

Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas – IB

Departamento de Biologia Celular – CEL

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular - PPGBioMol

**Identificação, isolamento e caracterização de fosfolipases
A₂ oriundas da secreção cutânea de *Pithecopus azureus* e
Phyllomedusa tarsius.**

Beatriz Blenda Pinheiro de Souza

Orientador: Carlos Bloch Júnior

Brasília – DF

2019

Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Biologia Celular – CEL
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular - PPGBioMol

**Identificação, isolamento e caracterização de fosfolipases
A₂ oriundas da secreção cutânea de *Pithecopus azureus* e
Phyllomedusa tarsius.**

Beatriz Blenda Pinheiro de Souza

Orientador: Carlos Bloch Júnior

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia Molecular.

Brasília – DF

2019

Comissão Examinadora:

Carlos Bloch Júnior

(Presidente – Orientador)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Spartaco Astolfi Filho

(Membro Titular Externo)

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Elibio Leopoldo Rech Filho

(Membro Titular Externo)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Reuber Albuquerque Brandão

(Membro Titular Interno)

Universidade de Brasília - UnB

Marcelo Henrique Soller Ramada

(Membro Suplente)

Universidade Católica de Brasília - UCB

BRASÍLIA, DF

2019

Dedico esta tese àqueles que nesta mesma jornada esgotaram-se de todas as formas inimagináveis, colocando fim a sua dor e sofrimento da única forma (em suas perspectivas) que lhes era possível. Dedico a eles que ao contrário do que a sociedade pensa, foram corajosos e fortes quando executaram o ato mais incompreensível e repudiado por tal sociedade.

AGRADECIMENTOS

Parte I

Tenho muito e a muitos a agradecer. Tantos que, certamente, não haveria espaço suficiente (dentro dos limites a isso dedicado) para citá-los nesta tese. Aqui não há nenhum agradecimento a quem indiretamente contribuiu para esse trabalho, como é de praxe. Porque todos a quem agradeço exerceram influência direta neste meu caminho, quando de distintas formas, permitiram-me estudar, comer, beber, dormir, morar, chorar, rir, dentre outros aspectos inerentes à vida. Sem tudo isso, eu jamais teria chegado aqui.

E caso eu não tenha me expressado bem durante esse caminho (pelas minhas óbvias falhas sentimentais), vos envio estas palavras que, claro, estão longe de expressar a totalidade de minha gratidão.

MUITO OBRIGADA!

Parte II

Agradeço ao meu orientador Carlos Bloch Jr. por ter aceitado me conduzir nessa etapa da minha formação acadêmica/científica. Foram muitos os aprendizados científicos adquiridos e esta tese é só um pequeno reflexo deles. Obrigada, Bloch!

Agradeço à Maura que apesar de oficialmente não ser minha Coorientadora, dispôs-se a exercer muito além deste papel. Muito obrigada, Maú!

Parte III

Agradeço ao Dr. Guilherme Dotto Brand por abrir as portas do Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas – LSAB, Instituto de Química, Universidade de Brasília para realização dos experimentos de caracterização de glicanos.

Ao Dr. Elíbio Rech por possibilitar o uso de vários equipamentos e reagentes do Laboratório de Biologia Sintética – LSB, PBI, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sem os quais, muitos experimentos não teriam sido realizados.

Ao Dr. Alan Carvalho Andrade, Dr. Francisco José Lima Aragão e Dr. Bergmann Morais Ribeiro por fornecerem reagentes e suporte ao sequenciamento de cDNA.

Ao professor Dr. Spartaco Astolfi Filho, por fornecer alguns reagentes que contribuíram para a realização deste estudo.

Ao Dr. Daniel Nogoceke Sifuentes por ceder fosfolipases A₂ oriundas do veneno de *Bothrops moojeni*.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Recursos Genéticos e Biotecnologia por permitir o uso das instalações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela infraestrutura e manutenção de materiais.

Ao Instituto Serrapilheira por nos conceder a licença do software Bioluminate v3.2.

E por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo fomento da minha bolsa.

Parte IV

Um agradecimento especial à minha família (Mãe, Pai, meus quatro irmãos e minhas três sobrinhas) que me ensinou que nesta efêmera vida, NADA (principalmente uma Tese) é mais importante que manter vivo AQUILO que de fato nos salva de nós mesmos. Agradeço a vocês por, durante todo esse caminho em que me “obriguei” estar “distante”, terem continuado comigo, tornando-se o AQUILO que me salva dia após dia. Muito obrigada!

Sumário

Prefácio	9
Resumo	11
Abstract	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Anfíbios.....	18
2.2 Fosfolipases A ₂	21
2.3 Glicosilação.....	27
2.4 <i>Pithecopus azureus</i> (Cope, 1862)	30
2.5 <i>Phyllomedusa tarsius</i> (Cope, 1862).....	31
3. JUSTIFICATIVA	32
4. OBJETIVOS	34
5. METODOLOGIA	36
5.1 Captura dos animais	39
5.2 Extração da secreção cutânea.....	39
5.3 Fracionamento das fosfolipases A ₂	40
5.5 Teste de atividade fosfolipásica	41
5.5 Preparo da PLA ₂ de <i>Pithecopus azureus</i> para análise estrutural	41
5.6 Determinação das massas moleculares e sequenciamento <i>de novo</i> por espectrometria de massa	42
5.7 Extração de RNA e sequenciamento dos transcritos de <i>Pithecopus azureus</i> e <i>Phyllomedusa tarsius</i>	45
5.8 Imageamento por espectrometria de massa (MALDI- <i>imaging</i>) das fosfolipases A ₂ de <i>Phyllomedusa tarsius</i>	48
5.9 Múltiplo alinhamento das PLA ₂ s elucidadas de <i>Pithecopus azureus</i> e de <i>Phyllomedusa tarsius</i>	48
5.10 Modelagem molecular da Pa-PLA ₂	49
6. RESUSLTADOS	50

6.1 Resultados do estudo realizado com <i>Pithecopus azureus</i>	51
6.1.1 Fracionamento da secreção cutânea de <i>Pithecopus azureus</i>	51
6.1.2 Determinação da massa molecular	52
6.1.3 Teste de atividade fosfolipásica	56
6.1.4 Identificação e caracterização de N-glicanos da Pa-PLA ₂	58
6.1.5 Determinação da sequência aminoacídica da Pa-PLA ₂	61
6.1.6 Modelagem molecular da Pa-PLA ₂	73
6.2 Resultados do estudo realizado com <i>Phyllomedusa tarsius</i>	77
6.2.1 Fracionamento da secreção cutânea de <i>Phyllomedusa tarsius</i>	77
6.2.2 Teste de atividade fosfolipásica	78
6.2.3 Determinação da massa molecular	80
6.2.4 Identificação de N-glicanos da secreção cutânea de <i>P. tarsius</i>	83
6.2.5 Sequenciamento de cDNA	83
6.2.6 Determinação estrutural das Pht-PLA ₂ s detectadas na secreção cutânea...86	
6.2.7 Imageamento do tecido epitelial de <i>P. tarsius</i> (MALDI- <i>imaging</i>)	88
7. DISCUSSÃO	98
7.1 Fosfolipase A ₂ (Pa-PLA ₂) de <i>Pithecopus azureus</i>	99
7.2 Fosfolipases A ₂ de <i>Phyllomedusa tarsius</i>	101
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
REFERÊNCIAS	106
ANEXOS	115
Abreviações	116
Tabela de aminoácidos	118
Artigo.....	119

Prefácio

Quando criança, morando às margens do Lago Miriti no interior do Amazonas, era comum eu ter contato com anuros de diversas espécies, com as quais as crianças, tão familiarizadas, brincavam de várias formas. Hoje, com um olhar mais maduro, percebo que essas brincadeiras eram nada mais que perversidade. Uma perversidade estimulada por diversos mitos e lendas que fazem parte do imaginário popular desde tempos remotos, sobretudo, de populações que vivem em lugares distantes e carentes de informações, além das crenças tradicionais.

Uma das brincadeiras da qual me lembro, consistia em colocar um sapo sobre um lado de uma gangorra e do outro lado alguém subia e lançava-o o mais alto possível a fim de que quando caísse, sua queda fosse suficiente para “capar” (castrar) o animal, mas insuficiente para matá-lo. Ninguém nunca nos explicou (ou simplesmente eu não lembro) qual a necessidade de castrar os sapos, apenas fazíamos. Talvez porque quisessem diminuir a natalidade daqueles animais considerados, em diversos mitos, lendas e histórias como seres associados ao sórdido, sombrio e pecaminoso. Por exemplo, relatos bíblicos (que exercem muita influência na crença popular) apresentam as rãs como pragas que invadiram o Egito, poluindo a terra. Ou talvez por algum outro motivo que nem de longe era bom.

Certa vez, minha mãe flagrou-me capturando um sapo que passaria pelo ritual da castração. Vendo a agonia dele ao tentar fugir das minhas mãos, ela falou: “Quem judia de sapo e deixa ele doente também fica doente e sofre até o sapo morrer.” Esta fala, tal como os mitos, exerceu poder enorme sobre mim, principalmente quando coincidentemente naquela mesma semana fui acometida por alguma virose que em momento de muita febre me fez lembrar da fala da minha mãe e dos sapos de que judiei. Tamanho foi o meu terror, que pedi a Deus que tais sapos logo morressem ou que por um milagre fossem curados e prometi nunca mais fazer mal a eles, nem a qualquer outro animal.

Desde então, os sapos (anfíbios de modo geral) passaram a ocupar em minha mente um lugar especial de proteção, cuidado e completa admiração, tornando-se objetos de meus estudos nos últimos seis anos. Meu fascínio por eles aumenta a cada dia e espero com esta tese contribuir, não só dentro do campo científico, como também para a mudança de estereótipos e crenças acerca dos anfíbios, tal como a fala da minha mãe contribuiu para minha mudança.

Resumo

O presente trabalho relata a caracterização estrutural e funcional de fosfolipases A₂ (PLA₂s) presentes na secreção cutânea dos anuros *Pithecopus azureus* e *Phyllomedusa tarsius*. Em *P. azureus*, uma fosfolipase N-glicosilada, denominada Pa-PLA₂, foi isolada e sua estrutura primária madura completamente sequenciada. A Pa-PLA₂ é composta por 128 resíduos de aminoácidos, cuja estrutura apresenta sete ligações dissulfeto e dois sítios N-glicosilados (Asn 67 e Asn 108). As formas glicosilada e deglicosilada da Pa-PLA₂ foram avaliadas qualitativamente e mostraram-se funcionalmente catalíticas. O modelo molecular tridimensional da Pa-PLA₂ indica que os motivos de glicanos observados estão localizados longe do sítio ativo da enzima e, portanto, é possível que exerçam pouco ou nenhum papel significativo na interação direta do sítio catalítico da Pa-PLA₂ e seus substratos. Em *P. tarsius*, foram isoladas nove frações da secreção cutânea com atividade fosfolipásica e duas sequências aminoacídicas foram obtidas a partir do sequenciamento do cDNA desta espécie. Ambas as sequências, denominadas Pht-PLA₂-01 e Pht-PLA₂-02, contêm, respectivamente, 127 e 128 resíduos de aminoácidos e um sítio putativo de N-glicosilação (Asn 108). A massa molecular teórica da Pht-PLA₂-01 N-glicosilada com o motivo de glicano GlcNAc₂Man₃ foi encontrada em uma das nove frações onde foram detectadas atividade fosfolipásica. A distribuição da Pht-PLA₂-01 no tecido epitelial foi avaliada por imageamento do tecido pela técnica de MALDI-*imaging*, comprovando a real existência dessas moléculas no tecido de onde foram isoladas.

Palavras-chave: Fosfolipase A₂, Sequenciamento de aminoácidos e de cDNA, *Pithecopus azureus*, *Phyllomedusa tarsius*, N-glicosilação, Modelagem molecular, MALDI-*imaging*.

Abstract

This work reports the structural and functional characterization of phospholipases A₂ (PLA₂) found on the cutaneous secretion of the anurans *Pithecopus azureus* and *Phyllomedusa tarsius*. On *P. azureus*, an N-glycosylated phospholipase, named Pa-PLA₂, was isolated and had its mature primary structure completely sequenced. Pa-PLA₂ is composed of 128 amino acid residues and its structure contains seven disulfide bonds and two N-glycosylated sites (Asn 67 and Asn 108). The glycosylated and deglycosylated forms of Pa-PLA₂ were qualitatively evaluated and shown to be functionally catalytic. The three-dimensional molecular model of Pa-PLA₂ indicates that the observed glycan motifs are located far from the enzyme's active site and, therefore, may possibly exert little or no significant effect on the direct interaction between the PA-PLA₂'s active site and its substrates. On *P. tarsius*, nine fractions with phospholipase activity were isolated from the cutaneous secretion and two amino acid sequences were obtained from the cDNA sequencing of this species. Both sequences, named Pht-PLA₂-01 and Pht-PLA₂-02, contain, respectively, 127 and 128 amino acid residues and one putative N-glycosylation site (Asn 108). The theoretical molecular mass of the N-glycosylated Pht-PLA₂-01 with a GlcNAc₂Man₃ glycan motif was found on one of the nine fractions in which phospholipase activity was detected. The Pht-PLA₂-01 distribution on the epithelial tissue was evaluated by MALDI-*imaging*, proving the real existence of these molecules on the tissue from where they were isolated.

Key-words: Phospholipase A₂, Amino acid and cDNA sequencing, *Pithecopus azureus*, *Phyllomedusa tarsius*, N-Glycosylation, Molecular modeling, MALDI-*imaging*.

1. INTRODUÇÃO

A secreção cutânea dos anfíbios é um complexo de compostos fisiologicamente ativos cuja composição molecular está finamente ajustada conforme os eventos adaptativos da história natural de cada espécie. A compreensão das funções biológicas desse composto (secreção) deve considerar necessariamente a diversidade de suas partes, bem como suas distribuições proporcionais em tempo e condições determinados.

É notório o crescimento da quantidade de compostos caracterizados estruturalmente, especialmente aqueles de natureza proteica. Entretanto, o entendimento do real significado biológico de cada uma dessas moléculas atuando isoladamente ou sinergicamente no sistema glandular epitelial destes organismos ainda contém muitas lacunas, sobretudo porque muitos estudos debruçam-se na busca por moléculas promissoras para a formulação de novos fármacos de uso médico e veterinário, sem muito interesse na biologia do organismo de origem.

É nesta perspectiva de compreensão das funções biológicas, considerando os aspectos acima, que esta tese apresenta a descrição estrutural de três fosfolipases A_2 oriundas das secreções cutâneas das espécies *Pithecopus azureus* e *Phyllomedusa tarsius*. Esta descrição amplia naturalmente os limites dessa compreensão para estas espécies na medida em que apresenta, por exemplo, detalhes estruturais de uma modificação pós-traducional (glicosilação) nessas moléculas, cujo efeito formal pode ter implicações funcionais relevantes ao seu papel, sobretudo se consideradas as circunstâncias ambientais no órgão onde foram localizadas.

Para apresentar esses achados, esta tese está estruturada em revisão da literatura, metodologia, resultados e discussão. Os resultados e discussão estão expostos separadamente para cada espécie. No estudo com *P. azureus*, os resultados mostram a descrição detalhada da extração, purificação, sequenciamento e caracterização funcional de uma fosfolipase A_2 glicosilada, denominada Pa-PLA₂, proveniente da secreção cutânea. Já em *P. tarsius*, os resultados contemplam a descrição de duas fosfolipases A_2 (Pht-PLA₂-01 e Pht-PLA₂-02) oriundas do cDNA da espécie *Phyllomedusa tarsius*, bem como apresenta a detecção na secreção cutânea de nove frações cromatográficas com atividade fosfolipásica, dentre as quais foi identificada uma fosfolipase correspondente à Pht-PLA₂-01. Além disso, é demonstrado o mapeamento por imagem das fosfolipases presentes no tecido epitelial desta espécie.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANFÍBIOS

Há 400 milhões de anos, no período Devoniano, o planeta Terra experimentava um período de secas sazonais¹. Duas principais teorias narram os possíveis eventos ocorridos que culminaram no surgimento dos primeiros vertebrados terrestres.

Uma teoria sugere que poços rasos esvaziavam-se durante a seca e, em pequenos corpos d'água, peixes (*Sarcopterygii*) ali aprisionados dependiam de um breve início da temporada de chuva para garantir sua sobrevivência. Na ausência de chuva e antes que a seca se completasse, estes peixes teriam passado a se rastejar sobre a terra, saindo dos poços secos ao encontro de locais com água. Milhões de anos de seleção sobre estes indivíduos deram origem a uma nova linhagem com capacidade aumentada de sobreviver às secas e de se rastejar pela terra respirando ar atmosférico. Uma outra teoria propõe que o contraste entre ambiente aquático e terrestre no período Devoniano teria sido o ponto de partida para a exploração do ambiente terrestre pelos peixes. O ambiente aquático estava habitado por diversos peixes competindo entre si por espaço e alimento, além da elevada diversidade de predadores ativos e poderosos, como invertebrados e vertebrados aquáticos maiores. Já o ambiente terrestre era rico em nutritivos artrópodes, livre de predadores e de competidores, ofertando oportunidades evolutivas vagas, disponíveis para a ocupação por vertebrados¹.

Apesar das teorias divergentes, é consenso que habitar fora d'água requeria destes animais uma série de mudanças anatômicas e fisiológicas, levando ao desenvolvimento e/ou adaptação de um sistema respiratório baseado em pulmões, de uma epiderme adaptada para suportar a exposição ao ar e de estruturas musculares e esqueléticas eficientes para a sustentação do corpo frente à força gravitacional no ambiente terrestre¹⁻⁴. Tais modificações, ao curso de mais de 200 milhões de anos (final do Devoniano), levaram ao surgimento dos primeiros vertebrados tetrápodes terrestres anamniotas e amniotas. Entre estes, os organismos das linhagens de *Lissamphibia* (anuros, caudatas e ápodas) são os únicos anamniotas sobreviventes¹.

Embora estas linhagens apresentem distintas formas corporais entre si, os anfíbios atuais compartilham vários caracteres derivados⁴. Diversas características particulares na morfologia, na fisiologia e no comportamento derivam da capacidade

destes animais em habitar distintos ambientes, fornecendo várias formas de proteção contra potenciais predadores^{2,3}. O tegumento permeável e úmido é um destes caracteres derivados fundamental para diversos processos fisiológico³.

2.1.1 Tegumento

Com pulmões rudimentares e diante da necessidade de realização de trocas gasosas, os anfíbios se serviram da pele como órgão respiratório auxiliar por meio de uma série de adaptações morfológicas que inclui ausência de escamas externas, alta vascularização, grande permeabilidade e produção de muco para umidificação do tecido^{1,2,4}. Tais adaptações fizeram da pele dos anfíbios um órgão especializado para o desenvolvimento de diversas funções fisiológicas como transporte de água e solutos, regulação osmótica e da temperatura corporal, bem como para a defesa contra predadores e micro-organismos^{2,5}.

O desenvolvimento de glândulas mucosas foi um dos caracteres fundamentais na pele para a realização desses processos fisiológicos^{3,5}. Estas glândulas são multicelulares e alveolares e se encontram espalhadas por todo o corpo secretando continuamente e espontaneamente compostos mucopolissacarídeos, mantendo a pele úmida e permeável à água e a gases, além de permitir aos anfíbios utilizar o resfriamento por evaporação para regular a temperatura corpórea^{1,2,4,6}.

Por outro lado, características como alta permeabilidade e a necessidade de manutenção da umidade cutânea tornam os anfíbios particularmente sensíveis e vulneráveis a perturbações ambientais, a lesões cutâneas e à colonização por micro-organismos. No cenário evolutivo, esta pressão seletiva culminou no desenvolvimento de um sistema de glândulas granulares prontas a secretar um arsenal de compostos tóxicos que intimidam e afugentam potenciais predadores e os protegem contra uma grande diversidade de micro-organismos⁷.

As glândulas granulares de anfíbios estão localizadas por toda superfície da pele e/ou nas glândulas paratoides presentes na porção dorso-lateral da cabeça². Especificamente, essas glândulas estão localizadas na derme, recobertas por tecido mioepitelial e abrem-se para o meio externo por meio de ductos epidérmiais. São compostas por tecido sincicial, em cuja região periférica se localizam os núcleos

celulares e as macro-organelas. No citoplasma encontram-se vesículas secretoras contendo moléculas em forma de grânulos. A depender da espécie, esses grânulos podem tomar formas arredondas ou uniformes que se agrupam em estruturas maiores, sendo mais comuns as estruturas em formato elipsoide^{6,8} (Figura 1).

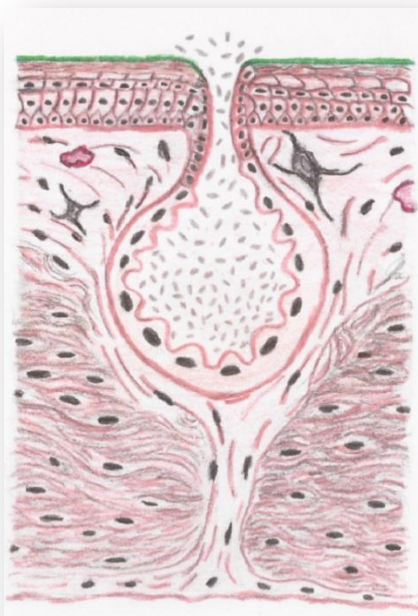


Figura 1 - Representação esquemática de glândula granular de anuros composta por tecido sincicial. No citoplasma, vesículas secretoras contendo moléculas em forma de grânulos que são expelidas para o meio externo por meio de ductos epidermais. Ilustração: Aline Melro Murad, 2019.

Os compostos dessas glândulas, bem como toxinas de outros animais, são considerados produtos de coevolução, estando, portanto, sob constante pressão seletiva para atingirem seus alvos, sejam eles patógenos ou predadores⁷. Nesse cenário, é esperado que moléculas mais complexas e com distintas funções para defesa e ataque tenham surgido e surjam ao longo da evolução destes animais. Dentre os tipos de moléculas encontradas em secreção de anfíbios, os peptídeos e proteínas^{3,9-15} têm recebido considerável atenção devido às suas atividades biológicas e similaridades com proteínas encontradas em mamíferos e répteis.

2.2 FOSFOLIPASES A₂

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) são proteínas pertencentes à superfamília (E.C. 3.1.1.4) de enzimas que catalisam a hidrólise de ácidos graxos na posição *sn*-2 de fosfolipídeos¹⁶ (Figura 2). Sua atividade enzimática foi uma das primeiras a ser descrita, tendo suas ações líticas identificadas no final do século XIX em venenos de cobras (Elapidae) e posteriormente em venenos de cascavéis (Viperidae)^{16,17}. Na década de 1970 foi evidenciado que as PLA₂s apresentam grandes quantidades de resíduos de cisteína (mais de 10% dos aminoácidos) unidos por ligações dissulfeto¹⁸. Descobriu-se também que havia seis ligações dissulfeto em comum entre PLA₂s de cobras e cascavéis e uma em um local distinto (Cys 11 – Cys 71), o que levou à classificação de PLA₂ do tipo I para cobras (serpentes do velho mundo) e tipo II para cascavéis (serpentes do novo mundo)¹⁹.

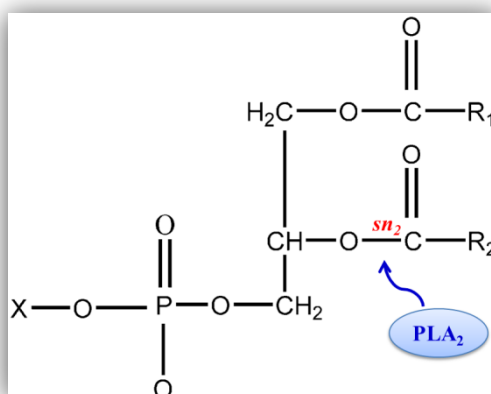


Figura 2 - Fosfolipídeo hidrolisado por uma fosfolipase A₂ na posição *sn*-2. Como resultado da hidrólise, são liberados ácido graxo e lisofosfolipídeo. Fonte: Beatriz Souza, 2019.

Contemporâneo a esta descoberta, um estudo com uma PLA₂ pancreática de suíno determinou que esta enzima de mamífero, assim como a enzima pancreática humana, apresentava o mesmo padrão de ligação dissulfeto das PLA₂s de cobras, sendo, portanto, classificadas como tipo IB, enquanto as de cobra foram classificadas como IA¹⁷. Mais tarde, em 1989, foi relatada a descoberta, purificação, sequenciamento e clonagem da primeira PLA₂ secretada não-pancreática humana, isolada do líquido sinovial das articulações de joelho^{20,21}. Nesta PLA₂, foi observado que o padrão de ligação dissulfeto era mais semelhante com o de PLA₂ de cascavel do que com PLA₂

pancreática humana, sendo então classificada como tipo IIA. Todas estas enzimas foram denominadas fosfolipases A₂ secretadas (sPLA₂s).

Em 1991, uma PLA₂ encontrada em células de macrófagos de humanos foi purificada e sequenciada. Por não ter em sua sequência nenhuma relação com PLA₂s secretadas, foi denominada fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂)^{22,23}. Desde então, um sistema de numeração por grupo foi estabelecido a partir da classificação pré-existente Tipo I e II, e expandido para subgrupos (GIA, GIB, GIIA). Neste sistema, uma PLA₂ purificada do veneno de abelha e com características estruturais muito diferentes, foi classificada no grupo III (GIII) enquanto a citosólica no GIV²⁴. Em seguida, uma fosfolipase que apresentava as seis ligações dissulfeto em comum com o GI e GII, mas que não tinha a sétima ligação, foi designada como GV²⁴. Outra PLA₂ citosólica purificada de macrófagos foi identificada, contudo era diferente da cPLA₂ do GIV, pois sua atividade era independente de cálcio (iPLA₂), o que levou a ser classificada como GVI²⁵. No mesmo período, foram descobertas enzimas que hidrolisavam o fator de ativação das plaquetas (PAF-AH) do plasma humano (GVII)^{26,27} e posteriormente outras PAF-acetil hidrolases com especificidade para cadeias de acil curtas na posição *sn*-2 e para lipídeos oxidados do plasma, as quais foram denominadas lipoproteínas associadas a fosfolipase A₂ (Lp-PLA₂) e classificadas como GVIII²⁸.

Conforme novas fosfolipases foram descobertas, foram agrupadas por letras como subgrupos dos grupos descritos acima e por números como representantes de novos grupos. Uma série de novas formas de PLA₂s secretadas foram descobertas e agrupadas em grupos adicionais (GIX, GX, GXI, GXII, GXIII e GXIV) devido às sequências e/ou padrão de ligações dissulfeto variarem significativamente. Além dessas, dois novos tipos de PLA₂s foram descritas, a PLA₂ lisossomal (LPLA₂) e a PLA₂ isolada do tecido adiposo (Ad-PLA₂), ambas designadas como GXV e GXVI (Tabela 1)

Tabela 1 – Superfamília Fosfolipase A₂ (E.C. 3.1.1.4)

Tipo	Grupo	Subgrupo	Massa molecular (kDa)	Resíduos catalíticos
sPLA ₂	GI	A, B	13-15	H/D
	GII	A, B, C, D, E, F	13-17	
	GIII		15-18	
	GV		14	
	GIX		14	
	GX		14	
	GXI	A, B	12-13	
	GXII	A, B	19	
	GXIII		<10	
	GXIV		13-19	
cPLA ₂	GIV	A (α), B (β), C (γ), D (δ), E (ϵ), F (ζ)	60-114	S/D
iPLA ₂	GVI	A (β), B (γ), C (δ), D (ϵ), E (ζ), F (η)	84-90	S/D
PAF-AH	GVII	A (Lp-PLA ₂), B (PAF-AH II)	40-45	S/H/D
	GVIII	A (α 1), B (α 2), β	26-40	
LPLA ₂	GXV		45	S/H/D
AdPLA	GXVI		18	H/C

Tabela adaptada¹⁶.

2.2.1 Fosfolipase A₂ secretada

As PLA₂s secretadas (sPLA₂) são enzimas relativamente pequenas cujo tamanho varia de 14 a 18 kDa e normalmente são estabilizadas por 6 a 8 ligações dissulfeto¹⁶. São armazenadas em grânulos citoplasmáticos prontas para serem secretadas para o meio extracelular conforme estimulação²⁹. São cálcio-dependentes para a atividade catalítica e apresentam no sítio catalítico a díade Histidina/Ácido Aspártico altamente conservada entre as sequências¹⁶.

Atualmente são conhecidos 17 grupos de sPLA₂s que foram descobertas em mamíferos, plantas, insetos, répteis, bactérias, fungos, vírus e camundongos (Tabela 2).

Tabela 2 – Todos os grupos e subgrupos de fosfolipases sPLA₂ descritos atualmente.

Grupo	Fonte	Massa molecular (kDa)	Ligações dissulfeto
IA	Elapídeos.	13-15	7
IB	Pâncreas de humano e porco.	13-15	7
IIA	Cascavéis; líquido sinovial humano.	13-15	7
IIB	Víbora do Gabão.	13-15	6
IIC	Testículos de rato e murino.	15	8
IID	Pâncreas e baço de humano e murino.	14-15	7
IIE	Cérebro, coração e útero de humano e murino.	14-15	7
IIF	Testículo e embrião de humano e murino.	16-17	6
III	Lagarto e abelha.	15-18	8
	Humano e murino.	55	8
V	Coração, pulmão e macrófago de humano/murino.	14	6
IX	Veneno de caracol marinho (conodipina-M).	14	6
X	Baço, leucócito e timo de humano.	14	8
XIA	Tiras de arroz verde (PLA ₂ -I).	12.4	6
XIB	Tiras de arroz verde (PLA ₂ -II).	12.9	6
XIIA	Humano e murino.	19	7
XIIB	Humano e murino.	19	7
XIII	Parvovírus.	<10	0
XIV	Bactérias e fungos simbióticos.	13-19	2

Tabela adaptada^{16,30}.

