skin: A rational approach. *Biomolecules* **2025**, *15*, 449. [[CrossRef](#)]
49. Ageitos, L.; Boaro, A.; Cesaro, A.; Torres, M.D.T.; Broset, E.; de la Fuente-Nunez, C. Frog-derived synthetic peptides display anti-infective activity against Gram-negative pathogens. *Trends Biotechnol.* **2025**, S0167-7799(25)00044-7. [[CrossRef](#)]
50. Bhattacharjya, S.; Straus, S.K. Design, engineering and discovery of novel α -helical and β -boomerang antimicrobial peptides against drug resistant bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5773. [[CrossRef](#)]
51. Casciaro, B.; Cappiello, F.; Cacciafesta, M.; Mangoni, M.L. Promising approaches to optimize the biological properties of the antimicrobial peptide esculentin-1a(1-21)NH₂: Amino acids substitution and conjugation to nanoparticles. *Front. Chem.* **2017**, *5*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Li, J.; Xu, X.; Xu, C.; Zhou, W.; Zhang, K.; Yu, H.; Zhang, Y.; Zheng, Y.; Rees, H.H.; Lai, R.; et al. Anti-infection peptidomics of amphibian skin. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 882–894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ma, X.; Chen, Y.; Shu, A.; Jiang, Y.; Chen, X.; Ma, C.; Zhou, M.; Wang, T.; Chen, T.; Shaw, C.; et al. A novel antimicrobial peptide, Dermaseptin-SS1, with anti-proliferative activity, isolated from the skin secretion of *Phyllomedusa tarsius*. *Molecules* **2023**, *28*, 6558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Moretta, A.; Scieuzo, C.; Petrone, A.M.; Salvia, R.; Manniello, M.D.; Franco, A.; Lucchetti, D.; Vassallo, A.; Vogel, H.; Sgambato, A.; et al. Antimicrobial peptides: A new hope in biomedical and pharmaceutical fields. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 668632. [[CrossRef](#)]
55. Chen, N.; Jiang, C. Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *255*, 115377. [[CrossRef](#)]
56. Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238–250. [[CrossRef](#)]
57. Matsuzaki, K. Membrane permeabilization mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1117*, 9–16. [[CrossRef](#)]
58. Mahlapuu, M.; Håkansson, J.; Ringstad, L.; Björn, C. Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 194. [[CrossRef](#)]
59. Teixeira, V.; Feio, M.J.; Bastos, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.* **2012**, *51*, 149–177. [[CrossRef](#)]
60. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, *415*, 389–395. [[CrossRef](#)]
61. Giuliani, A.; Pirri, G.; Bozzi, A.; Di Giulio, A.; Aschi, M.; Rinaldi, A.C. Antimicrobial peptides: Natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cell Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2450–2460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Bartels, E.J.H.; Dekker, D.; Amiche, M. Dermaseptins, multifunctional antimicrobial peptides: A review of their pharmacology, effectivity, mechanism of action, and possible future directions. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1421. [[CrossRef](#)]
63. Zohrab, F.; Askarian, S.; Jalili, A.; Kazemi Oskuee, R. Biological properties, current applications and potential therapeutic applications of brevinin peptide superfamily. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2019**, *25*, 39–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Dubois, A. The nomenclatural status of *Hysaplesia*, *Hylaplesia*, *Dendrobates*, and related nomina (Amphibia, Anura), with general comments on zoological nomenclature and its governance, as well as on taxonomic databases and websites. *Bionomina* **2017**, *11*, 1–48. [[CrossRef](#)]
65. Faivovich, J.; Haddad, C.; Garcia, P.; Frost, D.; Campbell, J.; Wheeler, W.C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **2005**, *294*, 1–240. [[CrossRef](#)]
66. Haddad, C.F.B.; Toledo, L.F.; Prado, C.P.A.; Loebmann, D.; Gasparini, J.L.; Sazima, I. *Guia dos Anfíbios da Mata Atlântica: Diversidade e Biologia*; Editora Anolis Books: São Paulo, Brazil, 2013.