Embora as sequências aminoacídicas entre todas as formas de sPLA₂s apresentem baixa identidade, estas enzimas contêm elementos estruturais altamente conservados que incluem três α -hélices, um *loop* de ligação ao cálcio – XCGXGG – (Onde X é um aminoácido qualquer), duas folhas β -pregueadas antiparalelas e a região C-terminal^{16,31,32}. Estas características estruturais exclusivas de sPLA₂s foram inicialmente obtidas a partir de amplos estudos com sPLA₂ (GI) oriundas de cobras, sendo, portanto, um importante modelo para a enzimologia de fosfolipases¹⁶. No entanto, algumas diferenças estruturais merecem destaques entre as sPLA₂s, como a

sPLA₂ (GXIB) de *Oryza sativa* que não possui folhas β-pregueadas (β-wing)³³ e sPLA₂ (GXIV) de *Streptomyces violaceoruber*, cuja estrutura é totalmente α-helicoidal³⁴.

A estrutura terciária básica de sPLA₂s é determinada, em grande parte, pelas ligações dissulfeto formadas por resíduos de cisteína conservados. As duas α-hélices paralelas são relativamente longas e juntas compõem o canal hidrofóbico, cujos resíduos fornecem acesso direto ao substrato, partindo da superfície do agregado fosfolipídico até o sítio catalítico (DXCCXXHD)^{16,31,32}.

Sua atividade é dependente de um íon de Ca²⁺ que é coordenado por duas moléculas de água. O mecanismo proposto para a atividade de sPLA₂³⁵ estabelece que o próton na posição 3 do anel imidazólico do resíduo de His 48 interage fortemente com o grupamento carboxila do resíduo de Asp 99. Esta interação impede qualquer rotação do anel imidazólico e o mantém em posição espacial apropriada para interação com uma molécula de água. O íon de Ca²⁺ estabiliza as moléculas envolvidas no processo catalítico ao coordenar-se à carboxila da cadeia lateral do resíduo de Asp 49, aos oxigênios dos grupos carboxilas dos resíduos de Tyr 28, Gly 30, Gly 32 e às duas moléculas de água. Uma destas moléculas de água é deslocada pelo fosfolipídeo, formando o complexo enzima-substrato, permitindo ao Ca²⁺, por meio de interações eletrostáticas, polarizar a carbonila na posição *sn*-2 do fosfolipídeo. Uma vez polarizado, o fosfolipídeo sofre um ataque nucleofílico por uma molécula de água e um próton é transferido para o nitrogênio do anel imidazólico do resíduo de His 48. Este próton é em seguida doado para o oxigênio que ficou livre após hidrólise da ligação acil-éster na posição *sn*-2, formando o grupo álcool do ácido lisofosfatídico liberado juntamente com o ácido graxo (Figura 3).

Como consequência da atividade catalítica, sPLA₂s exibem uma grande diversidade de funções biológicas, embora a função específica varie de grupo ou subgrupo. Elas atuam primariamente na manutenção dos fosfolipídeos celulares, liberando ácido araquidônico (AA) que pode ser convertido em distintas moléculas sinalizadoras (eicosanoides), incluindo prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos que atuam como segundos mensageiros³⁶.

A ação catalítica das sPLA₂s libera também precursores do fator de ativação plaquetária (PAF), que em conjunto com o AA geram grande parte das reações

inflamatórias³⁶. As sPLA₂s também exercem atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas³⁷⁻³⁹ e atividade antiviral⁴⁰⁻⁴².

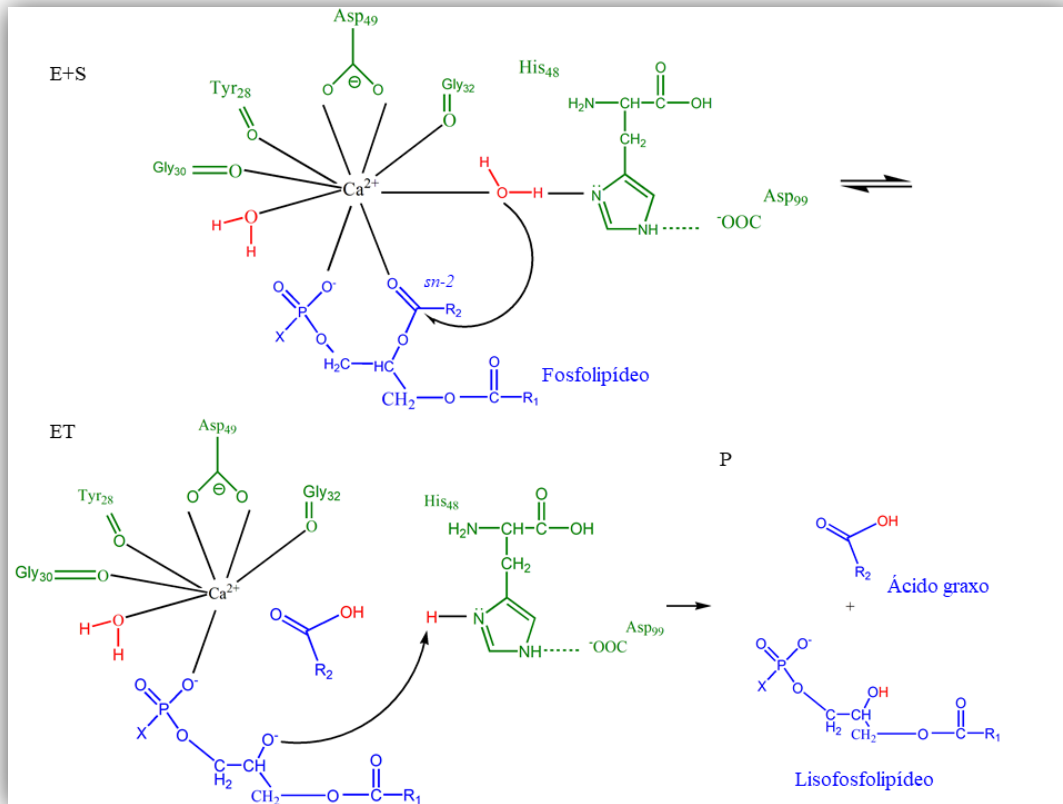


Figura 3 - Mecanismo de atividade catalítica de sPLA₂³⁵. E+S: Enzima + substrato; ET: Estado de Transição; P: Produtos; Verde: Resíduos de aminoácidos da sPLA₂; Azul: Substrato fosfolípídico; Vermelho: Moléculas de água. R₁ e R₂: Cadeias alifáticas quaisquer. Fonte: Adaptada e modificada⁴³.

Além disso, as sPLA₂s exercem muitas funções biológicas que parecem ser independentes de sua atividade catalítica como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, agregação plaquetária, atividade anticoagulante, convulsiva, hipotensiva, dentre outras^{16,44}. Seu papel é também reconhecidamente importante na tumorigênese, uma vez que sPLA₂s são superexpressas em diversos tipos de câncer⁴⁵⁻⁴⁸. Em câncer de próstata humano, por exemplo, são encontrados níveis elevados de sPLA₂ que estão correlacionados com os diferentes estágios do tumor⁴⁵. Em um modelo utilizando camundongos, no entanto, foi encontrada uma atividade protetora de sPLA₂

do GIIA no câncer colorretal⁴⁹, tornando controversa a discussão sobre a função destas enzimas na biologia do câncer, haja vista que não está claro se atuam como supressoras ou promotoras de tumor⁵⁰.

De modo geral, são enzimas amplamente estudadas dado seu envolvimento em doenças inflamatórias e em envenenamento por serpentes^{19,51} e abelhas⁵². São largamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em diversos fluidos biológicos, em células, plantas, bactérias, tecidos de mamíferos (fígado, baço, coração, pulmão), plaquetas, eritrócitos e leucócitos¹⁶. No entanto, apesar da vasta distribuição de sPLA₂ em diversos organismos, existem apenas dois registros de atividade fosfolipásica em secreção cutânea de anfíbios^{53,54}. Esta tese apresenta pela primeira vez, além da detecção, a purificação e caracterização estrutural e funcional de sPLA₂s na secreção cutânea de anfíbios.

Como é comum em anfíbios, muitas moléculas da secreção cutânea, depois de sintetizadas, sofrem diversas modificações pós-traducionais que podem causar mudanças nas propriedades físico-químicas, alterando a solubilidade, estabilidade, interações com receptores ou com outras proteínas, a localização subcelular, assim como a rede de transdução de sinal^{3,55,56}. Dentre estas modificações, a glicosilação recebe considerável destaque já que é encontrada em todos os domínios da vida com papéis biológicos cruciais, como nas interações com o ambiente extracelular, no dobramento das proteínas, na regulação das funções citosólicas e nucleares, nas reações inflamatórias, nas interações com macromoléculas e patógenos, bem como na modulação da função e sinalização de proteínas⁵⁷.

2.3 GLICOSILAÇÃO

A glicosilação é uma modificação pós-traducional comumente encontrada em proteínas com distintos papéis fisiológicos. É uma modificação resultante de um processo enzimático complexo e diverso que pode ligar os glicanos a estruturas de polipeptídeos de três diferentes formas: por meio de ligações amida a cadeias laterais de resíduos de Asparagina (N-glicosilação); por ligações glicosídicas a cadeias laterais de Serina/Treonina (O-glicosilação); e por ligações C-C na posição C₂ de Triptofano (C-manosilação)⁵⁸.

A N-glicosilação é o tipo de glicosilação mais encontrada e estudada em eucariotos. Em humanos, por exemplo, estima-se que metade das proteínas são glicoproteínas, sendo a maioria N-glicosilada e montadas a partir de dez tipos de monossacarídeos: Fucose (Fuc), Galactose (Gal), Glicose (Glc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglicosamina (GlcNAc), Ácido glicurônico (GlcA), Ácido idurônico (IdoA), Manose (Man), Ácido Siálico (SA) e Xilose (Xyl)^{57,59}.

Os N-glicanos são biossintetizados inicialmente na face citosólica da membrana do retículo endoplasmático (RE) em uma molécula de dolicol-fosfato. Uma molécula de N-acetilglicosamina-fosfato então é adicionada ao dolicol-fosfato que posteriormente é acrescido de uma N-acetilglicosamina e cinco moléculas de manose, originando o oligossacarídeo ligado ao lipídeo (LLO). Posteriormente uma flipase transfere o LLO para o lúmen do RE, onde são adicionadas mais quatro moléculas de manose por ação de enzimas específicas. Em seguida, três moléculas de glicose são adicionadas ao LLO via ação de oligossacariltransferases (OST), dando origem ao precursor maduro de N-glicanos (GlcNAc₂Man₉Glc₃) que é transferido para estruturas proteicas nascentes na sequência consenso Asn-X-Ser/Thr (X pode ser qualquer resíduo de aminoácido, exceto Prolina).

Ainda no RE, ocorre a remoção das três moléculas de glicose (por alfa-glicosidases I e II) e de uma molécula de manose (alfa-manosidase I). Após este processamento, a proteína N-ligada é transferida para o complexo de Golgi, onde outras moléculas de manose serão removidas e outros monossacarídeos adicionados em diferentes processamentos de cortes e extensões a partir do núcleo comum a todo N-glicano. De modo geral, os N-glicanos são classificados em: glicanos ricos em manose, híbridos e complexos (Figura 4)⁶⁰⁻⁶².

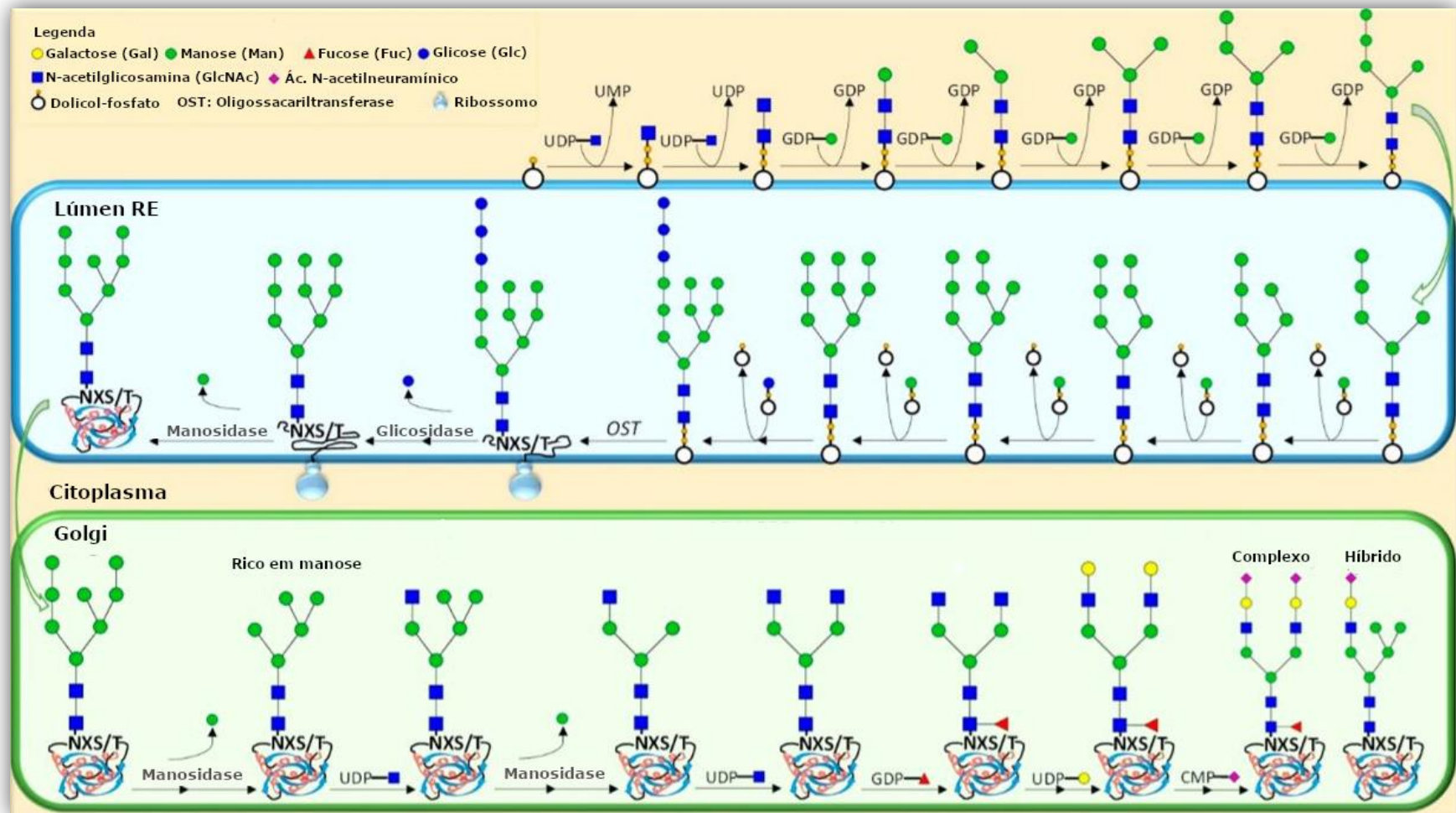


Figura 4 - Biossíntese de N-glicanos. Fonte: Modificada e adaptada⁶².

2.4 *Pithecopus azureus* (COPE, 1862)

Pithecopus azureus (COPE, 1862) é um anuro da família Phyllomedusidae originalmente descrito como *Phyllomedusa azurea* e posteriormente transferido para o gênero *Pithecopus* Cope 1866⁶³. É uma espécie arborícola amplamente distribuída na América do Sul, ocorrendo em formações abertas e em florestas tropicais secas. Pode ser encontrada no leste da Bolívia, no norte da Argentina, no Paraguai e no Brasil. Neste último, a espécie é registrada no Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Minas Gerais, Distrito Federal, Goiás, São Paulo e norte de Rondônia⁶⁴⁻⁶⁸.

É uma espécie de hábito noturno que se reproduz durante o período chuvoso. O casal constroe ninho dobrando folhas de plantas herbáceas ou não, próximas a lagos e depositam cerca de 100 ovos^{64,68}. Medem entre 37 e 40 mm, apresentam coloração verde no dorso, barriga esbranquiçada e uma faixa verde ao longo da superfície dorsal das coxas. Apresentam também uma faixa branca no lábio superior e coloração alaranjada com faixas transversais pretas na região anterior e posterior das coxas, tíbias e tarsos (Figura 5)⁶⁵.



Figura 5 - *Pithecopus azureus*. Ilustração: Aline Melro Murad, 2019.

2.5 *Phyllomedusa tarsius* (COPE, 1868)

Phyllomedusa tarsius (COPE, 1868) também pertencente à família Phyllomedusidae, é uma perereca arborícola que ocorre em toda a Bacia Amazônica do Brasil, Peru, Equador e Colômbia. Em Manaus, *P. tarsius* é encontrada em árvores e poças longe de igarapés na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD) e na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas – UFAM^{63,69}.

É uma espécie de hábitos noturnos que se reproduz durante todo o ano em poças semipermanentes ou permanentes, com picos durante o período de maior precipitação chuvosa. Cerca de 200 a 500 ovos são depositados pela fêmea em forma de massa gelatinosa em folhas dobradas com auxílio do macho. Os girinos eclodem 8 a 10 dias após a deposição, quando então caem na água onde completam seu desenvolvimento até a metamorfose^{63,69}.

Os machos medem entre 68 e 89 mm e as fêmeas entre 88 e 106 mm. Ambos apresentam dorso com textura granulosa e coloração verde uniforme. Os primeiros dedos das mãos são marrom-transparentes com a ponta branca e os demais são verdes com a ponta marrom-acinzentada. Já o ventre apresenta duas colorações, uma branca na parte anterior e uma marrom-alaranjada na parte posterior. A íris é vermelho-alaranjada, coberta por uma malha reticular negra. (Figura 6)^{63,69}.



Figura 6 - *Phyllomedusa tarsius*. Ilustração: Aline Melro Murad, 2019.

3. JUSTIFICATIVA

Fosfolipases A_2 são enzimas que participam de uma variedade de processos fisiológicos, atuando como componentes chaves no metabolismo de fosfolipídeos, principais componentes de membranas celulares. São expressas em diferentes tecidos de muitos organismos, onde exercem diversas funções, sejam por decorrência da atividade catalítica ou não¹⁶. As PLA_2 s são moléculas extensivamente estudadas, especialmente aquelas encontradas em venenos de serpentes e insetos, dado seu interesse médico decorrente do envenenamento.

Apesar dos muitos estudos, são poucos os registros de fosfolipases em secreções cutâneas de anfíbios, os quais se restringem apenas à detecção de atividade fosfolipásica na secreção^{53,54} e às sequências preditas do genoma das espécies *Xenopus tropicalis*⁷⁰ e *Xenopus laevis*⁷¹. Estes estudos, no entanto, não fornecem evidências experimentais sobre a estrutura-função destas moléculas dentro de um sistema glandular misto do tecido epitelial.

Entender o mecanismo que explica a presença de fosfolipases A_2 no tecido epitelial de anfíbios sem que essas moléculas causem os danos inerentes à sua atividade é, sem dúvida, um passo importante para a compreensão da enzimologia de PLA_2 s em outros vertebrados, sobretudo, naqueles onde estas moléculas atuam deflagrando reações prejudiciais à saúde.

Assim, este trabalho contribui para a aquisição de novos e importantes dados para futuras investigações sobre a presença e as semelhanças estruturais e funcionais envolvendo estas enzimas secretadas pela pele de anfíbios e outras fosfolipases A_2 , especialmente àquelas de vertebrados.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

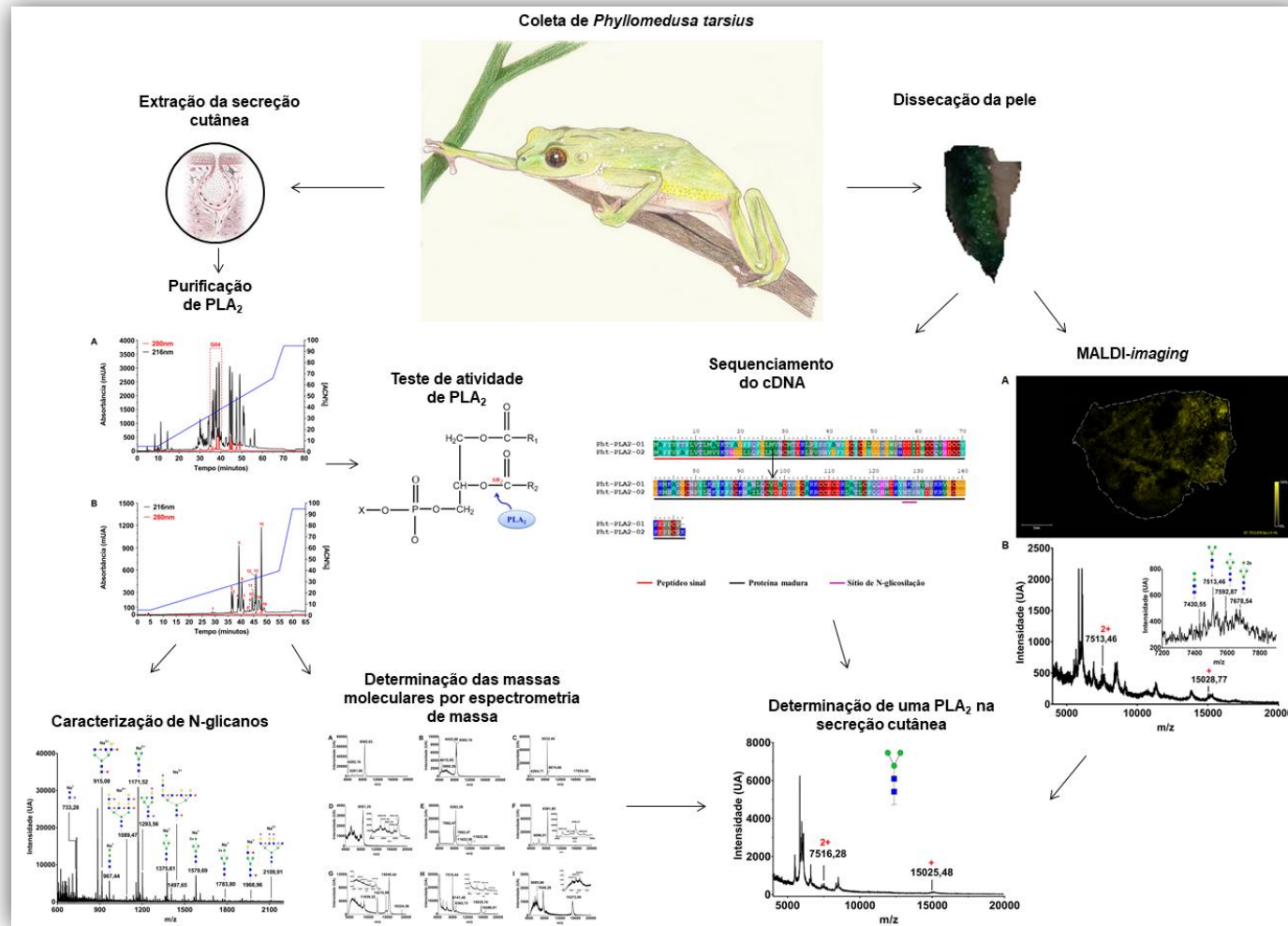
Purificar e caracterizar estruturalmente fosfolipases A₂ secretadas presentes na secreção cutânea dos anuros *Pithecopus azureus* e *Phyllomedusa tarsius*.

4.2 Específicos

- i)* Isolar e purificar fosfolipases A₂ da secreção cutânea de *P. azureus* e *P. tarsius*.
- ii)* Determinar, por espectrometria de massa e por sequenciamento de cDNA, as sequências aminoacídicas das fosfolipases A₂ de ambas as espécies.
- iii)* Identificar as fosfolipases *in situ* por imageamento do tecido epitelial.

5. METODOLOGIA

Diagrama dos experimentos realizados com a espécie *Phyllomedusa tarsius*



5.1 CAPTURA DOS ANIMAIS

5.1.1 Coleta de espécimes de *Pithecopus azureus*

Os espécimes adultos de *Pithecopus azureus* foram capturados manualmente em uma propriedade particular em Mimoso – Goiás, mantidos em recipientes térmicos e transportados ao Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, para a extração da secreção cutânea.

5.1.2 Coleta de espécimes de *Phyllomedusa tarsius*

Os espécimes adultos de *Phyllomedusa tarsius* foram capturados manualmente na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, mantidos em recipientes térmicos e transportados até o alojamento da fazenda, onde foi realizada a extração da secreção cutânea.

Ambas as espécies foram coletadas sob autorização legal da Comissão de Ética no Uso Animal da Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia (Nº 013/2015) e do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Nº 63740-1).

5.2 EXTRAÇÃO DA SECREÇÃO CUTÂNEA

A extração da secreção cutânea foi realizada por estimulação elétrica com pulsos de 6V durante 30 segundos na região dorsal de cada espécime. Uma vez obtida, a secreção foi imediatamente filtrada (filtro millipore 0,22 µm), congelada com nitrogênio líquido e liofilizada. Após recuperação, os espécimes de *P. tarsius* foram liberados no habitat onde foram coletados, dois espécimes de *P. hypochondrialis* foram tombados na coleção herpetológica do Laboratório de Anatomia Comparativa dos Vertebrados da Universidade de Brasília, cujos códigos de acesso são AS3051 e AS3052 e os demais foram eutanasiados (subitem 5.7.1).

5.3 Fracionamento das fosfolipases A₂

Alíquotas de 2 mg do extrato bruto liofilizado de ambas as espécies foram solubilizadas em 500 µL de solução de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v) (solvente A) e fracionadas por Cromatografia Líquida de Alta Performance de Fase Reversa – RP-HPLC (Shimadzu Corporation, Japão) utilizando coluna semipreparativa Jupiter 4µ Proteo (C₁₈, 90Å, 250 x 10 ID mm - Phenomenex). As frações foram eluídas utilizando gradiente linear de 5 – 65% de acetonitrila (ACN) com TFA 0,1% (v/v) (solvente B) durante 55 minutos com fluxo de 2,5 mL/min. As frações apresentando atividade fosfolipásica (teste descrito no item 5.4) foram submetidas a outras etapas cromatográficas usando colunas analíticas de fase reversa e gradientes otimizados de solvente B.

5.3.1 Fracionamento analítico das frações de *Pithecopus azureus*

Para a secreção de *P. azureus* foram utilizadas as colunas analíticas Aeris Widespore (3,6µ XB-C₁₈ 250 x 4.6 ID mm – Phenomenex), na qual as frações foram eluídas em gradiente linear de 5 – 65% de solvente B durante 45 minutos com fluxo de 1,0 mL/min, e a coluna SOURCE 5RPC-ST (4,6/150 mm – GE), na qual a PLA₂ semipurificada foi eluída em gradiente linear de 40 – 50% solvente B durante 15 minutos com fluxo de 1,0 mL/min.

5.3.2 Fracionamento analítico das frações de *Phyllomedusa tarsius*

Para *P. tarsius* foi utilizada a coluna Vydac (5µ C₁₈ 250 x 4,6 mm – DIONEX), na qual as frações contendo atividade fosfolipásica (teste descrito no item 5.4) foram eluídas em gradiente linear de ACN de 5 – 40% (solvente B/TFA 0,1%) durante 50 minutos com fluxo de 1,0 mL/min.

Durante todas as etapas cromatográficas para ambas as espécies, as frações foram monitoradas nos comprimentos de onda de 216 e 280 nm, coletadas manualmente e liofilizadas utilizando concentrador a vácuo (SpeedVac, Labconco). Análises de

espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS) para avaliação da massa e pureza das PLA₂s foram realizadas durante todo o processo.

5.4 Teste de atividade fosfolipásica

5.4.1 Análise de atividade catalítica da Pa-PLA₂

A atividade fosfolipásica da Pa-PLA₂ foi avaliada qualitativamente por incubação da proteína (1,6 mM) com dimeristoilfosfatidilcolina (DMPC) 100 µM em tampão PBS (pH 8,5) contendo Ca²⁺ 5 mM em volume final de 500 µL. Os tubos de reação foram mantidos à 40 °C por 15 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicatas usando veneno (1,6 mM) de *Bothrops moojeni* (cedido por Daniel Sifuentes) como controle positivo e os produtos das reações foram analisados por MALDI-TOF-MS. Para realização dessas análises, as amostras foram misturadas 1:3 (v/v) com solução saturada de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) (5 mg de DHB, 250 µL de ACN, 50 µL de TFA 3% e 200 µL de H₂O deionizada) e os espectros foram adquiridos em modo positivo e refletido na faixa de razão massa/carga (m/z) de 200 – 1500.

5.4.2 Análise de atividade catalítica das frações isoladas de *Phyllomedusa tarsius*

A atividade das frações semipurificadas foi avaliada qualitativamente conforme protocolo descrito acima. Entretanto, as PLA₂s contidas nessas frações não foram quantificadas para avaliação da atividade devido ao baixo grau de pureza.

5.5 Preparo da PLA₂ de *Pithecopus azureus* para análise estrutural

A fração liofilizada contendo a fosfolipase A₂ de *P. azureus*, denominada Pa-PLA₂, foi solubilizada em 50 µL (1 µg/µL) de tampão bicarbonato de amônio 50 mM (pH 8,0) e submetida ao protocolo de redução e alquilação utilizando soluções frescas

de ditioneitol (DTT) 100 mM e iodoacetamida (IAA) 300 mM. A reação de redução foi realizada durante 30 minutos a 60 °C seguida da reação de alquilação por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. A amostra reduzida/alquilada resultante foi fracionada por RP-HPLC utilizando coluna Vydac (5µ C₁₈250 x 4,6 mm – DIONEX) e gradiente linear de 5 – 65% de solvente B.

Após as análises por MALDI-TOF-MS e ESI-MS, a Pa-PLA₂ desnaturada/alquilada foi submetida à proteólise utilizando Tripsina grau de sequenciamento (Sigma-Aldrich) em tampão bicarbonato de amônio 50 mM (pH 8,0) à 37 °C por 24 horas. Solução de RapiGest SF (Waters Corp., USA) foi usada de acordo com as instruções do fabricante para melhorar a solubilidade da proteína, tornando-a mais susceptível à clivagem enzimática. Os peptídeos trípticos da Pa-PLA₂ foram analisados por MALDI-TOF-MS e MS/MS e por nanoLC-MS/MS.

5.6 Determinação das massas moleculares e sequenciamento *de novo* por espectrometria de massa

5.6.1 Análise das frações isoladas de *P. tarsius* por MALDI-TOF-MS

As amostras oriundas do fracionamento analítico foram analisadas por MALDI-TOF-MS em modo linear em espectrômetro de massa ultrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen – Germany) após mistura 1:3 (v/v) com solução saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) (5 mg CHCA, 250 µL de ACN, 50 µL TFA 3% e 200 µL de H₂O deionizada) e aplicação em placa MALDI. Os espectros de MS foram obtidos na faixa de m/z entre 4000 a 20000 após calibração externa utilizando padrões de calibração (Protein Calibration Standard I) (Bruker Daltonics, Bremen – Germany).

5.6.2 Análise da Pa-PLA₂ de *Pithecopus azureus* por MALDI-TOF-MS e MS/MS

A Pa-PLA₂ intacta foi parcialmente sequenciada pelo método de fragmentação *In-Source Decay* (ISD) após mistura 1:6 (v/v) da proteína purificada com solução saturada de 1,5-diaminonaftaleno (DAN) (5 mg de DAN, 250 µL de ACN, 50 µL TFA 3% e 200 µL de H₂O deionizada) e aplicação em placa MALDI. O espectro foi obtido

após calibração externa utilizando Albumina de Soro Bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) também fragmentada por ISD, gerando íons com m/z conhecida.

Os peptídeos trípticos da Pa-PLA₂ foram fragmentados em espectrômetro ultrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen – Germany) em modo refletido positivo na faixa de m/z entre 700 a 4500. Os espectros MS/MS foram adquiridos na mesma faixa de massa em modo LIFTTM, após calibração externa utilizando padrões de calibração (Peptide Calibration Standard II) (Bruker Daltonics, Bremen – Germany).

O sequenciamento *de novo* do fragmento gerado por ISD e dos fragmentos trípticos da Pa-PLA₂ foi realizado por assinalamento e interpretação manual dos espectros utilizando o software FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics, Bremen – Germany).

5.6.3 Determinação da massa molecular acurada da Pa-PLA₂ por espectrometria de massa ESI-QTOF/MS

A massa molecular acurada da Pa-PLA₂ foi obtida por infusão direta da proteína purificada solubilizada em ACN:H₂O 1:1 (v/v) contendo ácido fórmico (FA) 0.1%. As análises foram conduzidas em modo positivo utilizando espectrômetro Impact IITM (Bruker Daltonics, Bremen – Germany) controlado pelo software otofControl. O tempo de análise foi de 3 minutos (por amostra) e os espectros foram coletados usando método ajustado para análise de compostos de alta massa com faixa m/z entre 100 a 2500. Todos os espectros foram obtidos após calibração externa com padrões de calibração e analisados utilizando o software Compass DataAnalysis 4.3.110 (Bruker Daltonics, Bremen - Germany).

5.6.4 Análises dos peptídeos trípticos de Pa-PLA₂ por nanoLC-MS/MS

Os peptídeos trípticos da Pa-PLA₂ (proteólise descrita no item 5.5) foram solubilizados em 10 µL de solução de FA 0,1% (v/v) (solvente A) e posteriormente fracionados por Cromatografia Líquida de Ultra Performance de Fase Reversa – RP-

UPLC utilizando o sistema nanoACQUITY™ (Waters Corp., Manchester – UK) equipado com pré-coluna Symmetry (C₁₈, 5 µm, 5 mm x 300 µm) e coluna analítica HSST3 (C₁₈, 1,8 µm, 75 µm x 150 mm) (Waters Corp., USA). As frações foram eluídas utilizando gradiente linear de 3 – 40% de ACN contendo FA 0,1% (solvente B) durante 30 minutos com fluxo de 600 nL/min. Os peptídeos tripticos foram analisados em espectrômetro Synapt G2 HDMS™ (Waters Corp., Manchester – UK).

Todas as análises foram realizadas no modo íon positivo de nanoeletrospray (nanoESI +) com tensão de Cone de 30 eV e 2,75 kV aplicada ao capilar. O analisador de tempo de voo do espectrômetro de massa foi calibrado externamente com íons b+ e y+ de GluFibrinoPeptídeo (GFP) de faixa de m/z entre 50 a 1990 com calibração pós aquisição de dados usando o íon precursor de dupla carga GFP $[M + 2H]^{2+} = 785,8426$ Da. A varredura de MS foi realizada na faixa m/z entre 200 e 3000 em 0,5 segundos mudando para o modo MS/MS se a intensidade do íon individual ultrapassasse 5000 Total Ion Current (TIC). Os dados de MS/MS foram adquiridos na faixa m/z entre 50 e 4500 em varredura de 0,5 segundos com máximo de 3 íons selecionados a partir da análise de um único MS e alternando para o modo de análise de MS se a intensidade do íon caísse abaixo de 5000 TIC. A seleção do estado de carga do pico foi permitida apenas para íons com dupla e tripla carga e a energia de colisão no *trap* foi aplicada de acordo com o reconhecimento de carga. Os dados foram analisados utilizando as seguintes ferramentas do software MassLynx v4.1 (Waters Corp., Manchester - UK): DDAtool para seleção dos espectros de massa precursores; algoritmo MaxEnt 3 para processar os dados; e PepSeq para sequenciamento *de novo* dos espectros de MS/MS.

5.6.5 Análises de N-glicanos da Pa-PLA₂ por LC-MS e MALDI-TOF-MS

A Pa-PLA₂ desnaturada/alquilada solubilizada em tampão bicarbonato de amônio 50 mM (pH 8,3) foi tratada com as enzimas Peptídeo N-Glicosidase (PNGase) F e A por 16 horas para liberar os N-glicanos. Os N-glicanos livres foram purificados por Extração de Fase Sólida (SPE) usando coluna Sep Pak C₁₈, liofilizados em concentrador a vácuo (SpeedVac, Labconco), permetilados com iodometano (ICH₃) e novamente submetidos a SPE em coluna C₁₈, de acordo com a metodologia estabelecida⁵⁸. As amostras foram solubilizadas em 40 µL de metanol (MeOH) e antes

das análises foi imediatamente adicionado acetato de sódio 10 mM. Os N-glicanos derivatizados foram injetados (6 µL de amostra) em cromatógrafo ekspert ultraLC 100 (Sciex, Framingham, MA, USA) acoplado ao espectrômetro de massa TripleTOF 5600+ operado em modo positivo. O fracionamento foi realizado utilizando coluna analítica (2,6µ, C₁₈, 100 th, 50x2,1mm) mantida à 40 °C com fluxo de 0,2 mL/min, por aplicação de gradiente linear de 30 – 95% de MeOH contendo FA 0,1%, durante 12 minutos.

A fonte de íons TripleTOF 5600+ operou no modo positivo à temperatura de 650,0 °C. O espectrômetro de massa trabalhou no modo de alta resolução com gás de cortina igual a 15. A faixa de m/z de aquisições foi entre 800 e 2000. Os demais parâmetros de aquisição foram: número de ciclos = 2043; tempo de ciclo do período = 525 ms; frequência do pulsador = 13,569 kHz e tempo de acumulação = 500 ms. O espectrômetro de massa foi calibrado usando solução de calibração APCI positiva antes das aquisições. Os espectros MS/MS foram obtidos usando o modo IDA (Information Dependent Acquisition).

A Pa-PLA₂ (6,4 µM) nativa foi tratada com PNGase F e PNGase A por 16 h em tampão PBS (pH 6,0) à 37°C em volume final de 100 µL. A mistura tamponada da reação de deglicosilação foi diretamente submetida à análise por espectrometria de massa (MALDI TOF-MS) após mistura 1:3 (v/v) com solução saturada de CHCA. O espectro de massa foi adquirido em modo linear positivo na faixa de m/z entre 4000 a 20000, após calibração externa.

5.7 Extração de RNA e sequenciamento dos transcritos de *Pithecopus azureus* e *Phyllomedusa tarsius*

*5.7.1 Dissecção do tecido epitelial de *Pithecopus azureus* e *Phyllomedusa tarsius**

Os espécimes de ambas as espécies foram eutanasiados com injeção intracraniana - via forame magno – de cloridrato de lidocaína 2% (Cristália). O volume do anestésico variou entre 0,5 a 2,0 mL conforme a massa corporal de cada animal⁷². Estes procedimentos foram realizados de acordo com a resolução normativa nº 29, de 26 de setembro de 2016⁷³.

Para a extração de RNA total o tecido cutâneo extraído (oito espécimes de *P. azureus* e um espécime de *P. tarsi*) foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C. Devido ao menor tamanho dos indivíduos de *P. azureus* um número maior de espécimes foi necessário para gerar amostra suficiente para análise (a qual foi meramente qualitativa).

5.7.2 Extração de RNA e sequenciamento dos transcritos de *Pithecopus azureus*

O tecido epitelial dorsal retirado dos oito espécimes de *P. azureus* foi pulverizado em nitrogênio líquido (N₂) utilizando almofariz e pistilo esterilizados. Durante todo o procedimento manteve-se constante a adição de N₂ líquido para evitar degradação. Uma quantidade aproximada de 10 mg da amostra pulverizada foi adicionada em um microtubo (novo e livre de RNAses) contendo 1,0 mL de Reagente TRIzol (Invitrogen), agitada em vórtex por 3 minutos e, por fim, centrifugada por 15 minutos à 4°C e a 13.000 rotações por minuto (rpm).

Em outro microtubo vazio foram adicionados o sobrenadante e 200 µL de clorofórmio, os quais foram submetidos à agitação por 1 minuto em agitador vórtex, mantidos em temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugados por 15 minutos à 4°C e a 13000 rpm. A fase aquosa, contendo RNA, foi coletada, lavada com 500 µL de álcool isopropílico gelado, agitada gentilmente e deixada em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. A amostra foi novamente centrifugada à 4°C por 5 minutos a 13000 rpm e o precipitado resultante foi lavado com 1,0 mL de etanol 75% gelado. Uma última etapa de centrifugação por 5 minutos à 4°C e a 13000 rpm foi realizada e em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco à 37°C em banho seco para evaporação do etanol. O RNA foi solubilizado em 30 µL de água deionizada esterilizada, quantificado utilizando Reagente e Kit Quant-iTTMRiboGreen® RNA (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante.

O RNA total foi tratado com DNase-I e a qualidade e quantidade de RNA foram verificadas com um Bioanalyzer (2100, RNA Nano 6000 Agilent). A síntese da 1ª fita de cDNA foi realizada usando 1,0 µg de RNA total e kit SMARTerTM PCR cDNA Synthesis (Clontech). Após a síntese de DNA de cadeia dupla, o DNA (~5,0 µg) foi nebulizado para um tamanho médio de fragmento de 650 pb, ligado a um adaptador

usando procedimentos padrões⁷⁴ e então sequenciado usando GS-FLX Titanium (Beckman Coulter Genomics SA, Grenoble, França). Todos os procedimentos de sequenciamento foram realizados por 454 Life Science/Roche Company (EUA). A busca pela sequência do precursor da Pa-PLA₂ foi realizada em mais de 600 leituras resultantes usando o software Geneious (BiomattersLtda., Nova Zelândia) e partindo de um fragmento da sequência obtida por espectrometria de massa.

5.7.3 Extração do RNA e sequenciamento dos transcritos de *Phyllomedusa tarsius*

O RNA total de um espécime de *Phyllomedusa tarsius* foi extraído dos tecidos cutâneos do dorso e ventre isoladamente (0,1 g de cada tecido). O tecido foi extraído das duas regiões devido à utilização de apenas um espécime. Com auxílio de almofariz e pistilo previamente esterilizados o material foi pulverizado em nitrogênio líquido (N₂). Em microtubos de 1,5 mL (novos e livres de RNAses) as amostras pulverizadas foram submetidas à extração de RNA utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Após a síntese de DNA de cadeia dupla, o DNA foi sequenciado utilizando comprimento de leitura de 2 x 100 pb na plataforma HiSeq™ 2000 (Illumina, San Diego, CA, EUA). Todos os procedimentos de sequenciamento foram realizados por Macrogen Inc (Seul, República da Coreia).

Para processamento dos resultados do sequenciamento, a qualidade das sequências foi avaliada utilizando a ferramenta FastQC⁷⁵. Em seguida, utilizando o software Trimmomatic⁷⁶, os adaptadores e as sequências de baixa qualidade foram removidos. A normalização foi realizada utilizando o script normalized-by-median.py do pacote khmer⁷⁷, o qual eliminou as sequências com abundância mediana (valor C) menor que dois, ou seja, foram eliminadas todas as sequências com baixa cobertura resultantes, geralmente, de erros do sequenciamento⁷⁸. Em seguida, a montagem das sequências dos transcritos foi novamente realizada com o software Trinity utilizando três algoritmos diferentes: Inchworm, Chrysalis e Butterfly⁷⁹. Para a montagem das sequências foi definido um tamanho mínimo de 500 pb para os contigs. Os CDS e UTRs (Untranslated region) foram identificados nos transcritos montados utilizando o TransDecoder⁷⁹, identificando a ORF (Open Reading Frame) mais provável para cada

transcrito montado. Por fim, foram gerados os arquivos .cds (contendo as sequências de nucleotídeos das ORFs selecionadas) e o arquivo .pep (contendo as sequências aminoacídicas dos peptídeos/proteínas obtidos a partir da tradução *in silico* das ORFs anotadas).

5.8 Imageamento por Espectrometria de Massa (MALDI-*imaging*) das fosfolipases A₂ de *P. tarsius*

Os fragmentos de tecido epitelial extraídos (subitem 5.7.1) de um indivíduo da *P. tarsius* foram fixados em lâminas de vidro condutoras com revestimento de Óxido de Índio e Estanho (ITO) (Bruker Daltonics, Bremen - Germany) e mantidos ao ar livre para completa secagem. Em seguida as lâminas foram acopladas em um adaptador MTP Slide Adapter II (Bruker Daltonics, Bremen – Germany). Com uma micropipeta, manual e uniformemente foi aplicada uma fina camada de matriz CHCA sobre cada corte de tecido fixado e em uma pequena região de cada corte foram aplicados 3 µL de uma mistura (1:9) de calibrante (Protein Calibration Standard I) (BrukerDaltonics, Bremen – Germany) com matriz CHCA para realizar calibração externa. Após completa secagem e cristalização da matriz, as amostras foram analisadas em espectrômetro de massa UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen – Germany) no modo linear positivo e na faixa de m/z entre 4000 a 20000. A varredura e aquisição automática dos espectros de cada amostra foram controlados pelo software flexControl (Bruker Daltonics, Bremen – Germany), ajustado para rastrear o tecido em passos únicos de 200 µm, com 200 disparos de laser em cada posição. Os espectros e imagens gerados foram analisados utilizando os softwares flexAnalysis e flexImaging (Bruker Daltonics, Bremen – Germany).

5.9 Múltiplo alinhamento das sequências das PLA₂s elucidadas de *Pithecopus azureus* e *Phyllomedusa tarsius*

As sequências das fosfolipases A₂ de ambas as espécies foram submetidas e comparadas com sequências depositadas no banco de dados de proteínas não redundantes do NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando

BLASTp (Basic local Alignment Search Tool_protein). O alinhamento foi realizado com sequências que apresentaram identidade $\geq 40\%$ com as amostras, utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor, versão 7.2.5⁸⁰.

5.10 Modelagem Molecular da Pa-PLA₂

A modelagem molecular foi realizada mediante uso do conjunto de programas Shrodinger Biologics (licença 2018-3). A sequência aminoacídica da Pa-PLA₂ madura foi carregada no visualizador de múltiplas sequências do software Bioluminate v3.2 e o modelo de homologia foi construído usando o alinhamento de consenso das seguintes estruturas tridimensionais de sPLA₂s: 1JIA, 4HG9, 5WZO, 1C1J, 5WZM, 1VAP, 1U73, 5G3N, 1POE, 1RGB, 2I0U, 1OQS, 2H4C, 1VIP. Outros ajustes do modelo foram realizados manualmente, ligações dissulfeto foram fixadas e um íon de cálcio foi adicionado. Finalmente, o modelo foi submetido à dinâmica molecular utilizando NAMD⁸¹. A estrutura tridimensional do modelo foi solvatada em uma esfera de água em gotas usando NaCl₂ como contra-íons para equilibrar as cargas do sistema. A energia total do sistema foi minimizada usando o campo de força OPLS até que o desvio médio quadrático (RMSD) caísse abaixo de 0,1 kcal/mol/Å⁸². O sistema foi então equilibrado para 100 ps e a dinâmica molecular foi realizada durante 1 ns a 300 k para ambas as condições. A estrutura final da trajetória foi minimizada e a água com mais de 4 Å de distância da molécula foi removida. As cadeias laterais dos aminoácidos, os refinamentos do *loop* e as pesquisas por resíduos reativos foram realizados usando um conjunto de ferramentas do software Schrödinger Biologics.

6. *RESULTADOS*

6.1 Resultados do estudo realizado com *Pithecopus azureus*

6.1.1 Fracionamento da secreção cutânea de *Pithecopus azureus*

A cromatografia líquida de fase reversa do extrato bruto da secreção cutânea de *P. azureus* resultou na separação de vários compostos, muitos dos quais já descritos por nosso grupo^{9,83}. Resultou também na identificação de uma fração heterogênea (G04) eluída entre 41 e 45 minutos, na qual a atividade de fosfolipase A₂ foi detectada (Figura 7). Os compostos presentes na fração G04 foram submetidos a etapas adicionais de separação e resultaram em 15 frações (Figura 7 B). Após análise por MALDI-TOF-MS de todas as frações, a fosfolipase A₂ foi detectada na fração 15, que foi novamente recromatografada, isolada e denominada Pa-PLA₂ (Figura 7 C).

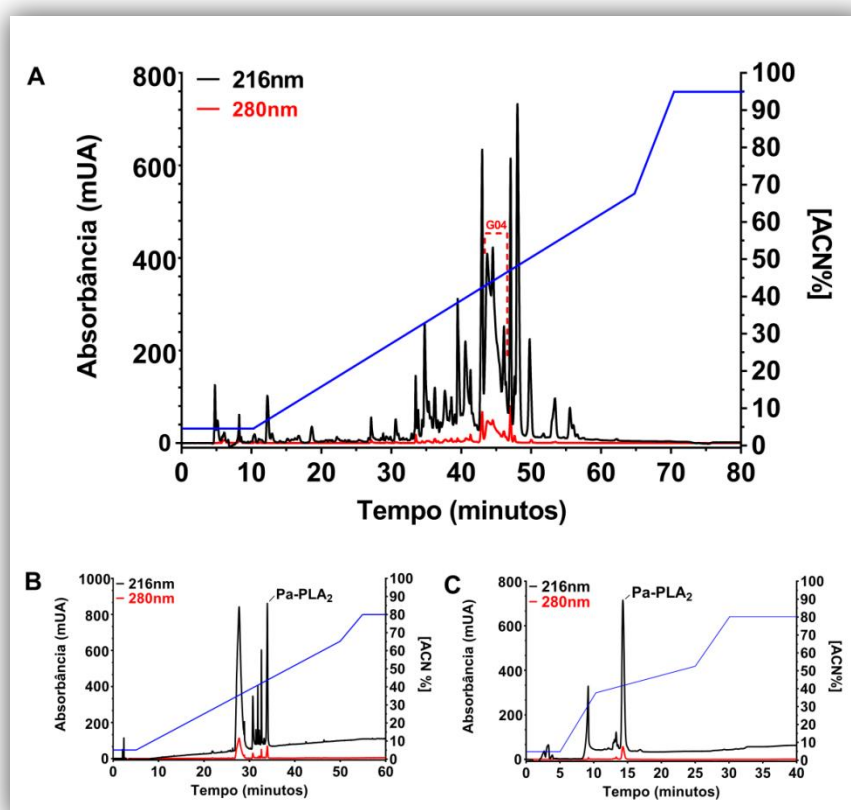


Figura 7 - Cromatogramas de todas as etapas de purificação da Pa-PLA₂. (A) Perfil semipreparativo do extrato total de *Pithecopus azureus*. (B) Fração heterogênea (G04) eluída entre 25 a 35 minutos e (C) Fração homogênea da Pa-PLA₂ eluída em 14,3 min. (44% de gradiente de ACN).

6.1.2 Determinação da massa molecular

A Pa-PLA₂ foi primeiramente analisada por MALDI-TOF-MS em modo linear, no qual foram detectados íons com diferentes estados de cargas: $[M + H]^+ = 15462,4$ Da, $[M + 2H]^{2+} = 7731,8$ Da e $[M + 3H]^{3+} = 5154,7$ Da (Figura 8).

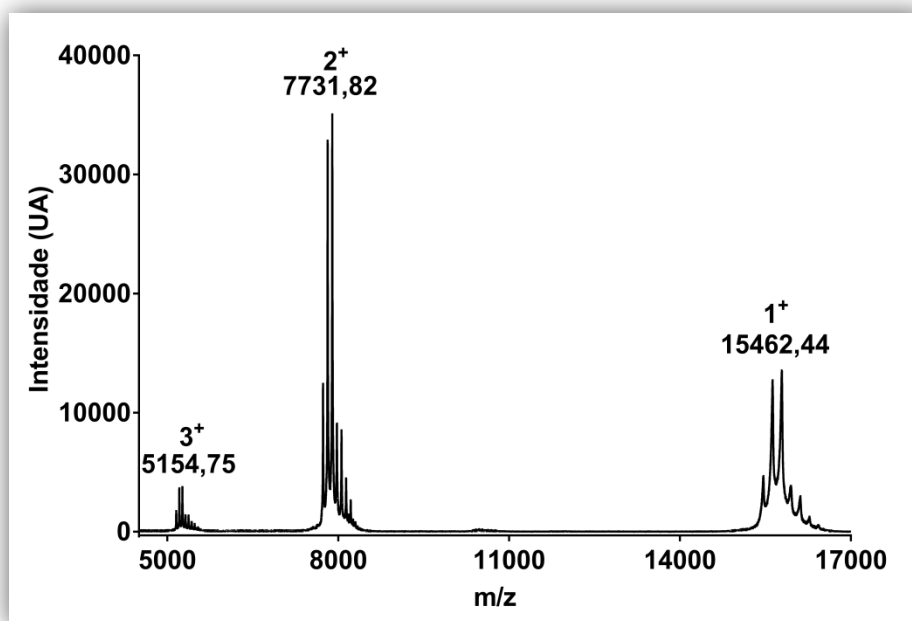


Figura 8 - Espectro de massa adquirido em modo linear positivo por MALDI-TOF-MS na faixa de m/z entre 4000 a 20000. A Pa-PLA₂ foi detectada com íons com diferentes estados de carga: $[M + H]^+ = 15462,44$ Da, $[M + 2H]^{2+} = 7731,82$ Da e $[M + 3H]^{3+} = 5154,75$ Da. Os valores representados correspondem ao primeiro íon de cada grupo. Erro de 43,7 ppm ($[M + H]^+$).

Quando analisada por espectrometria de massa de alta resolução (ESI-QTOF-MS), evidenciou-se um perfil de glicosilação observado no espectro como um conjunto de íons apresentando sucessivos acréscimos de m/z de 16,2 ($[M + 10H]^{10+} = 162$ Da) (Figura 9), correspondente à massa de uma hexose⁵⁸. O grupo de íons mais intensamente detectados relacionado à Pa-PLA₂ glicosilada apresenta $[M + 10H]^{10+} = 1578,593$ Da, que corresponde à massa molecular deconvoluída de 15775,930 Da (Figura 9B). Os íons de baixa intensidade detectados sugerem a presença de isoformas da mesma cadeia polipeptídica com um padrão de glicosilação semelhante.

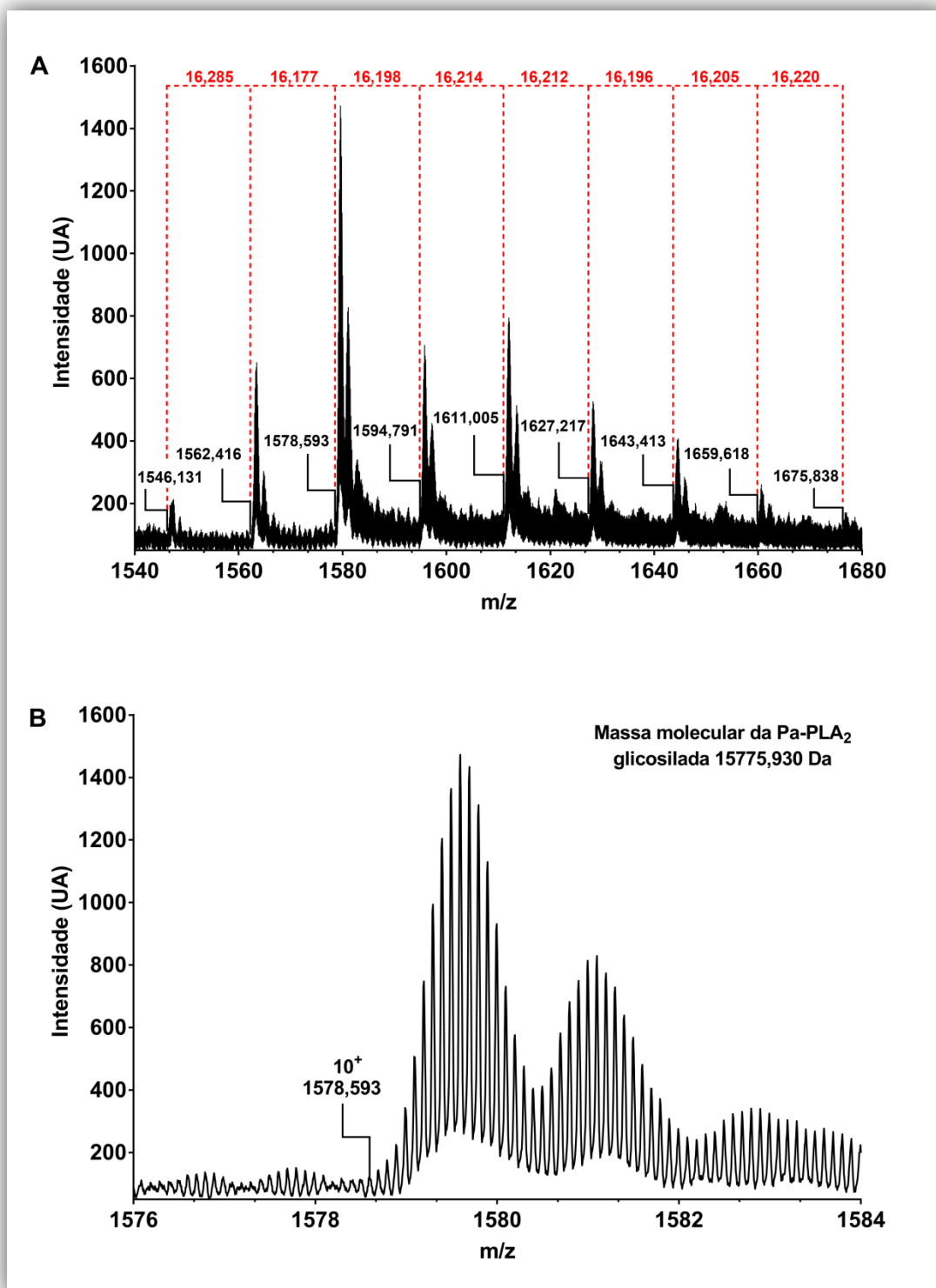


Figura 9 - Espectros de massa com distribuição monoisotópica da Pa-PLA₂ isolada, analisada por ESI-QTOF-MS. (A) Grupo de íons $[M + 10H]^{10+}$ mostrando adições sucessivas de m/z de 16,2 ($[M + 10H]^{10+} = 162$ Da) correspondente ao valor de um resíduo de hexose. (B) Faixa do espectro detalhada mostrando o perfil de massa monoisotópica da Pa-PLA₂ glicosilada. Erro de 0,63 ppm.

Após a deglicosilação da Pa-PLA₂ em condições não desnaturantes, o grupo de íons mais intensamente detectados relacionado à Pa-PLA₂ deglicosilada apresenta $[M + 11H]^{11+} = 1302,584$ Da que corresponde à massa molecular deconvoluída de 14317,424 Da (Figura 10). Após a deglicosilação da amostra, foram detectados íons com adições sucessivas de m/z de 37,6 a partir do íon correspondente à Pa-PLA₂, indicando, possivelmente, algum outro tipo de modificação não analisada neste estudo (Figura 10 B).