67. Dias, T.M.; Prado, C.P.A.; Bastos, R.P. Reproductive ecology and territorial behavior of *Boana goiana* (Anura: Hylidae), a gladiator frog from the Brazilian Cerrado. *Zoologia* **2021**, *38*, e53004. [[CrossRef](#)]
68. Prates, M.V.; Sforça, M.L.; Regis, W.C.; Leite, J.R.; Silva, L.P.; Pertinhez, T.A.; Araújo, A.L.; Azevedo, R.B.; Spisni, A.; Bloch, C., Jr. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13018–13026. [[CrossRef](#)]
69. Junior, E.F.C.; Guimarães, C.F.R.C.; Franco, L.L.; Alves, R.J.; Kato, K.C.; Martins, H.R.; de Souza Filho, J.D.; Bemquerer, M.P.; Munhoz, V.H.O.; Resende, J.M.; et al. Glycotriazole-peptides derived from the peptide HSP1: Synergistic effect of triazole and saccharide rings on the antifungal activity. *Amino Acids* **2017**, *49*, 1389–1400. [[CrossRef](#)]
70. Magalhães, B.S.; Melo, J.A.; Leite, J.R.; Silva, L.P.; Prates, M.V.; Vinecky, F.; Barbosa, E.A.; Verly, R.M.; Mehta, A.; Nicoli, J.R.; et al. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *377*, 1057–1061. [[CrossRef](#)]
71. Popov, C.S.F.C.; Magalhães, B.S.; Goodfellow, B.J.; Bocca, A.L.; Pereira, D.M.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Pereira, P.J.B.; Rodrigues, J.E.; de Holanda Veloso, P.H.; et al. Host-defense peptides AC12, DK16 and RC11 with immunomodulatory activity isolated from *Hypsiboas raniceps* skin secretion. *Peptides* **2019**, *113*, 11–21. [[CrossRef](#)]

72. Castro, M.S.; Ferreira, T.C.; Cilli, E.M.; Crusca, E., Jr.; Mendes-Giannini, M.J.; Sebben, A.; Ricart, C.A.; Sousa, M.V.; Fontes, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* (“spotted treefrog”). *Peptides* **2009**, *30*, 291–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Cao, J.; Zhang, Y.; Shan, Y.; Wang, J.; Liu, F.; Liu, H.; Xing, G.; Lei, J.; Zhou, J. A pH-dependent antibacterial peptide release nano-system blocks tumor growth in vivo without toxicity. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11242. [[CrossRef](#)]
74. Chianese, A.; Zannella, C.; Foglia, F.; Nastri, B.M.; Monti, A.; Doti, N.; Franci, G.; De Filippis, A.; Galdiero, M. Hylin-a1: A host defense peptide with antibacterial potential against *Staphylococcus aureus* multi-resistant strains. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Chianese, A.; Iovane, V.; Zannella, C.; Capasso, C.; Nastri, B.M.; Monti, A.; Doti, N.; Montagnaro, S.; Pagnini, U.; Iovane, G.; et al. Synthetic frog-derived-like peptides: A new weapon against emerging and potential zoonotic viruses. *Viruses* **2023**, *15*, 1804. [[CrossRef](#)]
76. Chianese, A.; Zannella, C.; Monti, A.; Doti, N.; Sanna, G.; Manzin, A.; De Filippis, A.; Galdiero, M. Hylin-a1: A pan-inhibitor against emerging and re-emerging respiratory viruses. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13888. [[CrossRef](#)]
77. Chianese, A.; Giugliano, R.; Palma, F.; Nastri, B.M.; Monti, A.; Doti, N.; Zannella, C.; Galdiero, M.; De Filippis, A. The antiherpetic and anti-inflammatory activity of the frog-derived peptide Hylin-a1. *J. Appl. Microbiol.* **2024**, *135*, Ixae165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Siano, A.; Húmpola, M.V.; de Oliveira, E.; Albericio, F.; Simonetta, A.C.; Lajmanovich, R.; Tonarelli, G.G. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 831–841. [[CrossRef](#)]
79. Nacif-Marçal, L.; Pereira, G.R.; Abranches, M.V.; Costa, N.C.; Cardoso, S.A.; Honda, E.R.; de Paula, S.O.; Feio, R.N.; Oliveira, L.L. Identification and characterization of an antimicrobial peptide of *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) (Amphibia, Hylidae). *Toxicon* **2015**, *99*, 16–22. [[CrossRef](#)]
80. Monteiro, J.M.C.; Oliveira, M.D.; Dias, R.S.; Nacif-Marçal, L.; Feio, R.N.; Ferreira, S.O.; Oliveira, L.L.; Silva, C.C.; Paula, S.O. The antimicrobial peptide HS-1 inhibits dengue virus infection. *Virology* **2018**, *514*, 79–87. [[CrossRef](#)]
81. Liscano, Y.; Medina, L.; Oñate-Garzón, J.; Gúzman, F.; Pickholz, M.; Delgado, J.P. In silico selection and evaluation of Pugnins with antibacterial and anticancer activity using skin transcriptome of Treefrog (*Boana pugnax*). *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 578. [[CrossRef](#)]
82. Nunes, L.O.; Munhoz, V.H.O.; Sousa, A.A.; de Souza, K.R.; Santos, T.L.; Bemquerer, M.P.; Ferreira, D.E.C.; de Magalhães, M.T.Q.; Resende, J.M.; Alcântara, A.F.C.; et al. High-resolution structural profile of hylaseptin-4: Aggregation, membrane topology and pH dependence of overall membrane binding process. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2021**, *1863*, 183581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Morán-Marcillo, G.; Sánchez Hinojosa, V.; de Los Monteros-Silva, N.E.; Blasco-Zúñiga, A.; Rivera, M.; Naranjo, R.E.; Almeida, J.R.; Wang, L.; Zhou, M.; Chen, T.; et al. Picturins and Pictuseptins, two novel antimicrobial peptide families from the skin secretions of the Chachi Treefrog, *Boana picturata*. *J. Proteom.* **2022**, *264*, 104633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Conlon, J.M.; Guilhaudis, L.; Attoub, S.; Coquet, L.; Leprince, J.; Jouenne, T.; Mechkarska, M. Purification, conformational analysis and cytotoxic activities of host-defense peptides from the Giant Gladiator Treefrog *Boana boans* (Hylidae: Hylinae). *Antibiotics* **2023**, *12*, 1102. [[CrossRef](#)]
85. Spinelli, R.; Humpola, M.V.; Sanchís, I.; Mendez, E.d.l.A.; Siano, A.S. Biological characterization of natural peptide BcI-1003 from *Boana cordobae* (anura): Role in Alzheimer’s disease and microbial infections. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2023**, *29*, 6. [[CrossRef](#)]
86. Conlon, J.M.; Sridhar, A.; Khan, D.; Cunnning, T.S.; Delaney, J.J.; Taggart, M.G.; Ternan, N.G.; Leprince, J.; Coquet, L.; Jouenne, T.; et al. Multifunctional host-defense peptides isolated from skin secretions of the banana tree dwelling frog *Boana platanera* (Hylidae: Hylinae). *Biochimie* **2024**, *223*, 23–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Conlon, J.M.; Mechkarska, M.; Lukic, M.L.; Flatt, P.R. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. *Peptides* **2014**, *57*, 67–77. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.