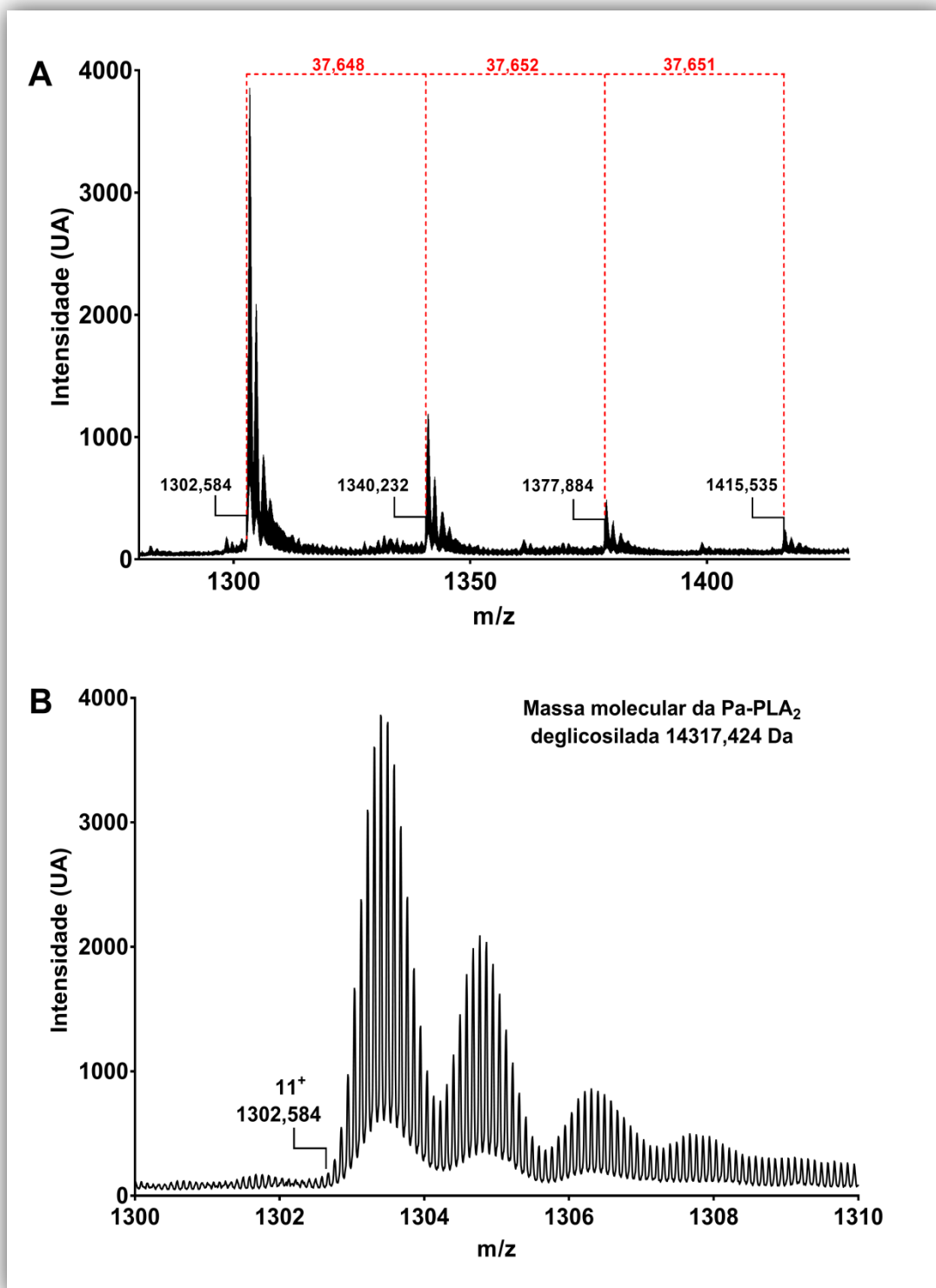


Figura 10 - Espectros de massa com distribuição monoisotópica da Pa-PLA₂ isolada, analisada por ESI-QTOF-MS. (A) Grupo de íons $[M + 11H]^{11+}$ mostrando outras possíveis isoformas com adições de m/z de 37,6, indicando algum outro tipo de modificação não analisada neste estudo. (B) Faixa do espectro detalhada mostrando o perfil de massa monoisotópica da Pa-PLA₂ deglicosilada. Erro de 4,9 ppm.

6.1.3 Teste de atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica da Pa-PLA₂ foi determinada pela incubação direta da enzima glicosilada nativa com o fosfolípido DMPC, cuja massa molecular $[M + H]^+$ equivale a = 678,5 Da. A atividade de PLA₂ sobre o DMPC foi confirmada pela detecção dos íons $[M + H]^+ = 468,8$ Da e $[M + Na]^+ = 490,8$ Da correspondentes ao ácido lisofosfatídico (Figura 11 A) e $[M + Na]^+ = 431,7$ Da correspondente ao ácido lisofosfatídico com perda do grupo metilamina por uma clivagem heterolítica no espectrômetro de massa (Figura 11 A, Inserção). Os íons 426,0 Da, 438,1 Da, 445,0 Da e 452,1 Da observados nos espectros não foram identificados.

Componentes idênticos foram obtidos quando alíquotas do veneno liofilizado de *Bothrops moojeni*, conhecido por conter fosfolipases, foram incubadas com DMPC nas mesmas condições experimentais como controle positivo (Figura 11B). Resultados semelhantes foram também observados para a enzima deglicosilada, sugerindo que a atividade catalítica da Pa-PLA₂ é qualitativamente equivalente à sua forma glicosilada (dados não mostrados). Ou seja, a deglicosilação parece não ter afetado a presença da atividade fosfolipásica na Pa-PLA₂.

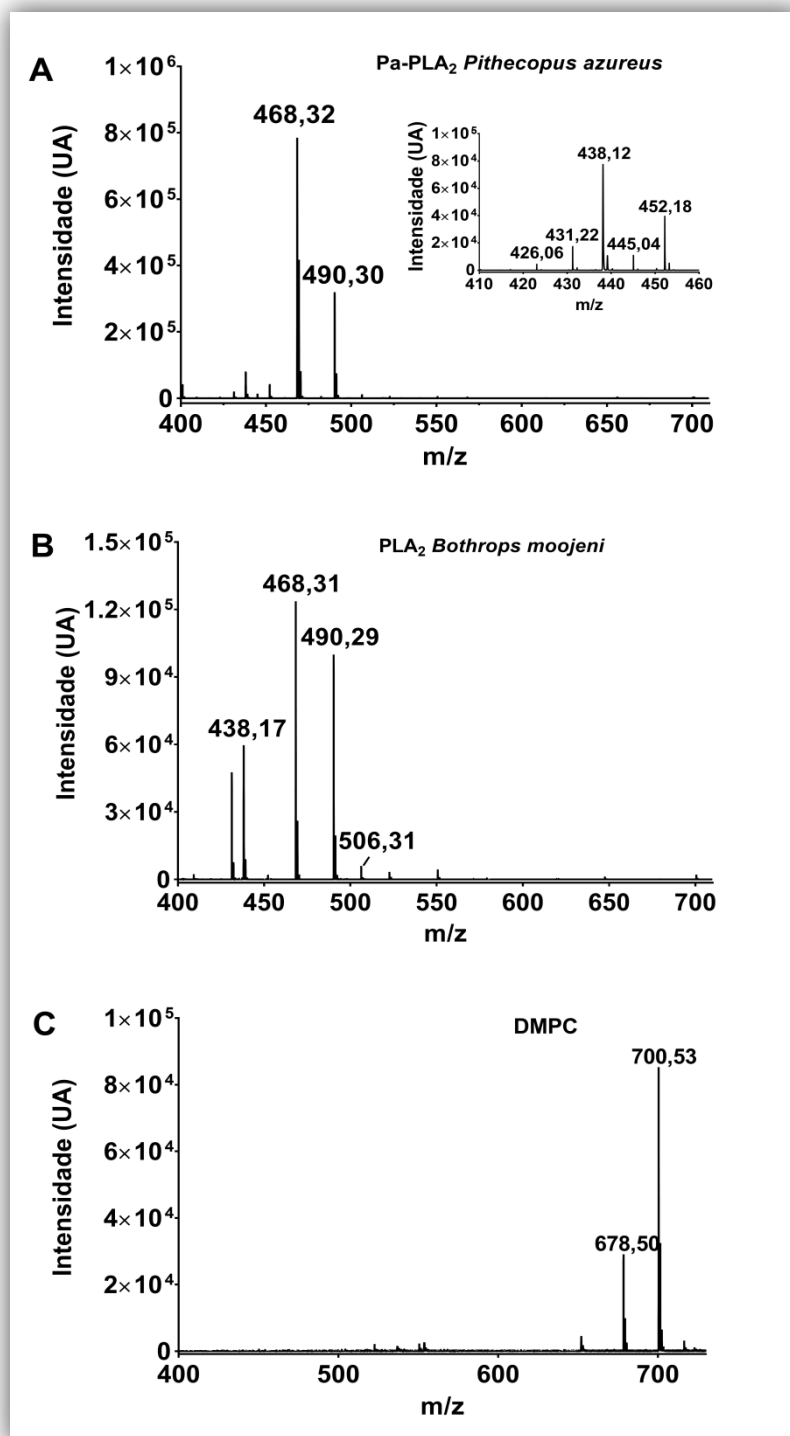


Figura 11 - Análise de espectrometria de massa por MALDI-TOF-MS do ensaio de atividade de fosfolipase da Pa-PLA₂ sobre DMPC em tampão PBS. Espectros de massa relativo à avaliação da integridade de DMPC após incubação (15 min) com Pa-PLA₂ (A) e com veneno de *B. moojeni* (controle positivo) (B), indicando uma clivagem enzimática na posição *sn*-2 do DMPC em ambos os casos. (C) Espectro de massa relativo à avaliação da integridade de DMPC na ausência de qualquer atividade de fosfolipase (controle negativo).

6.1.4 Identificação e caracterização de N-glicanos da Pa-PLA₂

As análises de LC-MS/MS de N-glicanos liberados da Pa-PLA₂ desnaturada/alquilada após o tratamento com PNGase F e A revelou várias frações eluindo em diferentes tempos de retenção. Algumas moléculas identificadas com as mesmas massas eluíram em frações com distintos tempos de retenção, sugerindo a existência de isômeros estruturais para cada composição de glicano (Figura 12). Entre eles, os espectros MS/MS dos íons $[M + Na]^+ = 763,376$ Da, $[M + Na]^+ = 967,482$ Da e $[M + Na]^+ = 1171,582$ Da indicam a presença dos motivos de glicanos GlcNAc₂Man, GlcNAc₂Man₂ e GlcNAc₂Man₃, respectivamente (Figura 13). Os espectros MS foram adquiridos para dois outros íons, $[M + Na]^+ = 1375,681$ Da e $[M + Na]^+ = 1579,783$ Da, consistentes com as composições GlcNAc₂Man₄ e GlcNAc₂Man₅ (Figura 14 A e B), dois outros glicanos do tipo rico em manose. No entanto, devido à baixa relação sinal/ruído, os espectros MS/MS não foram obtidos para estas espécies e suas identificações foram assumidas com base na precisão da massa das medidas apenas de MS.

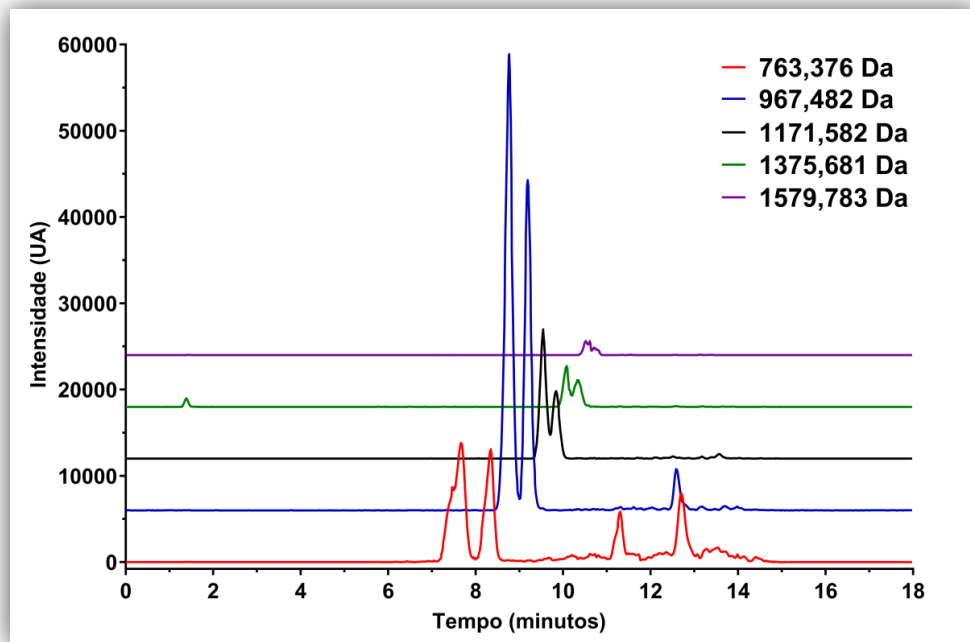


Figura 12 – Cromatograma de íons extraídos (EIC) relacionados a N-glicanos derivados da Pa-PLA₂ tratada com PNGase F e A. Diferentes tempos de retenção são observados para moléculas com a mesma relação m/z, indicando a presença de isômeros, cuja conformação leva à mudança na eluição dessas moléculas.

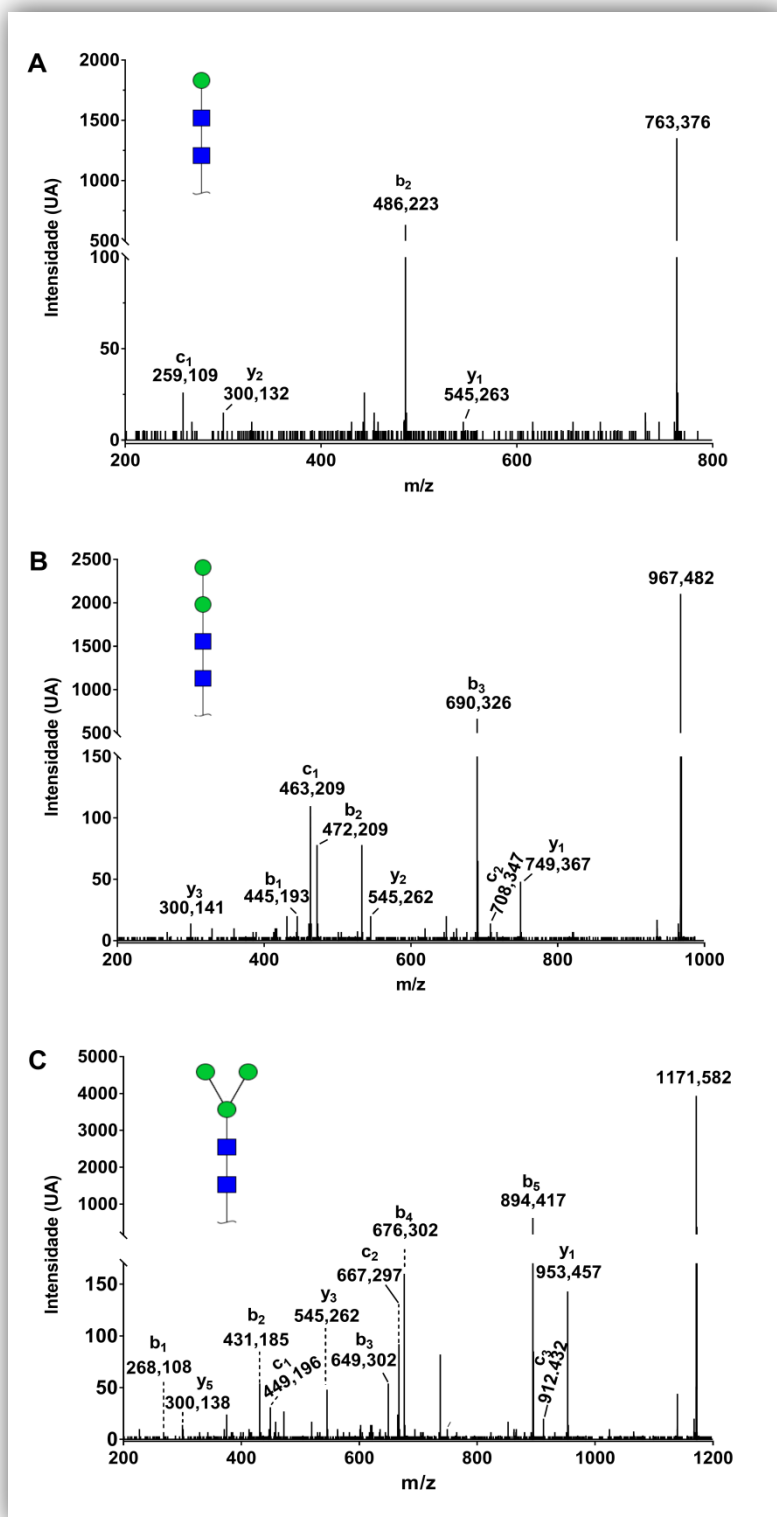


Figura 13 – Identificação e caracterização estrutural dos N-glicanos liberados da Pa-PLA₂ tratada com PNGase F e A. Espectros MS/MS dos íons precursoros $[M + Na]^+ = 763,376$ Da (A), $[M + Na]^+ = 967,482$ Da (B) e $[M + Na]^+ = 1171,582$ Da (C), correspondendo aos motivos de glicanos GlcNAc₂Man, GlcNAc₂Man₂ e GlcNAc₂Man₃, respectivamente.

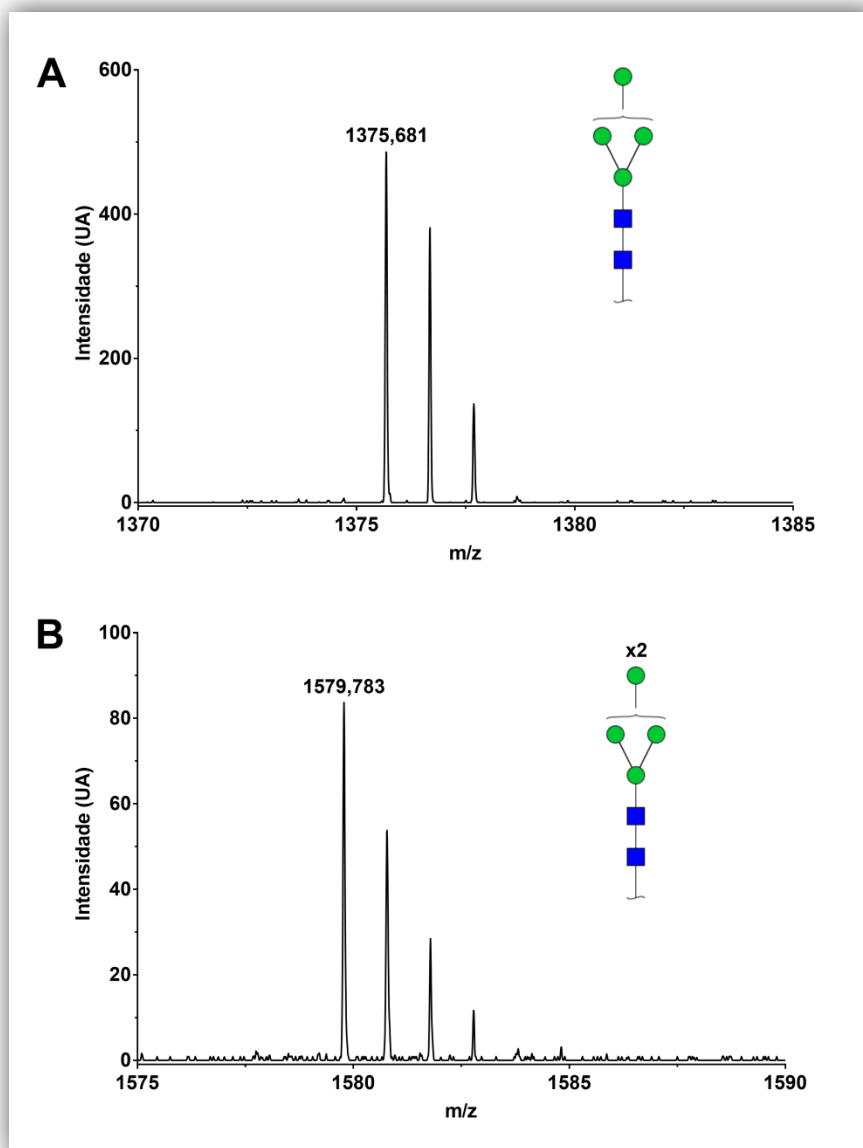


Figura 14 – Identificação dos N-glicanos liberados da Pa-PLA₂ tratada com PNGase F e A. Espectros MS mostrando os íons $[M + Na]^+ = 1375,681$ Da (A) e $[M + Na]^+ = 1579,783$ Da (B), os quais foram inferidos como GlcNAc₂Man₄ e GlcNAc₂Man₅, respectivamente. O símbolo “chave” seguido de outros resíduos de manose significa que não se sabe a posição correta onde estes resíduos ligam-se. A numeração acima do resíduo (x2) representa a quantidade de resíduos ligados à estrutura GlcNAc₂Man₃.

6.1.5 Determinação da sequência aminoacídica da Pa-PLA₂

Usando a técnica de fragmentação *In-Source Decay* (ISD) por MALDI-TOF-MS, foi possível sequenciar 41 resíduos que constituem uma parte da região N-terminal da Pa-PLA₂ nativa (Figura 15).

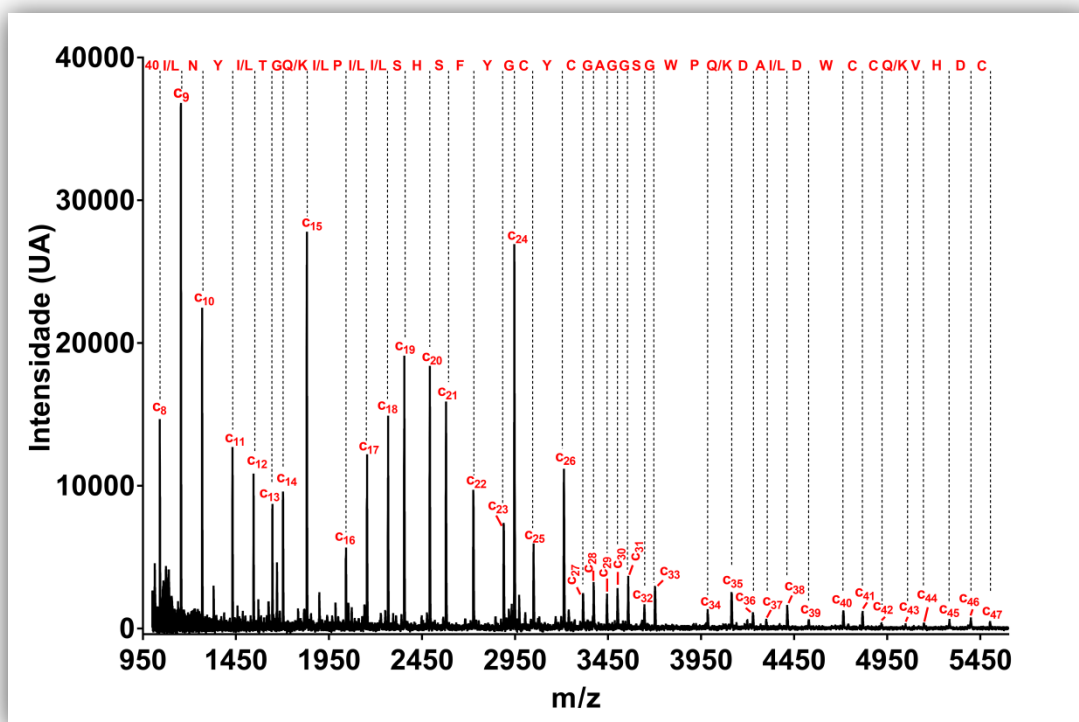


Figura 15 - Espectro de massa (MALDI-TOF-MSMS) da Pa-PLA₂ nativa mostrando o sequenciamento *de novo* com a série de íons C assinalados, correspondendo a um fragmento composto por 41 resíduos de aminoácidos da proteína intacta obtida pelo método ISD. Os aminoácidos isobáricos (Q/K e L/I) aparecem alternativamente representados devido à limitação técnica para distingui-los. Todos os resíduos de cisteína foram reduzidos e alquilados (carboxiamidomelticisteína).

O sequenciamento *de novo* dos peptídeos obtidos da proteólise tríplica (Tabela 3) permitiu determinar a sequência completa da região N-terminal (Figura 16 e Figura 17), bem como as sequências de outras regiões da cadeia polipeptídica (Figura 18 a Figura 23). Os espectros MS/MS dos peptídeos 06 e 07 (Tabela 3) não puderam ser

adquiridos e suas identidades foram confirmadas por medições de massa em modo MS (Figura 21) e por dados de sequenciamento de cDNA (Figura 24).

Tabela 3 - Lista de seqüências dos peptídeos trípticos da Pa-PLA₂ determinadas por análise de dados de nano-LC-MS/MS e MALDI-TOF-MS e MS/MS. A identidade dos aminoácidos isobáricos (K/Q e I/L) foi confirmada pelo sequenciamento de cDNA. Todos os resíduos de cisteína foram reduzidos e alquilados (carboxiamidomelticisteína).

Peptídeo	Seqüência	[M + H] ⁺ Exp. (ESI)	[M + H] ⁺ Exp. (MALDI)	[M + H] ⁺ Teórica
01	SLFQFR	797,432 Da	797,54 Da	797,430 Da
02	LMINYLTGK	1052,594 Da	Não detectado	1052,580 Da
03	NLQCVETDTSGCPR	1636,692 Da	1636,70 Da	1636,705 Da
04	DAIDWCCQVHDCCYGR	2114,801 Da	2114,85 Da	2114,829 Da
05	LPILSHSFYGCYCGAGGSGWPK	2414,115 Da	2414,17 Da	2414,105 Da
06	RICECDR [§]	Não detectado	1008,53 Da	1008,434 Da
07	ICECDR [§]	Não detectado	852,40 Da	852,333 Da
08	GlcNAc ₂ Man ₅ LASICFQQHDTYNSSNLDPK	3625,522 Da	Não detectado	3625,536 Da
Peptídeo	Seqüência	[M + 2H] ²⁺ Exp. (ESI)	[M + 2H] ²⁺ Exp. (MALDI)	[M + 2H] ²⁺ Teórica
09	GlcNAc ₂ Man ₃ MSASGCDPYFQPNFSYINK ^{§§}	1641,0669 Da	Não detectado	1641,175 Da

[§]Seqüências determinadas por espectro de MS e cDNA. ^{§§}Seqüência determinada por espectrometria de massa apenas parcialmente devido à escassez de íons no espectro de MS/MS, mas confirmada pelo sequenciamento de cDNA.

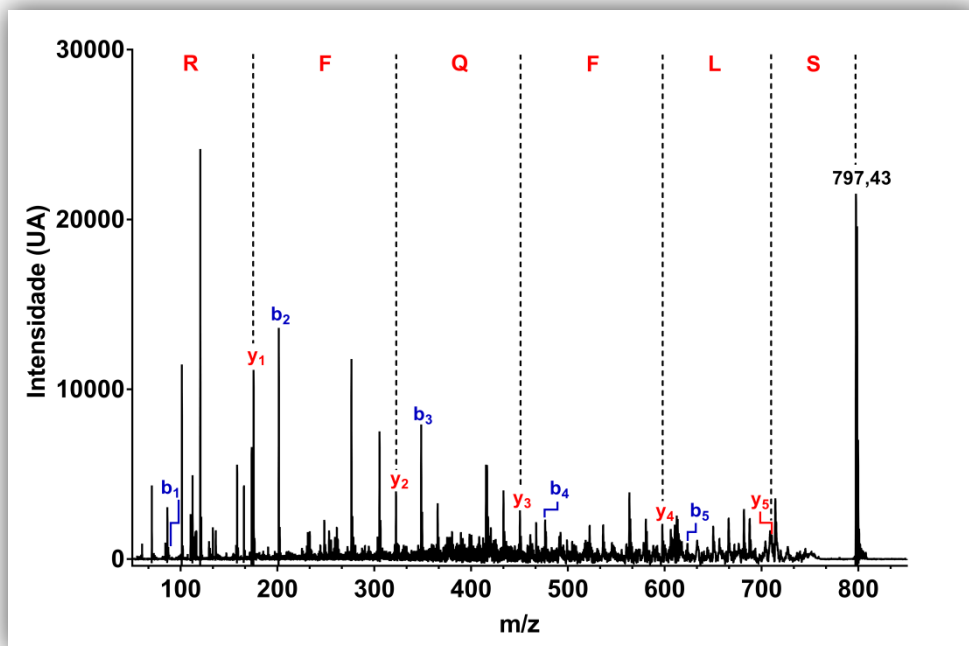


Figura 16 - Espectro de massa (MALDI-TOF-MS/MS) do sequenciamento *de novo* do peptídeo tríptico $[M + H]^+ = 797,5$ Da com as séries de íons *y* e *b* assinalados.

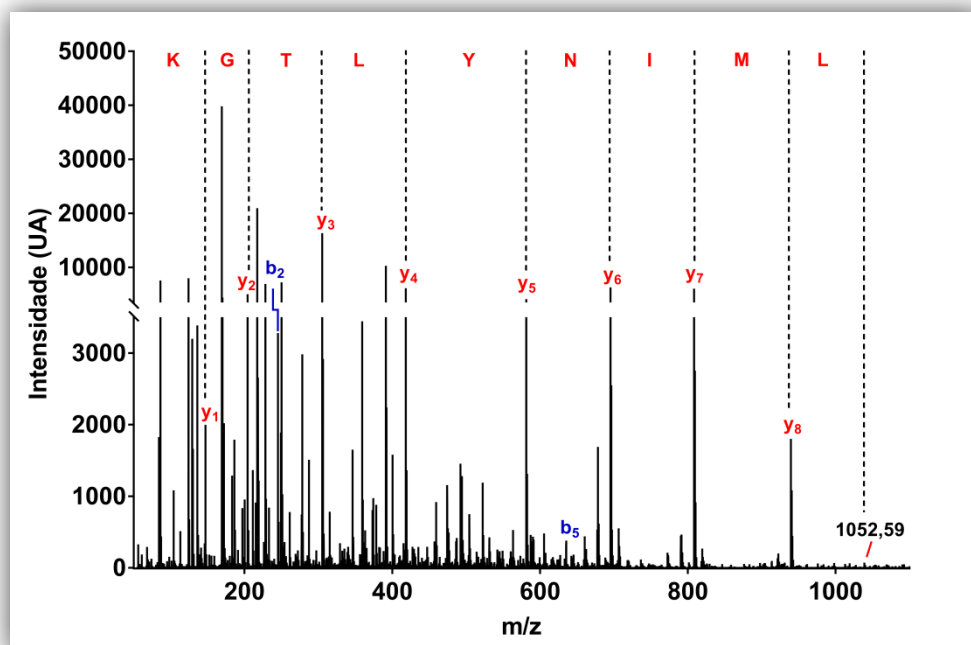


Figura 17 - Espectro de massa (nano-LC-MS/MS) do sequenciamento *de novo* do peptídeo tríptico $[M + H]^+ = 1052,5$ Da com as séries de íons *y* e *b* assinalados.

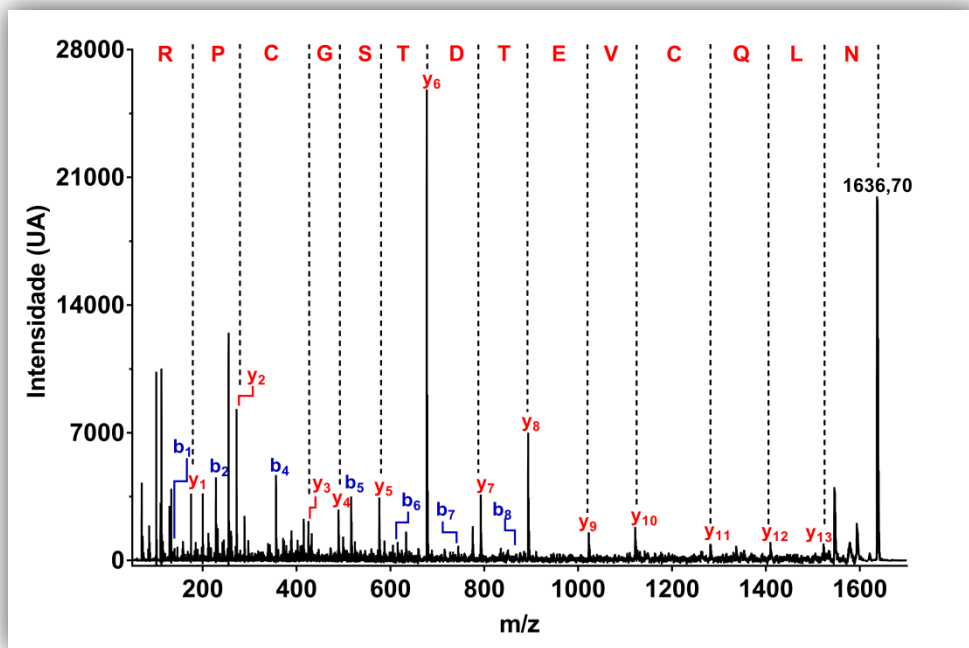


Figura 18 - Espectro de massa (MALDI-TOF-MS/MS) do sequenciamento *de novo* do peptídeo tríptico $[M + H]^+ = 1636,70$ Da com as séries de íons *y* e *b* assinalados.

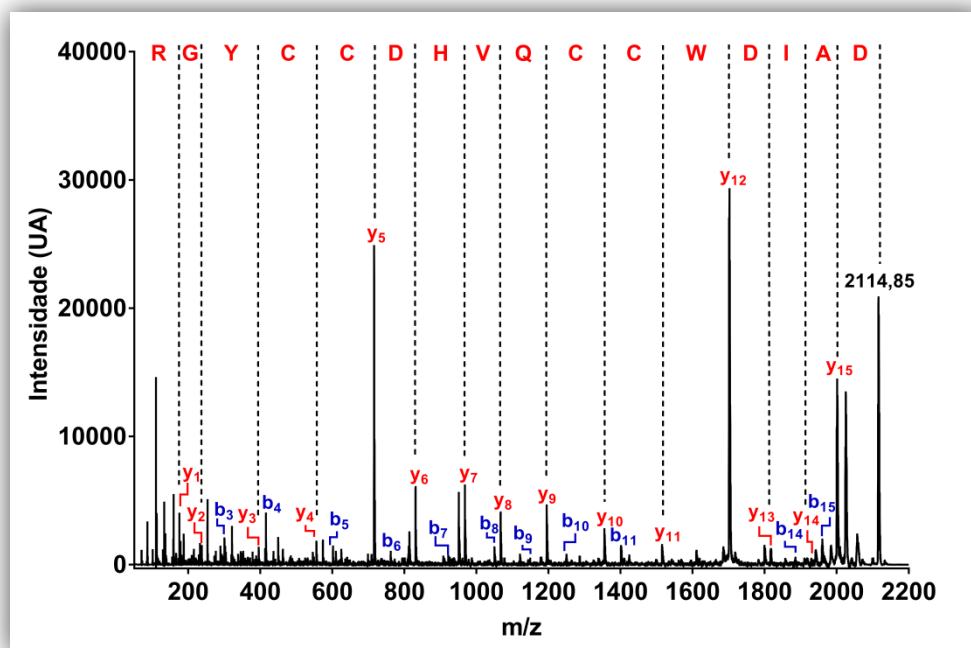


Figura 19 - Espectro de massa (MALDI-TOF-MS/MS) do sequenciamento *de novo* do peptídeo tríptico $[M + H]^+ = 2114,85$ Da com as séries de íons *y* e *b* assinalados.

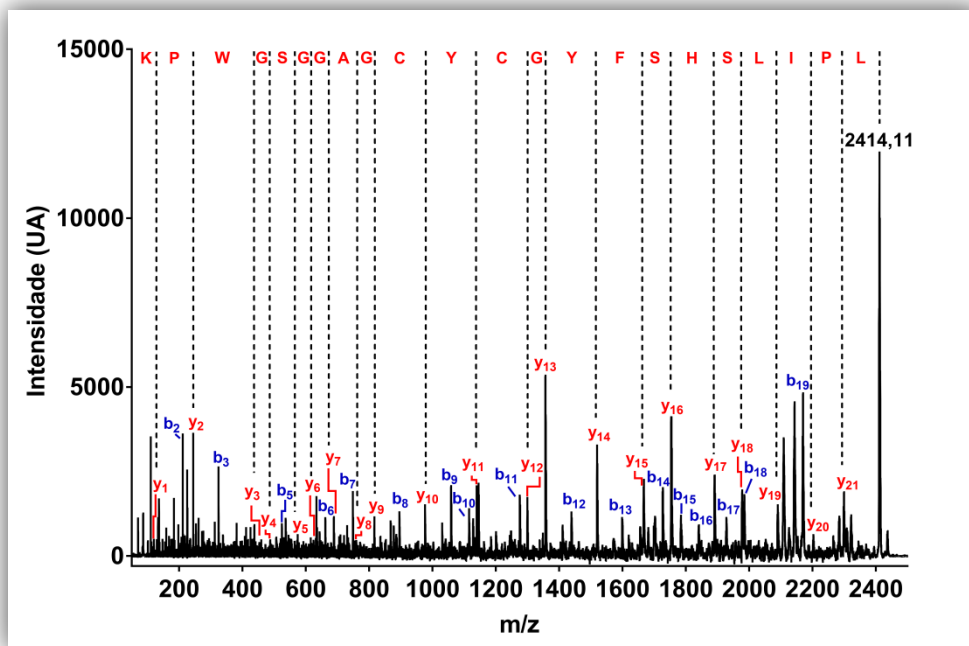


Figura 20 - Espectro de massa (MALDI-TOF-MS/MS) do sequenciamento *de novo* do peptídeo tríptico $[M + H]^+ = 2414,11$ Da com as séries de íons *y* e *b* assinalados.

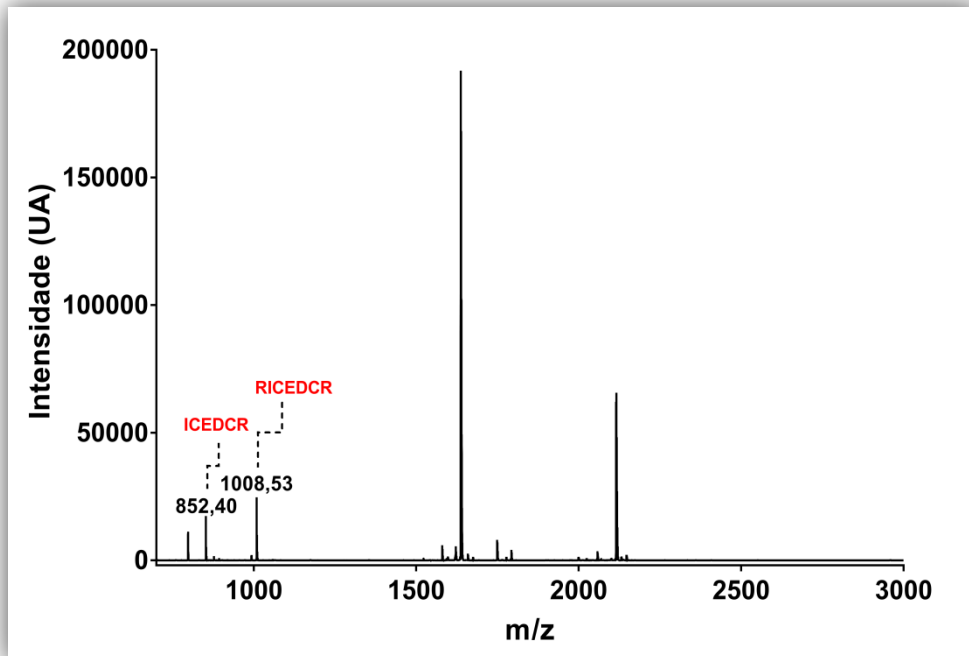


Figura 21 - Espectro de massa de peptídeos trípticos obtidos por MALDI-TOF-MS. Os íons $[M + H]^+ = 852,40$ Da e $[M + H]^+ = 1008,53$ Da são consistentes com a composição, respectivamente, ICEDCR e RICEDCR, identificados na sequência completa da Pa-PLA₂ determinada por informação de cDNA.

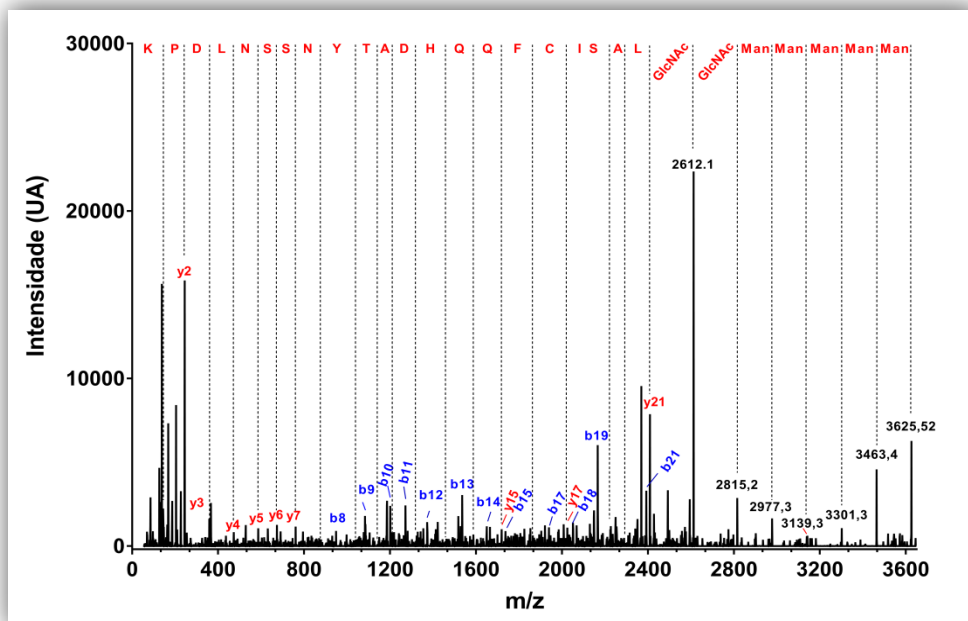


Figura 22 - Espectro de massa (nano-LC-MS/MS) do sequenciamento *de novo* do peptídeo tríptico $[M + H]^+ = 3625,52$ Da glicosilado com o motivo $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ com as séries de íons *y* e *b* assinalados.

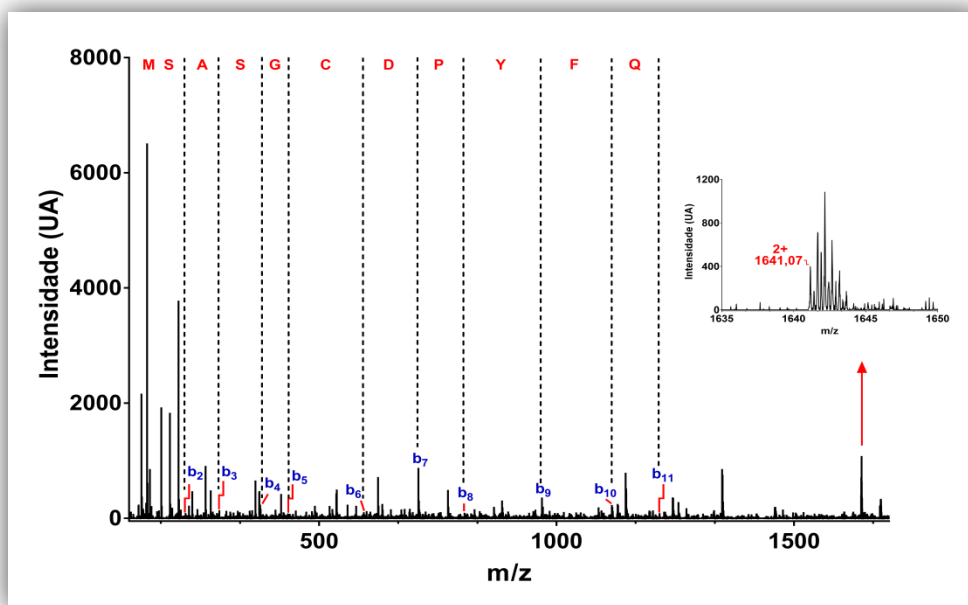


Figura 23 - Espectro de massa (nano-LC-MS/MS) do sequenciamento *de novo* do peptídeo tríptico $[M + 2H]^{2+} = 1642,07$ Da glicosilado com motivo $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$. Sequência determinada parcialmente pelo assinalamento de íons *b* devido à escassez de íons nos espectros de MS/MS.

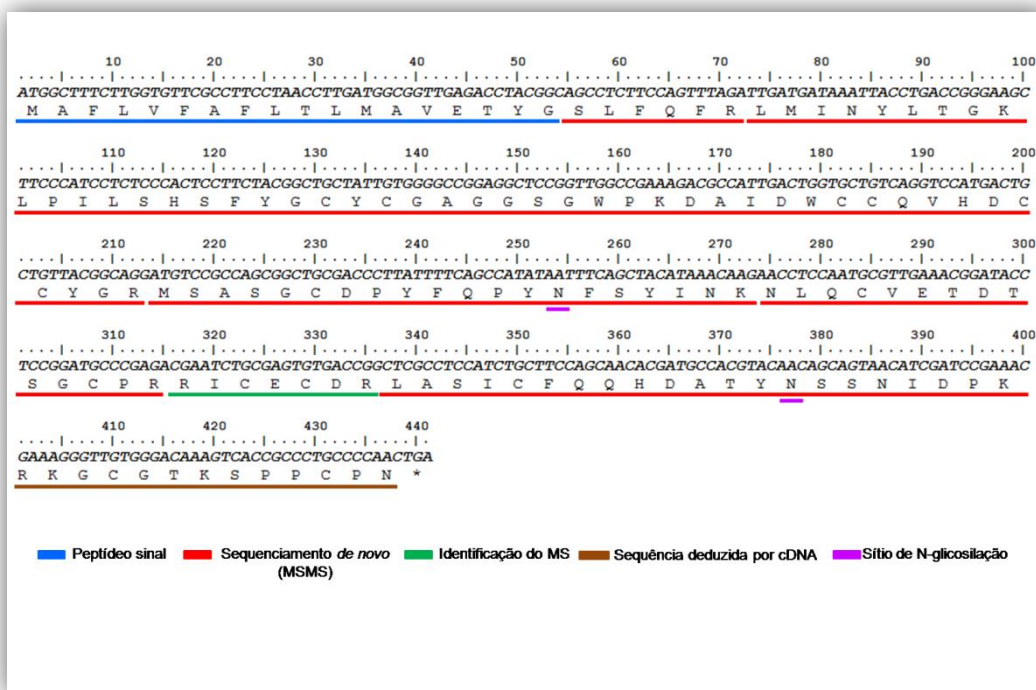


Figura 24 – Sequência aminoacídica completa da Pa-PLA₂ elucidada por técnicas de sequenciamento de cDNA e espectrometria de massa. Em itálico e no código de uma letra estão representados os nucleotídeos e os resíduos de aminoácidos, respectivamente. Linhas sólidas em azul, vermelho, verde e rosa, indicam a região do peptídeo sinal predita, sequências dos peptídeos trípticos e sítios putativos de N-glicosilação, respectivamente. Em marrom a sequência da região C-terminal deduzida pelo cálculo de diferença de massa experimental e teórica.

Observou-se que a sequência aminoacídica da Pa-PLA₂ contém 14 resíduos de cisteína estabilizados por sete ligações dissulfeto. Esta evidência pode ser observada no espectro de MS (ESI-QTOF-MS) cuja massa monoisotópica do grupo de íons mais intensamente detectados relacionado à Pa-PLA₂ reduzida/alquilada foi determinada como $[M + 8H]^{8+} = 2074,543$ Da que corresponde à massa molecular deconvoluída de 16588,344 Da. A diferença de massa entre as formas reduzida/alquilada e nativa equivale à massa de 14 resíduos de cisteínas S-alquiladas com iodoacetamida (Figura 25).

Mesmo após desnaturação da Pa-PLA₂ ainda são observados íons de baixa intensidade que sugerem a presença de isoformas da mesma cadeia polipeptídica com padrão de glicosilação semelhante.

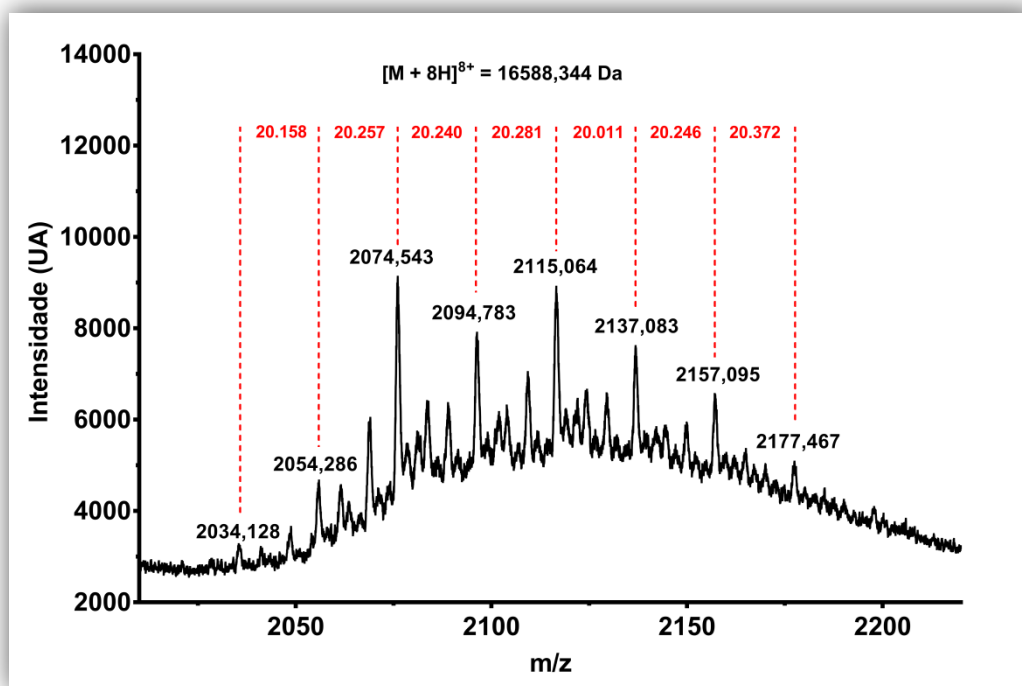


Figura 25 - Espectro de massa da Pa-PLA₂ glicosilada reduzida/alquilada, analisada por ESI-QTOF-MS. A massa determinada pelo íon $[M + 8H]^{8+} = 2074.543 \text{ Da}$ corresponde à massa molecular deconvoluída de 16588,344 Da. Erro de 1,4 ppm.

Pesquisas no banco de dados de proteínas não redundantes NCBI indicaram que a sequência de aminoácidos da Pa-PLA₂ madura compartilha graus significativos de identidade de aminoácidos com várias proteínas pertencentes à fosfolipase A₂ do grupo II. Entre elas, aquelas com as identidades maiores ($\geq 40\%$) foram as encontradas no grupo dos viperídeos (Figura 26).

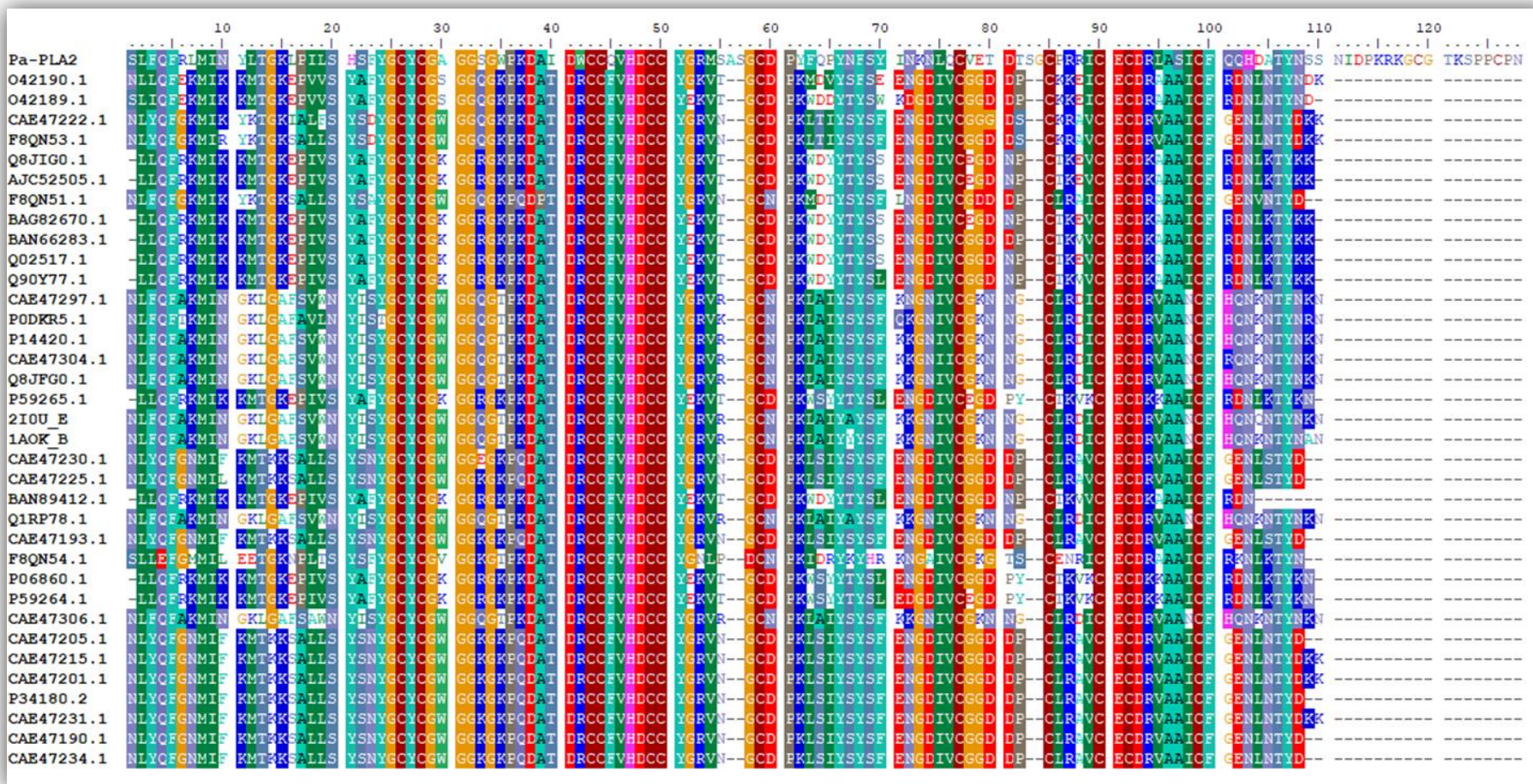


Figura 26 - Alinhamento múltiplo da sequência primária da Pa-PLA₂ com sequências de fosfolipase A₂ oriundas de viperídeos, indicando que a sequência aminoacídica da Pa-PLA₂ compartilha graus significativos de identidade de aminoácidos com várias proteínas pertencentes à fosfolipase A₂ do grupo II.

Uma vez obtida a sequência aminoacídica completa da proteína Pa-PLA₂ (Figura 24), inferiu-se a presença de dois sítios de N-glicosilação na cadeia polipeptídica da Pa-PLA₂ (Asn 67 e Asn 108) utilizando um algoritmo de predição de N-glicosilação (NetNGlyc 1.0 Server) e análises de espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS) da proteína antes e depois da deglicosilação em condições não desnaturantes (Figura 27), cujos resultados evidenciaram que a Pa-PLA₂ com menor grau de glicosilação apresenta em ambos os sítios o motivo de glicano GlcNAc₂Man (Figura 28). Enquanto a forma com maior grau de glicosilação resultante da contínua adição de resíduos de manose apresenta, em ambos os sítios de N-glicosilação, o motivo GlcNAc₂Man, bem como em outras combinações. Confirmação adicional dos sítios de N-glicosilação e das composições de glicnos N-ligados foi obtida pelo sequenciamento *de novo* dos glicopeptídeos trípticos (Figura 22 e Figura 23), que revelaram valores de massa molecular correspondentes aos motivos GlcNAc₂Man₅ e GlcNAc₂Man₃.

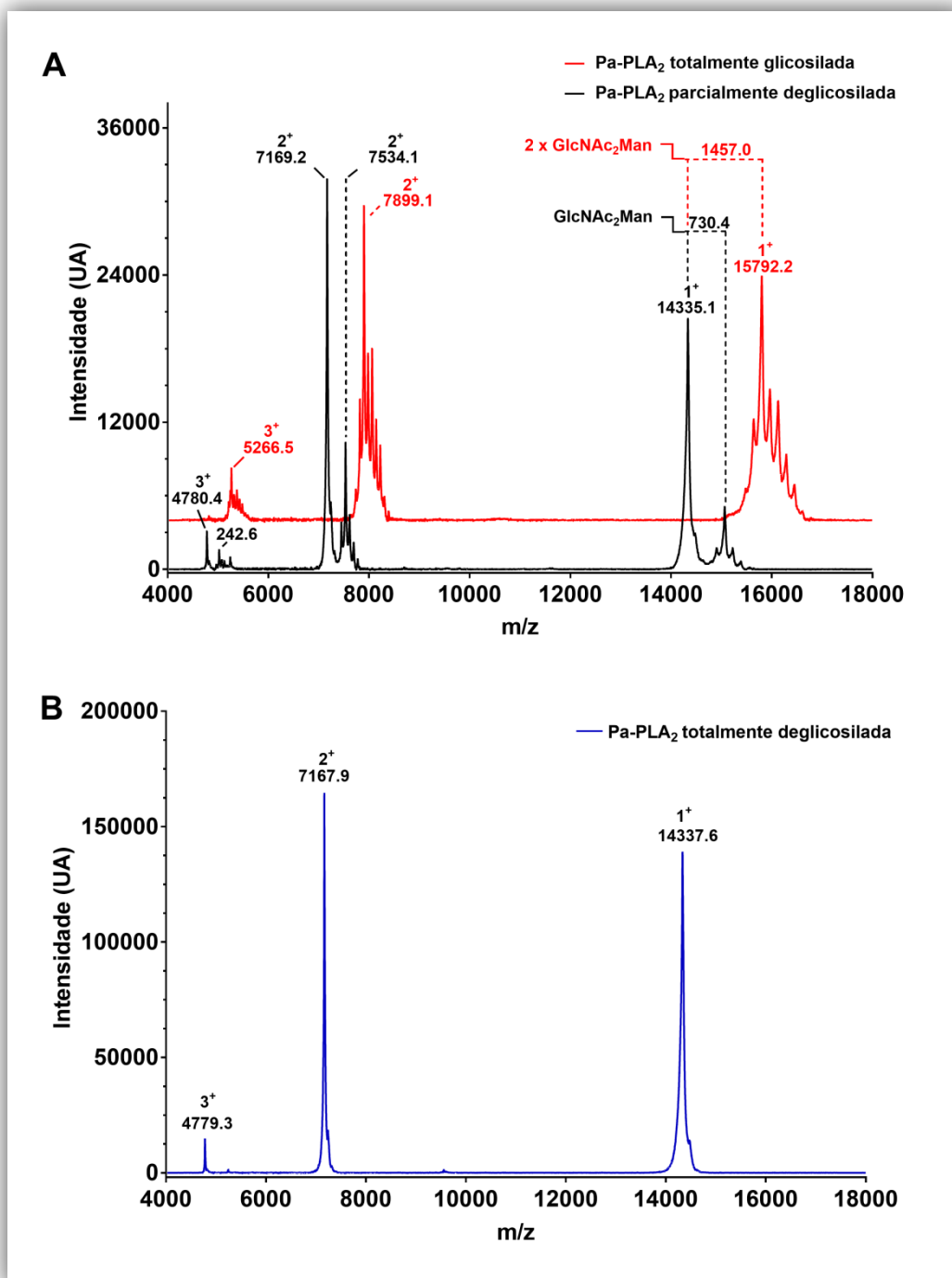


Figura 27 - Análises do perfil de glicosilação da Pa-PLA₂ (MALDI-TOF/MS). (A) Espectro de massa no modo linear da Pa-PLA₂ totalmente glicosilada (linha vermelha) e parcialmente deglicosilada (após 1 hora de incubação com PNGase F e A) (linha preta). (B) Espectro de massa obtido no modo linear da Pa-PLA₂ totalmente deglicosilada após 16 horas de incubação com PNGase-F e A.

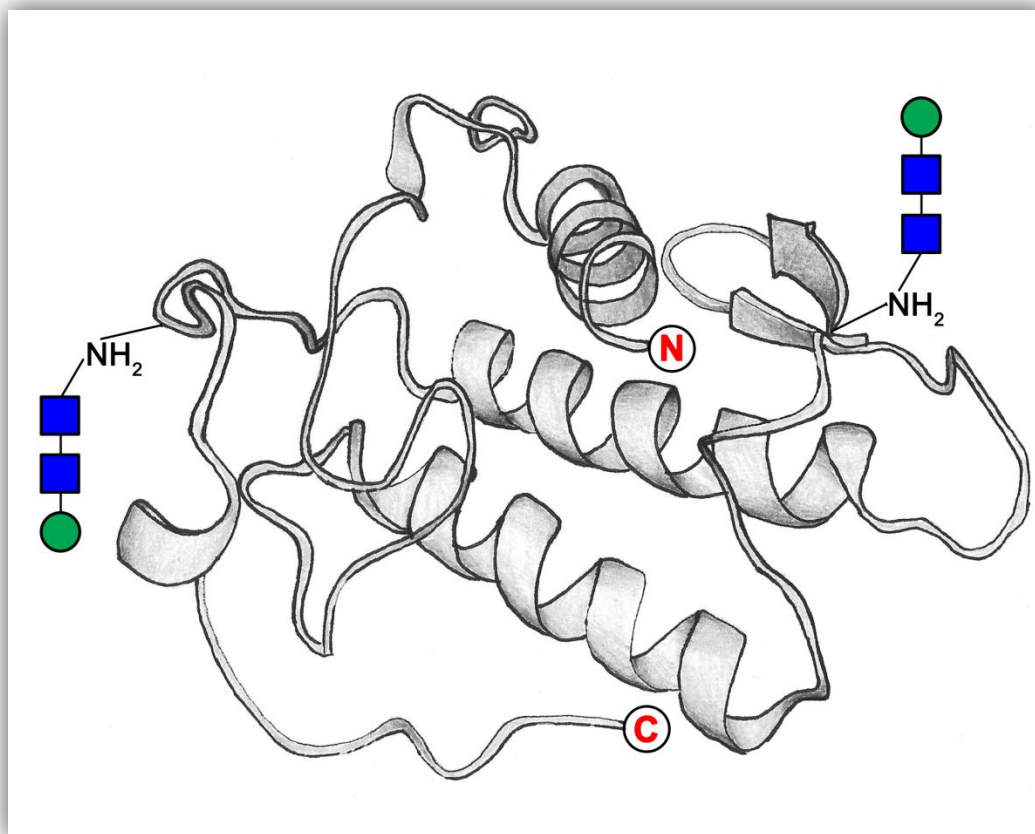


Figura 28 – Ilustração da Pa-PLA₂ com menor grau de glicosilação apresentando o motivo GlcNAc₂Man nos dois sítios de N-glicosilação. Ilustração: Aline Melro Murad, 2019.

6.1.6 Modelagem molecular da Pa-PLA₂

O relatório de qualidade do modelo molecular da Pa-PLA₂ mostra apenas seis resíduos em regiões não permitidas e 18 em regiões permitidas no gráfico de Ramachandran. Estes resíduos estão localizados em seção de *loop* e estão em uma posição exposta ao solvente (Figura 29). Nenhum impedimento estérico foi detectado. A sequência primária de Pa-PLA₂ mostra 60% de similaridade com a PLA₂ encontrada no veneno de *Agkistrodon halys* (Ah-PLA) (PDB:1JIA)⁸⁴ e demonstra um valor de RMSD-C α de 6.44 Å. Este valor é coerente com os grandes *loops* flexíveis presentes em ambas as estruturas (Figura 30A) e com a Pa-PLA₂ obtida após a submissão desta molécula à dinâmica molecular cuja estrutura criada é mais relaxada em comparação com a estrutura cristalina da Ah-PLA.

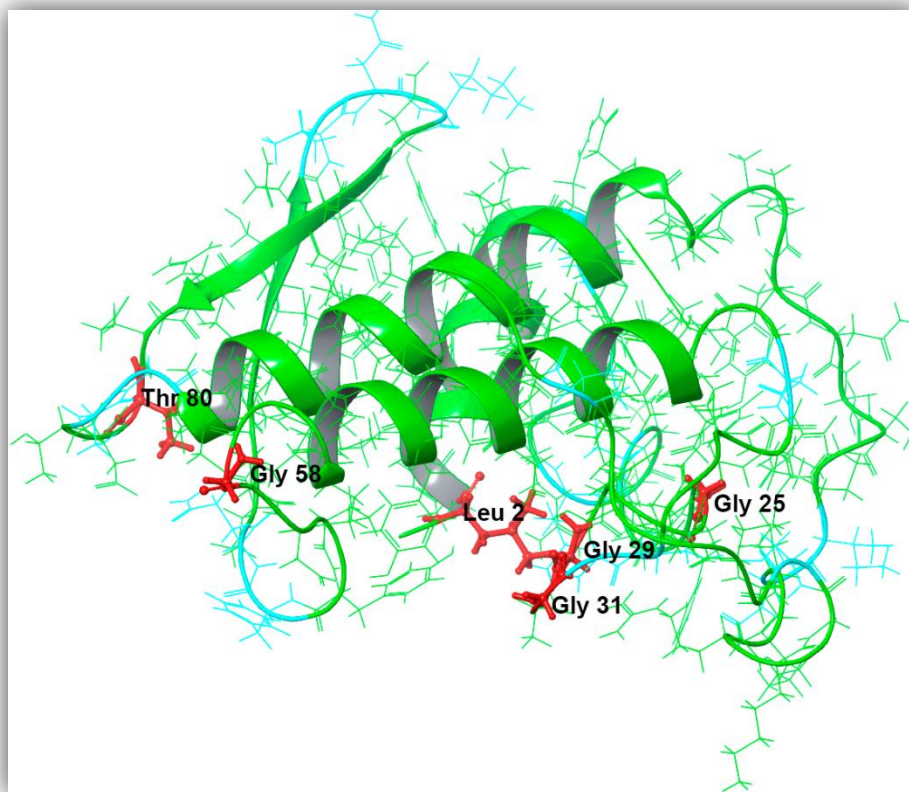


Figura 29 - Modelo tridimensional de Pa-PLA₂ indicando resíduos de aminoácidos em posições permitidas e não permitidas no gráfico de Ramachandran. Verde representa resíduos de aminoácidos em posição phi-psi favorável, em azul claro os resíduos na posição permitida e em vermelho resíduos no local não permitido.

A estrutura tridimensional de Pa-PLA₂ é constituída por três regiões de hélice: hélice 1 (He1) que parte do resíduo de aminoácido Phe 3 ao resíduo de Thr 13, hélice 2 (He2) do resíduo de Asp 41 a Ser 55 e hélice 3 (He3) do resíduo de Cys 85 a Gln 102; Uma folha β -wing (Bw1) que se inicia no resíduo de Asn 67 a Val 78 e 5 loops (Lo), Lo1 de Gly 14 a Ile 40, Lo2 de Ala 56 a Tyr 66, Lo3 de Ile 71 a Asn 74, Lo4 de Glu 79 a Gly 84 e Lo5 do resíduo His 103 a Asn 130 (Figura 31).

Sete ligações dissulfeto estabilizam regiões importantes da Pa-PLA₂: Cys 56 - Cys 85, Cys 50 - Cys 92 e Cys 43 - Cys 99 preservam as estruturas de He2 e He3 que contêm a bolsa catalítica; Cys 77 - Cys 90 restringe Bw1 a He3; e as restantes ligações dissulfeto Cys 26 - Cys 121 e Cys 49 - Cys 128 bloqueiam Lo5 a He2 e Lo1 enquanto Cys 28 - Cys 44 bloqueia Lo1 a He2 forçando uma porção do Lo1 (Gly 29 para Ala 39) a moldar uma bolsa onde localiza-se um íon de cálcio (Figura 30 B). Adicionalmente, a

Pa-PLA₂ apresenta dois sítios de N-glicosilação nos resíduos Asn 67 localizado no início de Bw1 e Asn 108 no meio de Lo5. Um sítio putativo de N-glicosilação também foi encontrado em Ah-PLA no resíduo Asn 70 fixado no Lo3 (Figura 30 A).

O *loop* de ligação ao cálcio é formado por uma interação do íon Ca²⁺ com a cadeia lateral de Asp 48 e com oxigênio da carboxila dos resíduos Tyr 27, Gly 29, Gly 31 e com quatro moléculas de água. A díade His/Asp do sítio ativo da Pa-PLA₂ é conservada em comparação com outras PLA₂s (Figura 31).

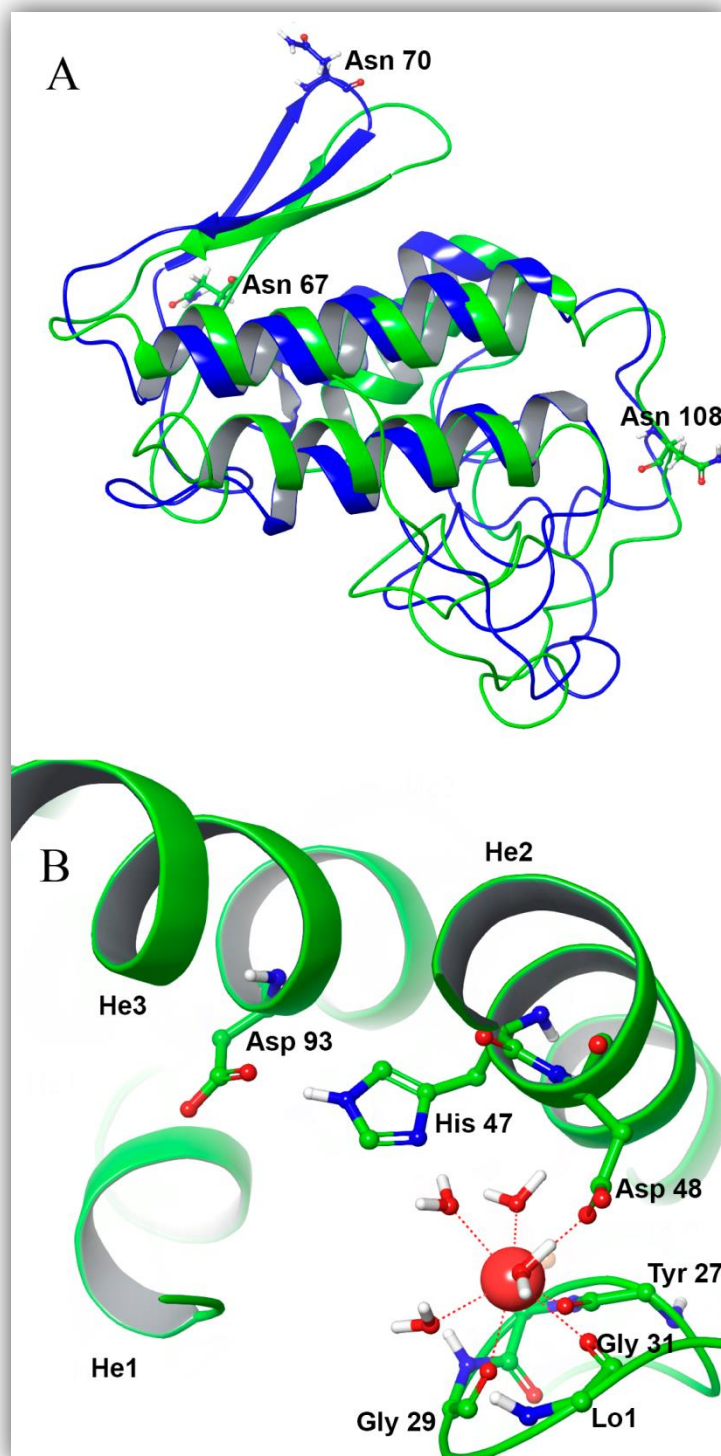


Figura 30 - Modelagem de homologia da estrutura tridimensional predita da Pa-PLA₂. (A) Superposição da estrutura do modelo Pa-PLA₂ (verde) com a estrutura cristalina do Ah-PLA (azul). Asn 67, Asn 108 e Asn 70 são os sítios putativos de N-glicosilação encontrados em Pa-PLA₂ e Ah-PLA, respectivamente. (B) Visão detalhada do sítio catalítico da Pa-PLA₂, mostrando a díade His 47/Asp 48 e a molécula de água como um nucleófilo. Esfera vermelha representa o íon Ca²⁺.

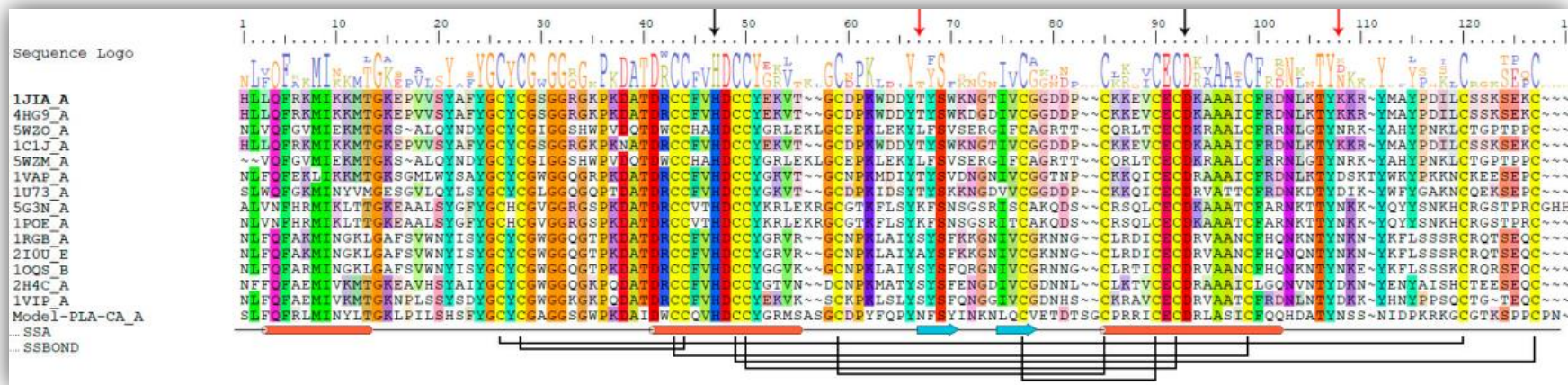


Figura 31 - Alinhamento primário de sequência de PLA₂s usado para modelagem molecular. As sequências alinhadas estão representadas pelos códigos de acesso no banco de sequências (PDB). SSA significa atribuição de estrutura secundária onde os cilindros laranja (parte inferior da figura) representam as α -hélices e as setas azuis indicam as folhas β . SSBOND representa ligações dissulfeto entre resíduos de cisteína. As setas pretas (parte superior da figura) mostram resíduos catalíticos conservados da díade catalítica, histidina e ácido aspártico, enquanto as setas vermelhas (parte superior da figura) apontam para os sítios de N-glicosilação encontrados na Pa-PLA₂.

6.2 Resultado do estudo realizado com *Phyllomedusa tarsius*

6.2.1 Fracionamento da secreção cutânea de *Phyllomedusa tarsius*

A cromatografia líquida de fase reversa do extrato bruto da secreção cutânea de *P. tarsius* resultou na separação e identificação de vários compostos (dados não publicados). A atividade de fosfolipase A₂ foi detectada (subitem 6.2.2) em uma fração heterogênea (G04) eluída entre 35 e 40 minutos (Figura 32 A). Os compostos presentes em G04 foram submetidos à etapa adicional de separação, resultando em 16 frações (Figura 32 B).

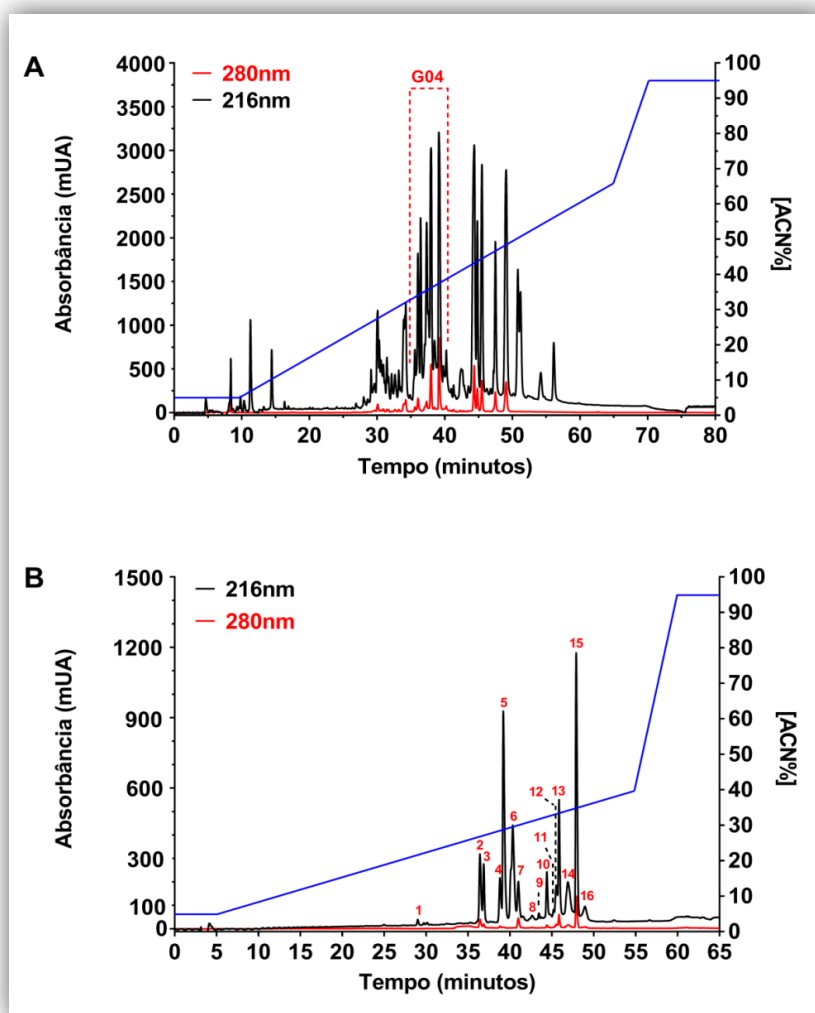


Figura 32 - Cromatogramas das etapas de purificação das fosfolipases A₂ da secreção cutânea de *P. tarsius*. (A) Perfil semipreparativo do extrato total de *P. tarsius*. (B) Fração heterogênea (G04) eluída entre 25 a 50 minutos em gradiente linear de 5 – 40% de ACN.

6.2.2 Teste de atividade fosfolipásica

Foi detectada atividade fosfolipásica nas frações 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 (Figura 32 B). A atividade foi determinada pela incubação direta das frações nativas com o fosfolipídeo dimeristoilfosfatidilcolina (DMPC) de massa molecular $[M + H]^+ = 678,5$ Da e $[M + Na]^+ = 700,4$ Da (Figura 33 A). A atividade de PLA₂ sobre o DMPC foi confirmada pela detecção dos íons: $[M + H]^+ = 468,3$ Da, $[M + Na]^+ = 490,3$ Da correspondente ao ácido lisofosfatídico e $[M + H]^+ = 409,0$ e $[M + Na]^+ = 431,2$ Da correspondente ao ácido lisofosfatídico com perda do grupo metilamina por uma clivagem heterolítica no espectrômetro de massa (Figura 33 C - K). Os demais íons encontrados nos espectros não foram determinados e podem ser oriundos de outros compostos presentes nas frações.

Componentes idênticos foram obtidos quando alíquotas do veneno liofilizado de *Bothrops moojeni* (controle positivo) foram incubadas com DMPC nas mesmas condições experimentais (Figura 33 B).

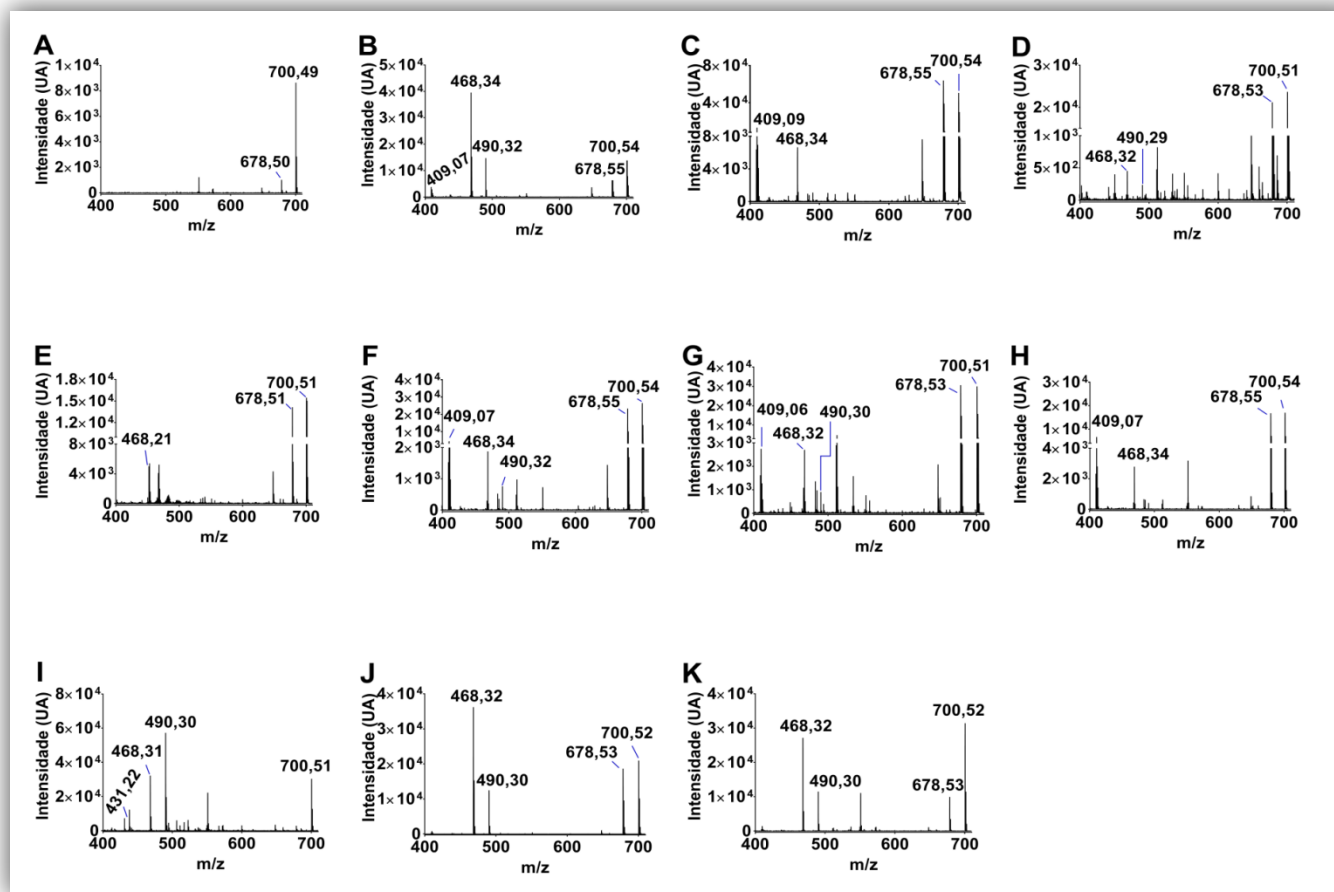


Figura 33 – Análise de espectrometria de massa por MALDI-TOF-MS do ensaio de atividade de fosfolipase A_2 das sPLA $_2$ s sobre DMPC em tampão PBS. (A) Espectro de massa relativo à avaliação da integridade de DMPC na ausência de qualquer atividade de fosfolipase (controle negativo). Espectros de massa relativo à avaliação da integridade de DMPC após incubação (15 min) com veneno de *B. moojeni* (controle positivo) (B) e PLA $_2$ s da secreção cutânea (C a K), indicando uma clivagem enzimática do DMPC em todos os casos.

6.2.3 Determinação da massa molecular

Os compostos presentes nas frações que apresentaram atividade fosfolipásica tiveram suas massas determinadas por MALDI-TOF-MS em modo linear (Figura 34). Foram observados diferentes valores de m/z que podem representar as mesmas moléculas em distintos estados de cargas. Além disso, foram observadas nas frações 10, 12 e 14 íons com razão m/z acima de 20000, indicando possíveis agregações ou estruturas dimerizadas (Figura 35).

Contudo, devido à heterogeneidade nessas frações considera-se a possibilidade destas massas moleculares mais elevadas representarem também outros compostos presentes na secreção cutânea da *P. tarsius*.

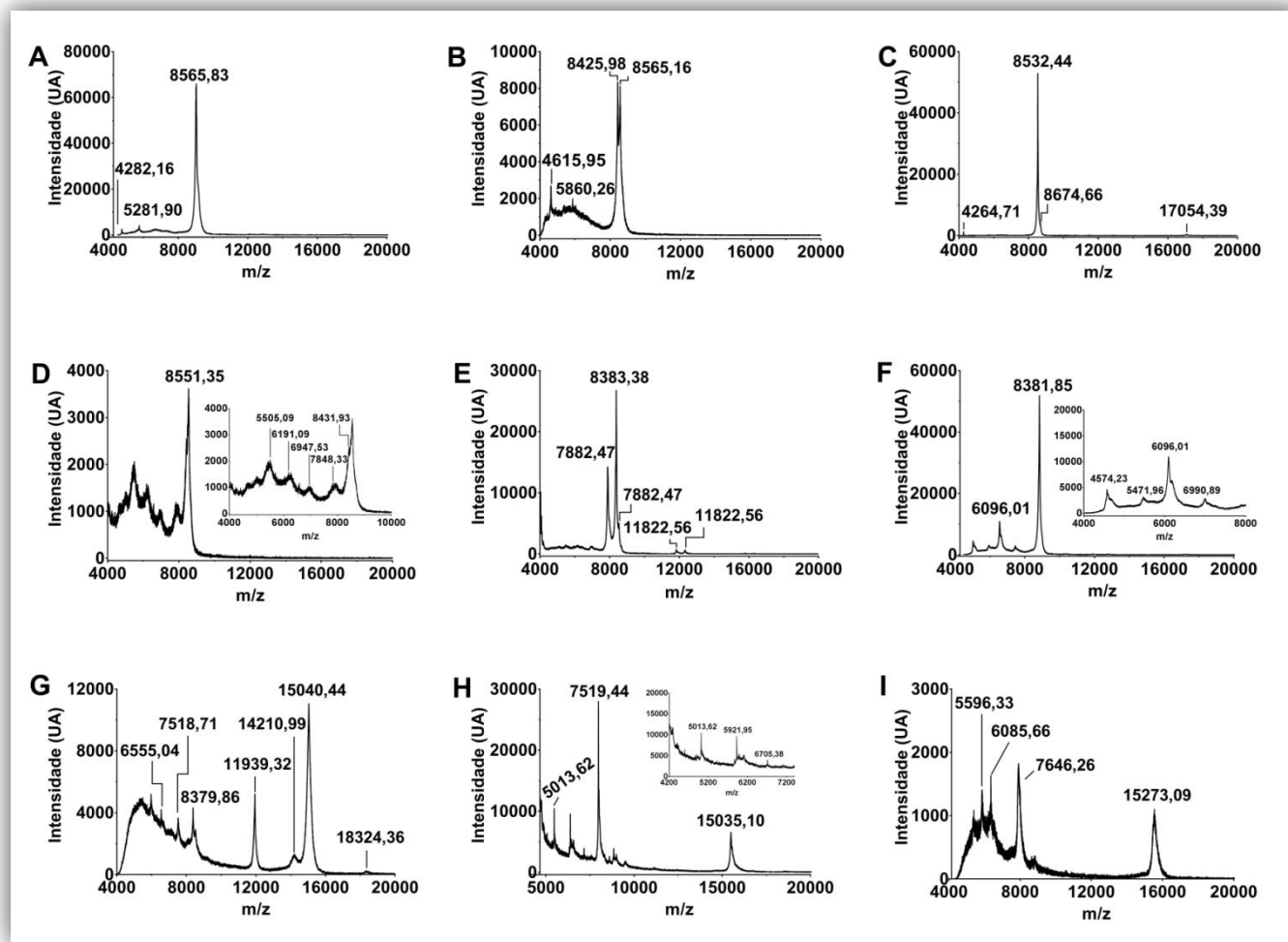


Figura 34 - Espectros de massa adquiridos em modo linear positivo por MALDI-TOF-MS na faixa de m/z de 4000 a 20000. Em ordem, da figura A – I estão representadas, respectivamente, as frações 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, e 16, oriundas da G04.

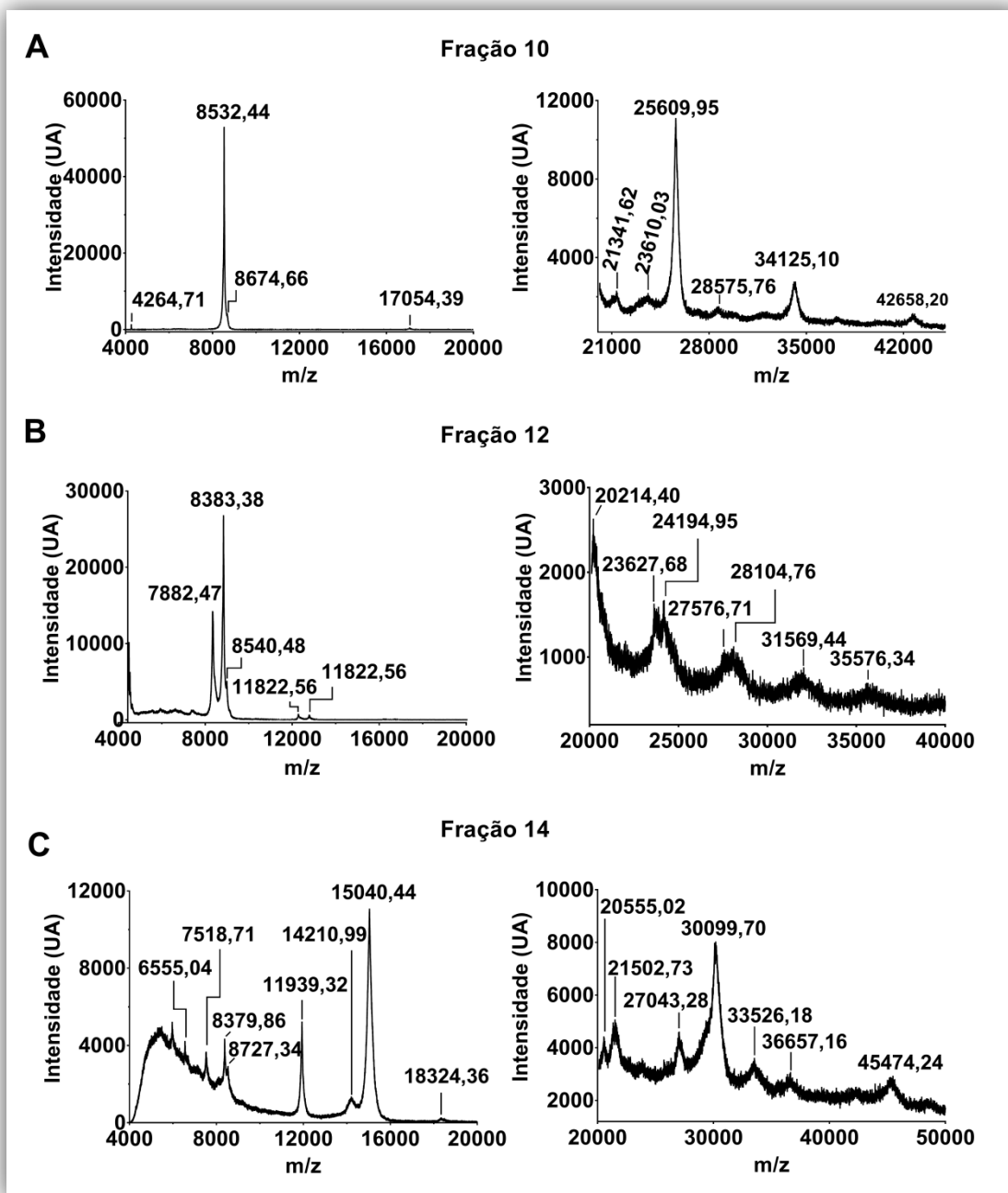


Figura 35 - Espectros de massa adquiridos em modo linear positivo por MALDI-TOF-MS nas faixas de m/z entre 4000 a 20000 (espectros ao lado esquerdo) e entre 20000 a 100000 (espectros ao lado direito). Em ordem, estão representados, respectivamente, os espectros das frações 10, 12 e 14.

6.2.4 Identificação de N-glicanos da secreção cutânea de *P. tarsius*

A análise por MALDI-TOF-MS em modo refletido dos N-glicanos livres oriundos da secreção cutânea de *P. tarsius* após tratamento com PNGase-F e A revelou a presença de diferentes motivos de glicanos visualizados no espectro com íons em distintos estados de cargas (Figura 36). Suas identificações foram assumidas com base na precisão das massas obtidas apenas do espectro de MS.

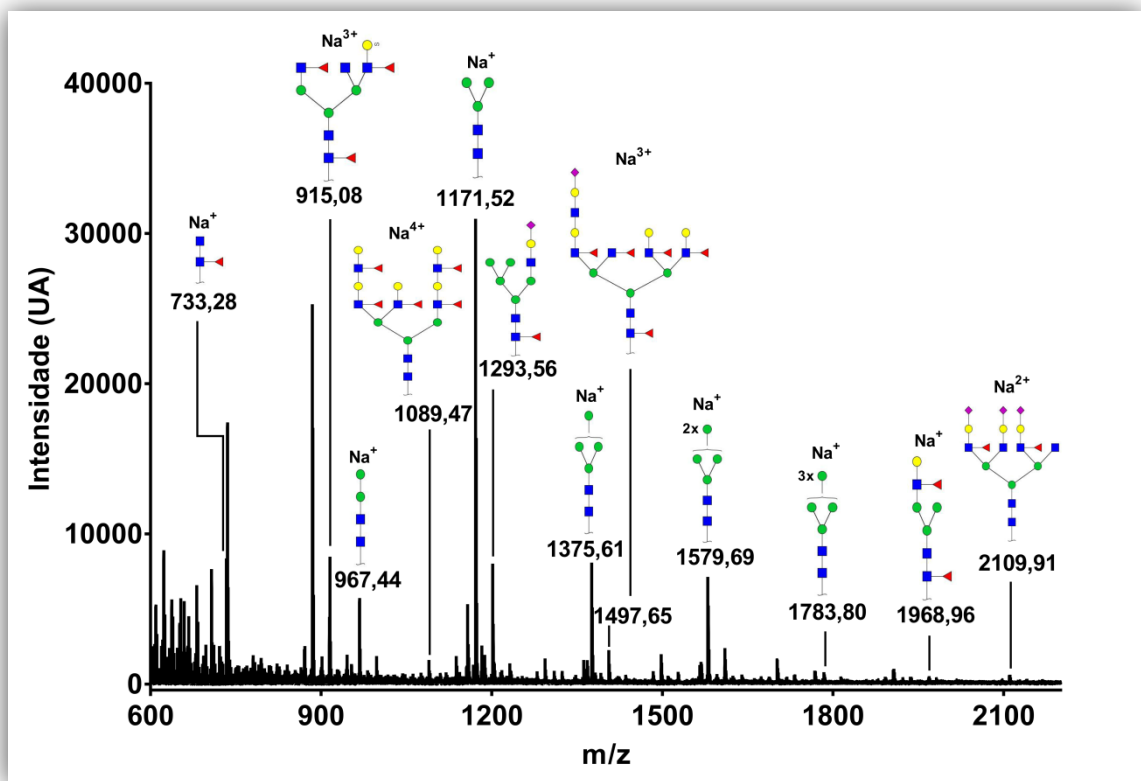


Figura 36 - Identificação dos N-glicanos liberados da secreção cutânea de *P. tarsius* tratada com PNGase F e A. Espectro de MS mostrando os íons sodiados com diferentes cargas que permitiram identificar diversos motivos de glicanos.

6.2.5 Sequenciamento de cDNA

A análise do sequenciamento do cDNA resultou na identificação de duas isoformas de fosfolipases A₂ denominadas Pht-PLA₂-01 e Pht-PLA₂-02 que contêm em suas estruturas maduras 127 e 128 resíduos de aminoácidos, respectivamente (Figura 37). O peptídeo sinal foi predito pelo algoritmo de predição SignalP-5.0 Server e a partir do

alinhamento destas seqüências com outras seqüências de fosfolipases depositada no banco de dados.

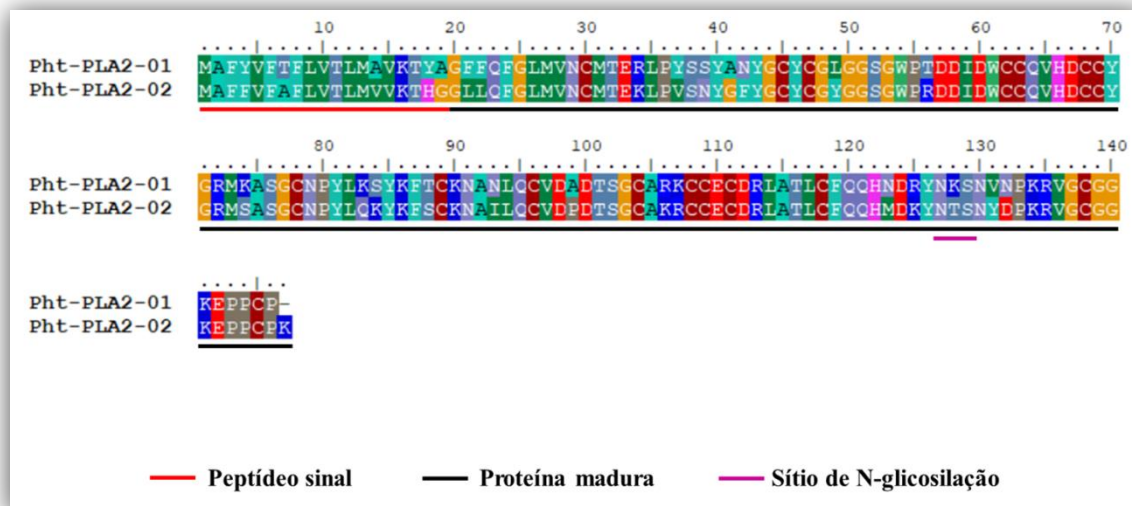


Figura 37 – Seqüência aminoacídica completa das fosfolipases Pht-PLA₂-01 e Pht-PLA₂-02 elucidada por sequenciamento de cDNA. Linhas sólidas em vermelho, preto e rosa indicam a região predita do peptídeo sinal, proteína madura e sítio de N-glicosilação, respectivamente.

Ambas as PLA₂s apresentam em sua estrutura madura 17 resíduos de cisteína, um sítio putativo de N-glicosilação (Asn 107) e compartilham entre si 82% e 88% de identidade e similaridade, respectivamente.

Foi realizada uma busca no banco de dados de proteínas não redundantes do NCBI por seqüências de fosfolipases de répteis (ordem Squamata) e foram selecionadas e alinhadas às seqüências das PLA₂s identificadas àquelas cuja identidade é $\geq 40\%$ (Tabela 4). Algumas fosfolipases oriundas de serpentes atenderam este critério (Figura 38 A e B). Também foram alinhadas fosfolipases preditas do genoma de *Xenopus laevis* e *Xenopus tropicalis*, além da fosfolipase Pa-PLA₂ da espécie *Pithecopus azureus* (Figura 38 C).

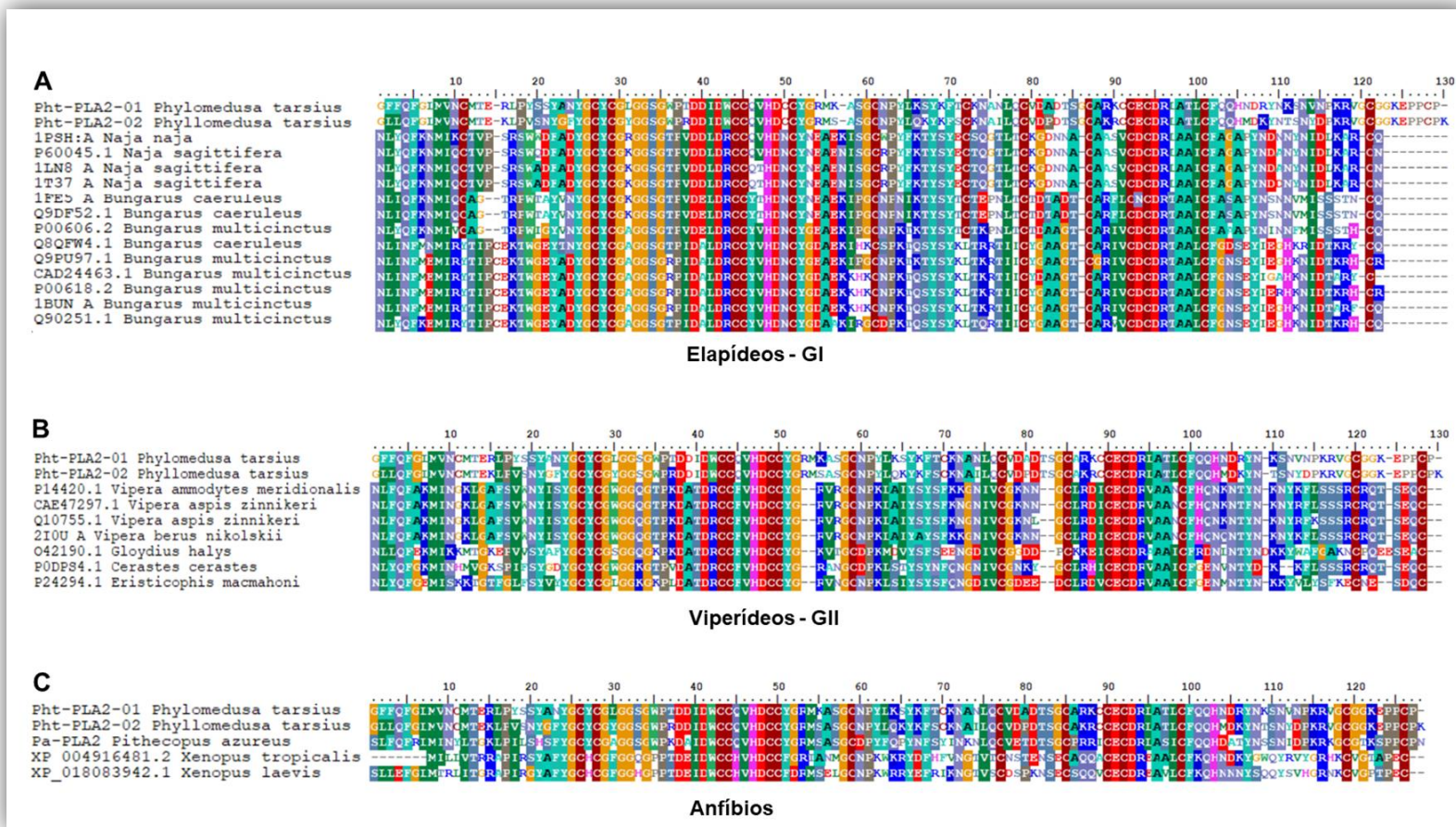


Figura 38 - Alinhamento múltiplo das seqüências aminoácidas das PLA₂s (Pht-PLA₂-01 e Pht-PLA₂-02) de *Phyllomedusa tarsius* com seqüências de fosfolipases A₂ oriundas de serpentes e de anfíbios. As seqüências estão identificadas com o código de acesso no NCBI seguidas do nome das espécies de origem. As fosfolipases A₂ desse estudo ainda não têm um código de acesso atribuído.

Tabela 4 – Valores de identidade de similaridade de PLA₂s alinhadas com Pht-PLA₂-01 e Pht-PLA₂-02.

Código de acesso	PLA ₂ s alinhadas	Pht-PLA ₂ -01		Pht-PLA ₂ -02	
		Identidade	Similaridade	Identidade	Similaridade
s/c	Pht-PLA ₂ -02	82%	88%	-----	-----
C0HLL2	Pa-PLA ₂	68%	78%	70%	79%
XP 004916481.2	<i>Xenopus tropicalis</i>	51%	60%	48%	62%
XP 018083942.1	<i>Xenopus laevis</i>	48%	60%	49%	63%
P14420.1	<i>Vipera ammodytes meridionalis</i>	48%	59%	48%	58%
CAE47297.1	<i>Vipera aspis zinnikeri</i>	48%	60%	48%	59%
Q10755.1	<i>Vipera aspis zinnikeri</i>	48%	60%	49%	58%
2I0U_A	<i>Vipera berus nikolskii</i>	48%	59%	48%	59%
O42190.1	<i>Gloydus halys</i>	47%	60%	50%	63%
PODPS4.1	<i>Cerastes cerastes</i>	47%	63%	46%	62%
P24294.1	<i>Eristicophis macmahoni</i>	48%	61%	48%	63%
1PSH	<i>Naja naja</i>	45%	56%	45%	54%
P60045.1	<i>Naja sagittifera</i>	46%	57%	45%	55%
1LN8_A	<i>Naja sagittifera</i>	45%	57%	44%	55%
1T37_A	<i>Naja sagittifera</i>	45%	56%	44%	55%
1FE5_A	<i>Bungarus caeruleus</i>	50%	60%	42%	55%
Q9DF52.1	<i>Bungarus caeruleus</i>	50%	61%	42%	55%
P00606.2	<i>Bungarus multicinctus</i>	53%	63%	44%	55%
Q8QFW4.1	<i>Bungarus caeruleus</i>	43%	52%	41%	46%
Q9PU97.1	<i>Bungarus multicinctus</i>	45%	55%	42%	48%
CAD24463.1	<i>Bungarus multicinctus</i>	45%	54%	48%	53%
P00618.2	<i>Bungarus multicinctus</i>	45%	54%	43%	47%
1BUN_A	<i>Bungarus multicinctus</i>	44%	53%	42%	46%
Q90251.1	<i>Bungarus multicinctus</i>	41%	51%	39%	47%

(----) Mesmos valores presentes nas colunas 3 e 4. (s/c) Fosfolipases sem código de acesso.

6.2.6 Determinação estrutural das Pht-PLA₂s detectadas na secreção cutânea

Considerando as massas teóricas das sequências maduras das Pht-PLA₂s, as massas experimentais detectadas nas nove frações com atividade fosfolipásica e as massas dos distintos motivos de glicanos identificados, foram realizados cálculos teóricos combinando estas informações a fim de inferir a caracterização estrutural das fosfolipases presentes na secreção cutânea de *P. tarsi*.

Como resultado destes cálculos, identificamos que a Pht-PLA₂-01 está presente na fração 15 (Figura 32 B) na forma glicosilada com o motivo de glicano GlcNAc₂Man₃ (Figura 39). A massa média teórica desta estrutura (15030,70 Da) foi resultante de cálculos considerando todos os resíduos de cisteína oxidados, incluindo um resíduo extra de cisteína presente em ambas as Pht-PLA₂s, o qual pode estar ligado por ligação dissulfeto à outra

molécula, formando possivelmente uma estrutura dimérica. Entretanto, considera-se também a possibilidade deste resíduo extra estar reduzido, e, nesse caso, as massas teóricas ganhariam um acréscimo de 1,008 Da, referente ao próton de H do grupo SH.

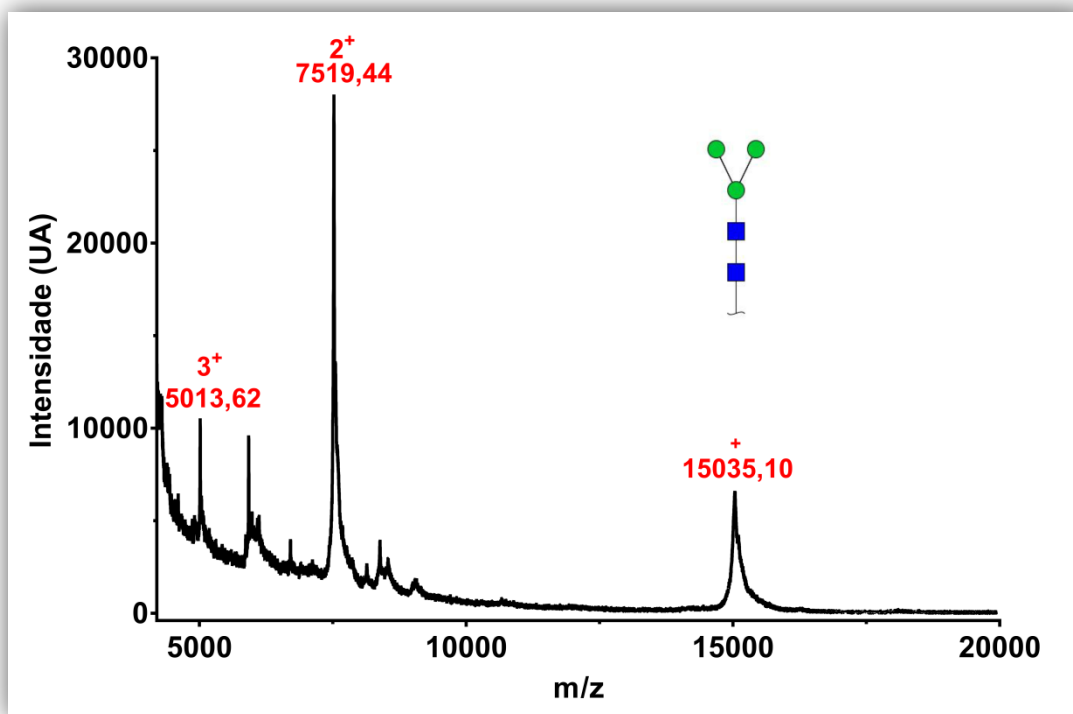


Figura 39 – Espectro de massa da fração 15 adquirido em modo linear positivo por MALDI-TOF-MS na faixa de m/z entre 4000 a 20000. Três íons são identificados como correspondentes à fosfolipase Pht-PLA₂-01 em três estados de carga: $[M + H]^+ = 15035,10$ Da, $[M + 2H]^{2+} = 7519,44$ Da e $[M + 3H]^{3+} = 5013,62$ Da. Os erros em daltons entre os valores experimentais e os teóricos são, respectivamente: 4,40; 4,09; 3,38 e estão dentro dos limites da análise realizada em modo linear em MALDI-TOF/MS.

A massa molecular média teórica da Pht-PLA₂-01 deglicosilada (14137,89 Da) não foi encontrada/detectada em nenhum espectro das nove frações que apresentaram atividade fosfolipásica. Da mesma forma, não foi encontrado/detectado nenhum íon com m/z correspondente à Pht-PLA₂-02 deglicosilada e glicosilada.

6.2.7 Imageamento do tecido epitelial de *P. tarsius* (MALDI-imaging)

A varredura por MALDI-imaging foi realizada em fragmentos do tecido epitelial de todo o corpo do animal, contudo, somente nos fragmentos das regiões do braço, fêmur e ventre foram encontrados íons com m/z equivalente à Pht-PLA₂-01 N-glicosilada.

6.2.7.1 Tecido epitelial da região braçal

O espectro médio global adquirido após varredura do tecido cutâneo da região braçal mostra vários íons entre a faixa de m/z entre 4000 a 20000. Destes íons, apenas três foram selecionados pela correspondência com Pht-PLA₂-01: $[M + H]^+ = 15030,28$ Da, $[M + H]^+ = 15187,05$ Da e $[M + 2H]^{2+} = 7512,67$ Da (Figura 40).

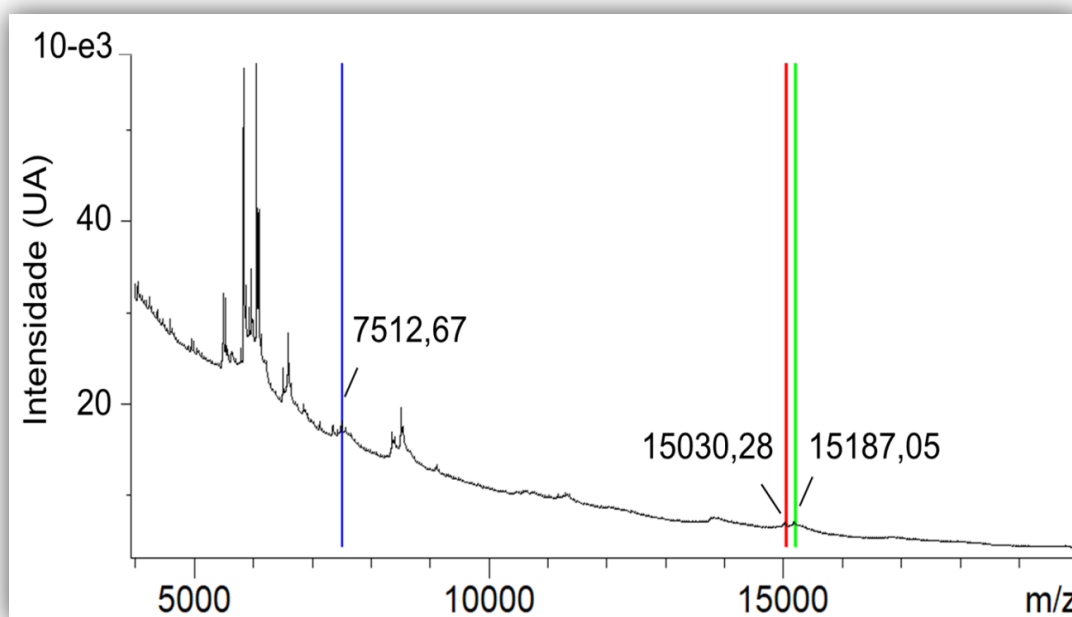


Figura 40 – Espectro de massa global dos íons detectados na pele da região braçal de *P. tarsius*. Os filtros de cores mostram os íons selecionados correspondentes à Pht-PLA₂-01.

O íon $[M + H]^+ = 15030,28$ Da está distribuído por toda a região analisada, com maior intensidade na parte anterior da pele. A escala de cor mostra o grau de intensidade do íon em

cada área onde a molécula foi detectada (Figura 41 A). Nas regiões mais claras foram analisados os espectros gerados em cada ponto de 200 μm (FlexAnalysis, Bruker Daltonics - German), a partir dos quais foi possível confirmar a real presença desta molécula no ponto analisado. Nesse espectro, o íon $[\text{M} + \text{H}]^+ = 15031,28 \text{ Da}$ detectado tem correspondência com a massa molecular calculada para a Pht-PLA₂-01 glicosilada com o motivo GlcNAc₂Man₃ (erro de 0,58 Da) (Figura 41 B).

Ampliando a região de m/z de 15000 é possível observar também a presença de outros íons que podem indicar isoformas desta fosfolipase em diferentes graus de glicosilação. O íon $[\text{M} + \text{H}]^+ = 15193,43 \text{ Da}$ ($\pm 0,59 \text{ Da}$) corresponderia à Pht-PLA₂-01 N-ligada ao motivo GlcNAc₂Man₄ e o íon $[\text{M} + \text{H}]^+ = 15357,03 \text{ Da}$ ($\pm 2,05 \text{ Da}$) corresponderia à proteína N-ligada ao motivo GlcNAc₂Man₅ (Figura 41 B, inserção).

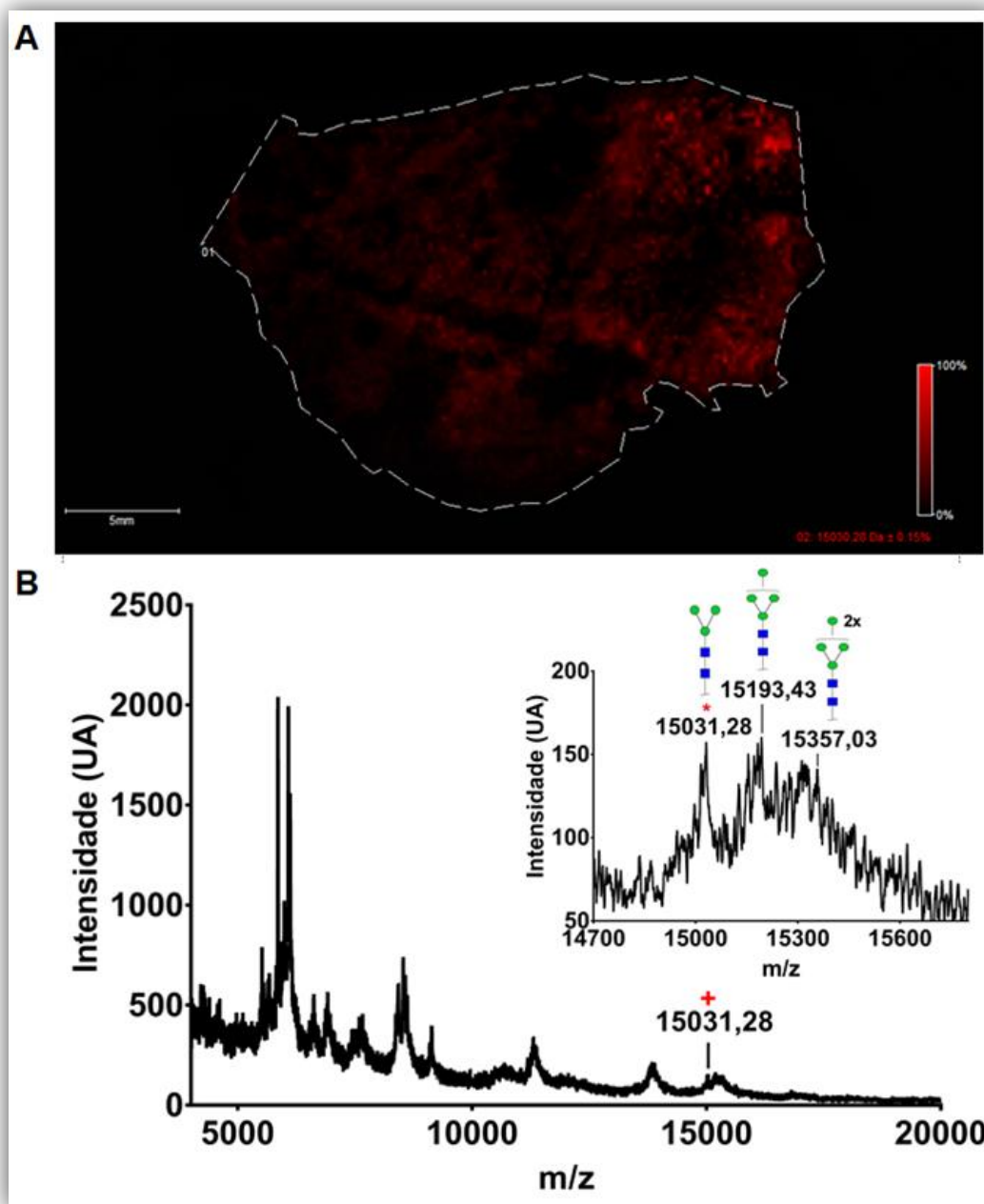


Figura 41 – Análises de MALDI-*imaging* da pele da região do braço de *P. tarsius*. (A) Imagem em cores mostrando a distribuição dos íons de valores m/z de 15000. Quanto mais clara a cor, maior a intensidade dos íons naquela região, conforme observado na barra de intensidade no canto inferior direito. (B) Espectro de massa oriundo das regiões mais claras na imagem. Nele é observado o íon $[M + H]^+ = 15031,28$ Da referente à Pht-PLA₂-01 glicosilada com o motivo GlcNAc₂Man₃ e os demais íons ($[M + H]^+ = 15193,43$ Da e $[M + H]^+ = 15357,03$ Da) referentes à mesma fosfolipase com graus diferentes de glicosilação (Inserção). O símbolo “chave” seguido de outros resíduos de manose significa que não se sabe a posição correta onde estes resíduos ligam-se. A numeração acima do resíduo (x2) representa a quantidade de resíduos ligados à estrutura GlcNAc₂Man₃.

Os valores de m/z dos íons no espectro global referem-se à média dos íons detectados no tecido analisado, e, portanto, diferem dos valores m/z dos íons presentes nos espectros de cada local analisado. Esta diferença deve-se ao fato da pele não ser uniforme em toda sua extensão, alterando o tempo de voo de cada molécula ionizada e causando variações de m/z entre os mesmos compostos. Esta informação vale para todas as análises feitas por MALDI-*imaging*.

O íon $[M + 2H]^{2+} = 7512,76$ Da da mesma forma que o íon monocarregado, se distribui por toda a pele analisada, sendo mais intenso na parte anterior (Figura 42 A). O espectro das regiões de maior intensidade mostra a Pht-PLA₂-01 mono e duplamente carregada (Figura 42 B).

Ampliando a região de m/z de 7000 é possível observar também outros íons que indicam isoformas semelhantes às observadas no perfil dos íons de m/z de 15000. Contudo, uma isoforma com motivo de glicano contendo apenas duas manoses (GlcNAc₂Man₂) é observada somente neste espectro (Figura 42 B, inserção). Os erros correspondentes a cada íon assinalado são, respectivamente: 3,72 Da; 1,89 Da; 3,55 Da; 1,05 Da.

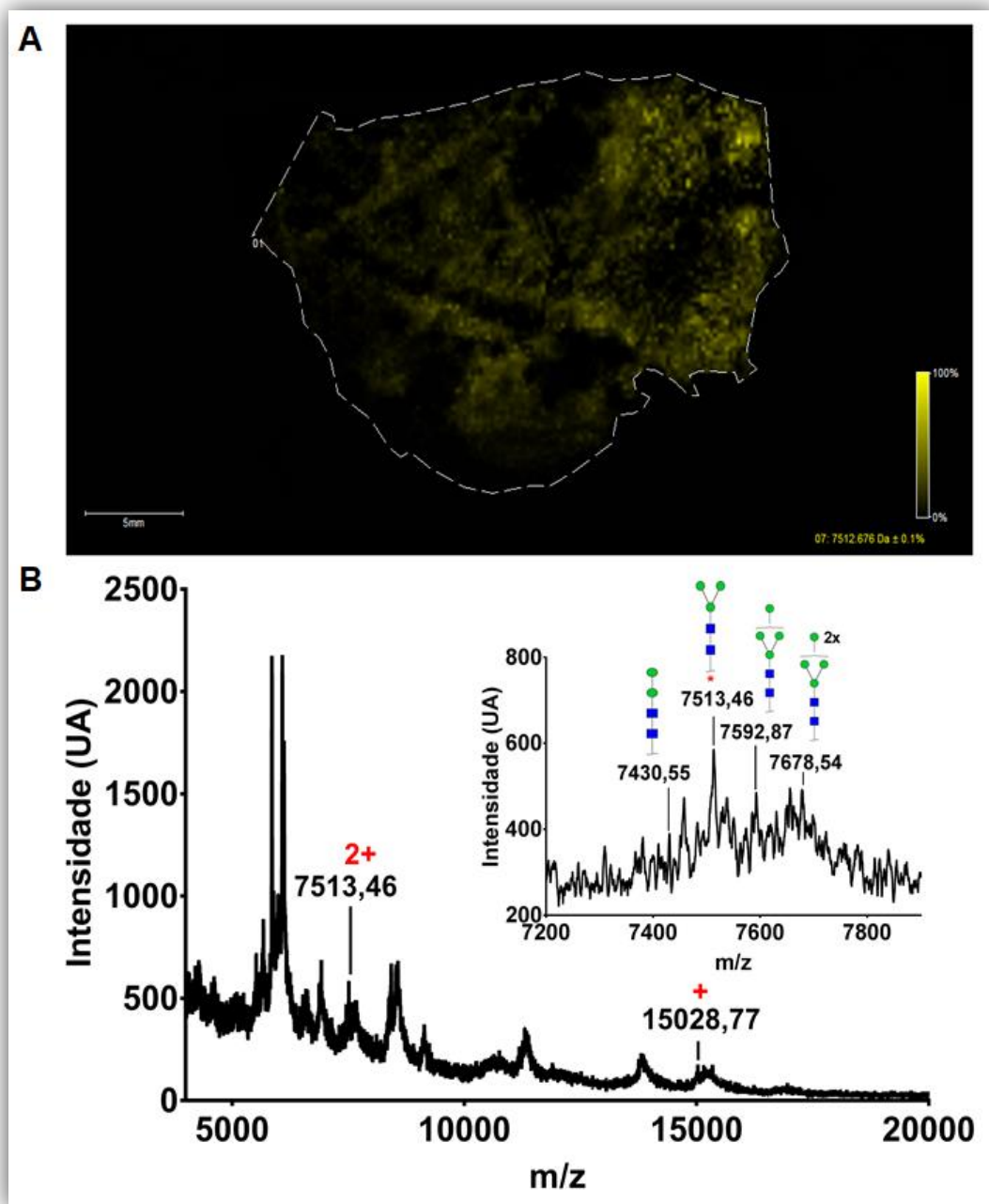


Figura 42- Análises de MALDI-*imaging* da pele da região do braço de *P. tarsius*. (A) Imagem em cores mostrando a distribuição do íon $[M + 2H]^{2+} = 7512,76$ Da detectado. (B) Espectro de massa oriundo das regiões mais claras na imagem onde são observados outros íons referentes à mesma fosfolipase com graus diferentes de glicosilação (Inserção). O símbolo “chave” seguido de outros resíduos de manose significa que não se sabe a posição correta onde estes resíduos ligam-se. A numeração acima do resíduo (x2) representa a quantidade de resíduos ligados à estrutura $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$.

O perfil de distribuição dos íons $[M + 2H]^{2+} = 7512,76$ Da e $[M + H]^+ = 15031,28$ Da mostra que ambos estão co-localizados em toda a região da pele analisada (Figura 43 A). O mesmo perfil de distribuição e co-localização é observado para o íon $[M + H]^+ = 15187,05$ Da (Figura 43 B), muito provavelmente corresponde ao íon $[M + H]^+ = 15193,43$ Da ($\pm 6,38$ Da) analisado anteriormente (Figura 41, inserção).

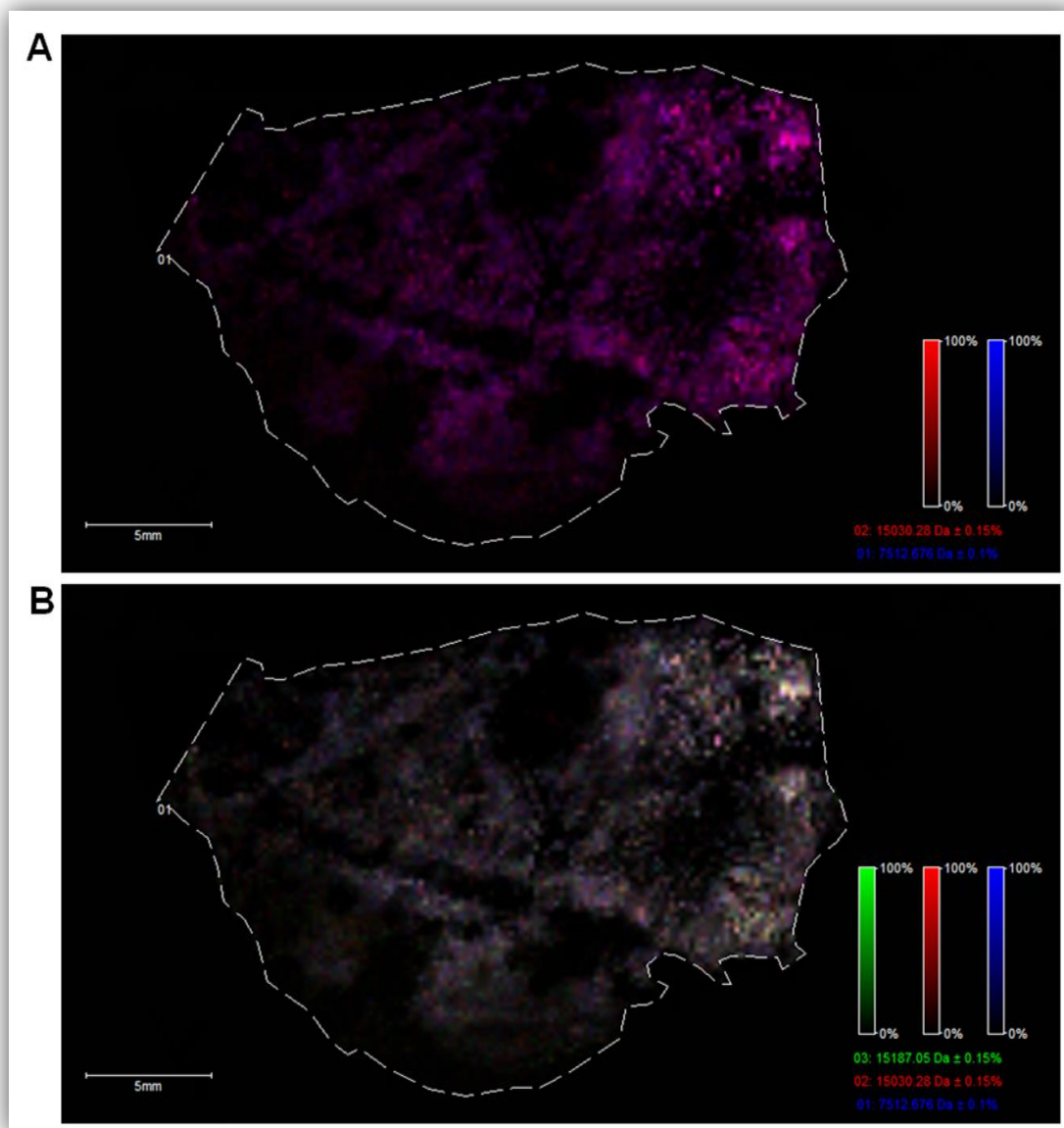


Figura 43 - Análises de MALDI-*imaging* da pele da região do braço da *P. tarsius*. (A) Perfil de co-localização dos íons $[M + 2H]^{2+} = 7512,76$ Da e $[M + H]^+ = 15031,28$ Da. (B) Perfil de co-localização entre os três íons analisados nesta pele.

6.2.7.2 Tecido epitelial da região femural

No tecido da região femural, foram encontrados íons com valores de m/z equivalentes aos encontrados na região braçal (Figura 44). Contudo, suas distribuições (Figura 45 A e B) e intensidades (Figura 45 C e D) foram notavelmente menores. Além disso, um íon m/z de 15146,13 foi detectado (Figura 45 D), mas não corresponde a nenhuma estrutura calculada para as Pht-PLA₂s glicosiladas.

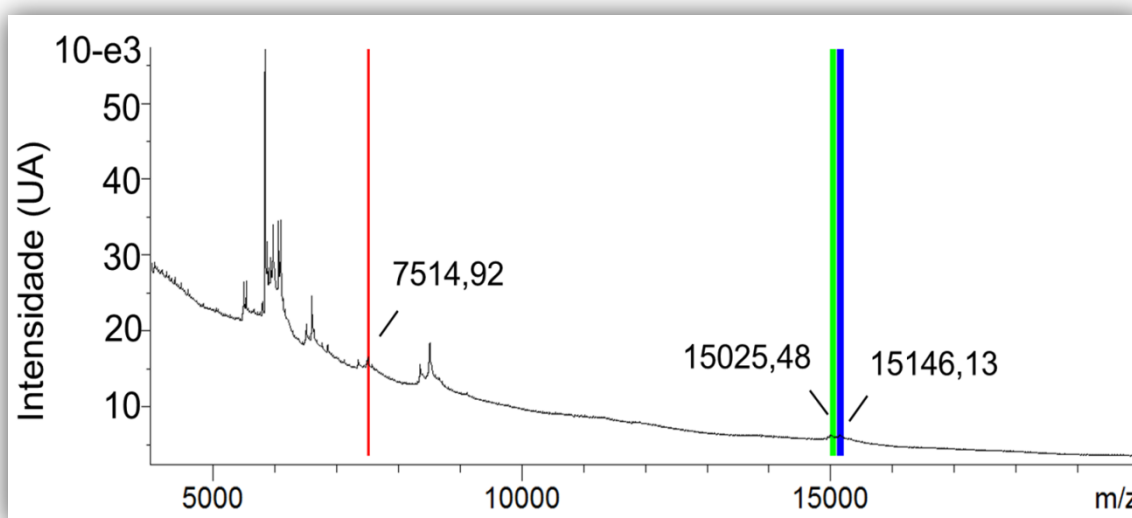


Figura 44 - Espectro de massa global dos íons detectados na pele da região femural de *P. tarsius*. Os filtros de cores mostram os íons selecionados para as análises da Pht-PLA₂-01.

O perfil de distribuição entre os íons de $[M + 2H]^{2+} = 7514,92$ Da e $[M + H]^+ = 15025,48$ Da mostra que ambos estão co-localizados em toda a região da pele analisada (Figura 45 E), assim como o íon 15146,13 Da está co-localizado com os demais, podendo ser um íon relacionado à fosfolipase A₂ (Figura 45 F).

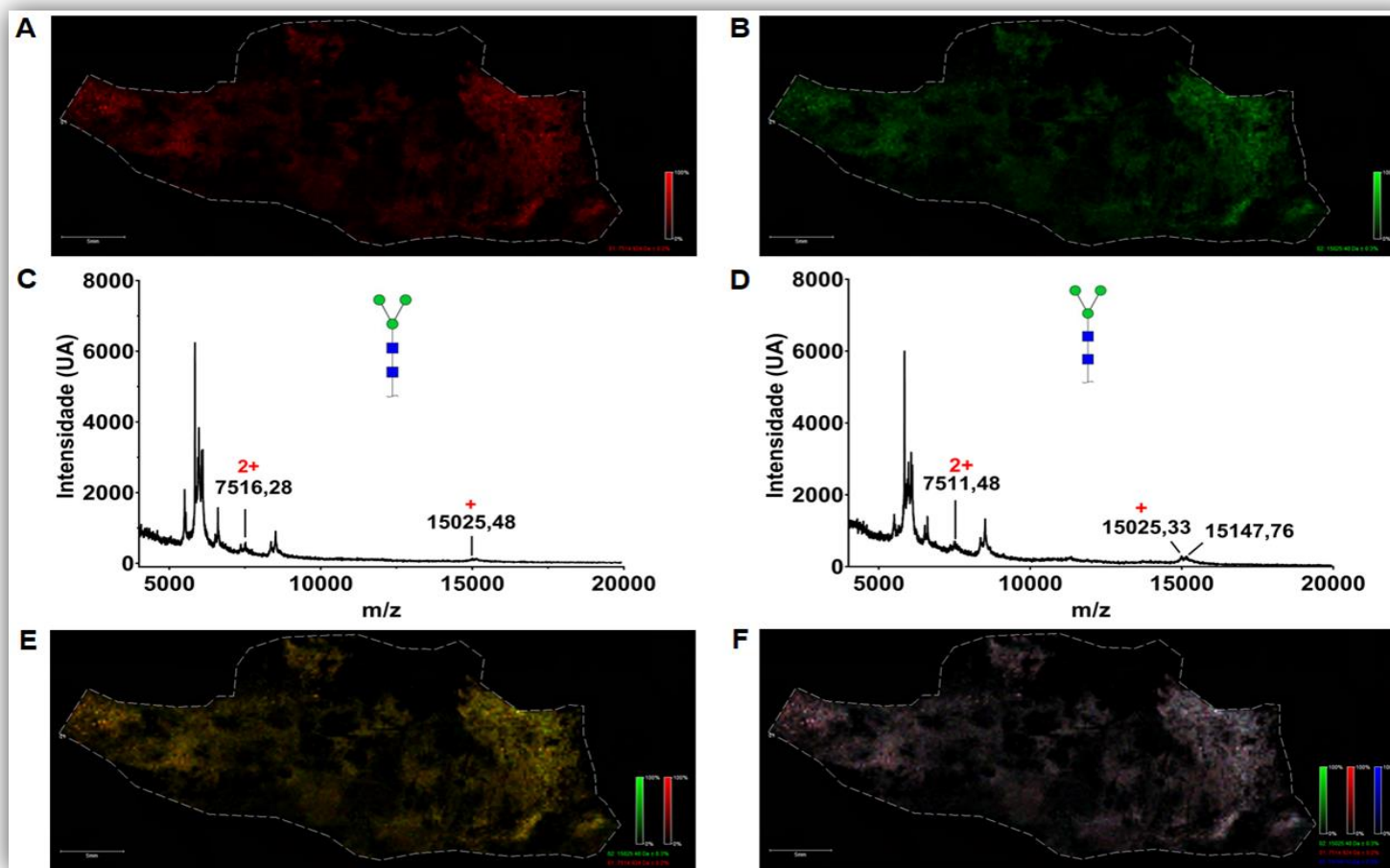


Figura 45 - Análises de MALDI-*imaging* da pele da região femural da *P. tarsius*. (A e B) Imagem em cores mostrando a distribuição dos íons $[M + 2H]^{2+} = 7514,92$ Da (A) e $[M + H]^+ = 15025,48$ Da (B) detectados. (C e D) Espectros destes dois íons, respectivamente, que confirmam a identificação das mesmas composições já identificadas para a Pht-PLA₂-01. (E) Perfil de co-localização dos íons $[M + 2H]^{2+} = 7514,92$ Da e $[M + H]^+ = 15025,48$ Da. (F) Perfil de co-localização entre os três íons analisados nesta pele.

6.2.7.3 Tecido epitelial da região ventral

Na pele do ventre foram encontrados os mesmos íons relacionados à Pht-PLA₂-01 N-glicosilada com GlcNAc₂Man₃, tal como nas demais regiões já mencionadas. Neste tecido, entretanto, um íon de m/z de 15162,25 foi detectado e não equivale a nenhuma das estruturas glicosiladas calculadas (Figura 46).

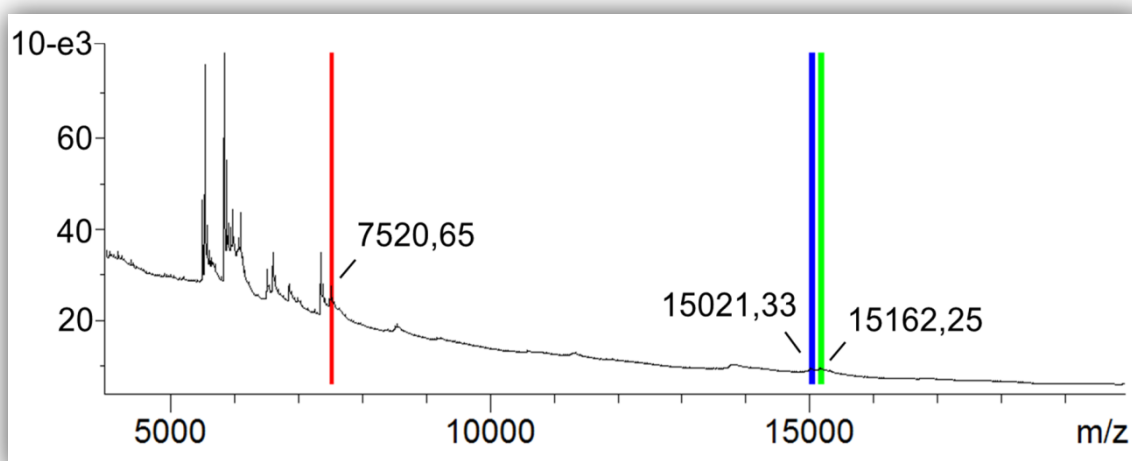


Figura 46 - Espectro de massa global dos íons detectados na pele da região ventral de *P. tarsi*. Os filtros de cores mostram os íons selecionados correspondentes ou não à Pht-PLA₂-01.

A distribuição destes íons se concentra mais na região anterior do ventre e todos apresentam co-localização (Figura 47 A, B, E e F), conforme visto nos demais fragmentos da pele. Os espectros obtidos das regiões com maior concentração de cada íon confirmam as mesmas composições visualizadas nos tecidos das regiões do braço e do fêmur (Figura 47 C e D).

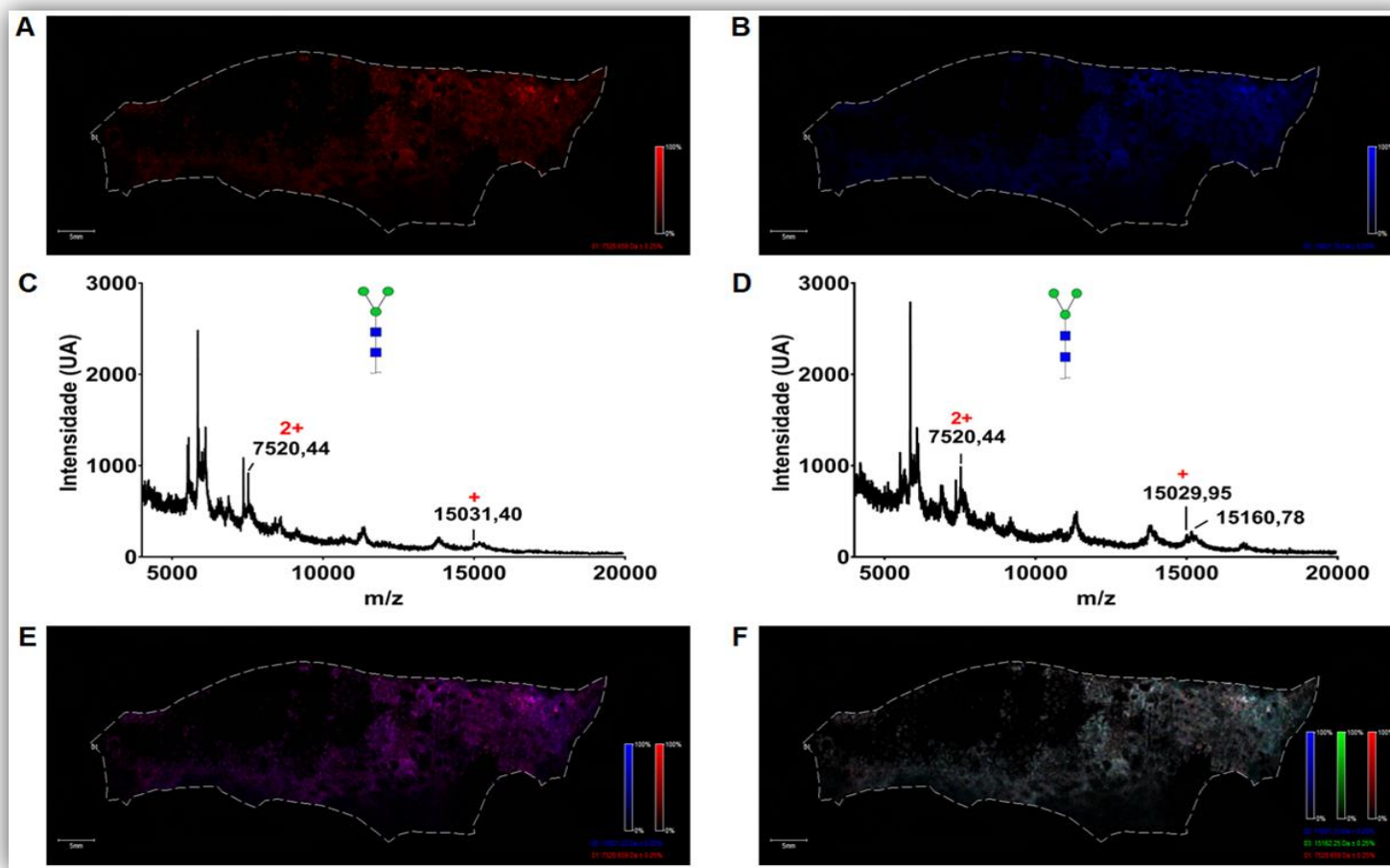


Figura 47 - Análises de MALDI-*imaging* da pele da região ventral da *P. tarsius*. (A e B) Imagem em cores mostrando a distribuição dos íons $[M + 2H]^{2+} = 7520,65$ Da (A) e $[M + H]^+ = 15021,33$ Da (B) detectados. (C e D) Espectros destes dois íons, respectivamente, que confirmam a identificação das mesmas composições já identificadas para a Pht-PLA₂-01. (E) Perfil de co-localização dos íons $[M + 2H]^{2+} = 7520,65$ Da e $[M + H]^+ = 15021,33$ Da. (F) Perfil de co-localização entre os três íons analisados nesta pele.

7.1 Fosfolipase A₂ (Pa-PLA₂) de *Pithecopus azureus*

Embora a secreção cutânea de anuros contenha um grande número de proteínas bioativas, a maior parte dos estudos concentra-se na caracterização de moléculas de baixa massa molecular, como peptídeos. Neste trabalho descrevemos a identificação e caracterização de uma Fosfolipase A₂ glicosilada (Pa-PLA₂) isolada da secreção cutânea de *Pithecopus azureus*.

A cadeia polipeptídica da Pa-PLA₂ é composta por 128 resíduos de aminoácidos e tem massa molecular monoisotópica de 14317,424 Da, determinada após deglicosilação. A estrutura elucidada neste estudo apresenta significativo grau de homologia com estruturas primária, secundária e terciária de fosfolipases A₂.

De acordo com vários estudos estruturais^{16,19,29,35,36,51}, a estrutura terciária de sPLA₂s compreende três α -hélices, um *loop* de ligação ao cálcio, duas folhas β -pregueadas antiparalelas e uma região C-terminal menos conservada, padrão observado no modelo tridimensional da Pa-PLA₂ (Figura 29).

A estrutura da Pa-PLA₂ é também estabilizada por sete ligações dissulfeto formadas por resíduos de cisteína altamente conservados (Figura 7 e Figura 30), que é uma das características estruturais mais importantes das PLA₂s^{24,36,51,85}. Além disso, a díade do sítio ativo (His 47 e Asp 48) do modelo da Pa-PLA₂ é conservada quando comparada a outras PLA₂s, o que é um forte indicativo do mecanismo catalítico conservado³⁵.

Como demonstrado (Figura 27), a Pa-PLA₂ é N-glicosilada em dois sítios de glicosilação, cuja forma com menor grau de glicosilação exhibe o motivo de glicano GlcNAc₂Man (Figura 28) em ambos os sítios (Asn 67 e Asn 108). Já a forma com o maior grau de glicosilação resultante da contínua adição de resíduos de manose é constituída por uma estrutura glicídica rica em manose, tal como GlcNAc₂Man₅ em ambos os sítios de N-glicosilação, bem como em outras combinações de diferentes composições de glicanos. A formação destas glicofomas pode resultar da glicosilação não simultânea de todos os potenciais sítios de glicosilação, resultando em isoformas com diferenças no número, no padrão de ramificação e no comprimento de glicanos^{86,87}.

Apesar da literatura apresentar muitos registros de processamentos de extensões e cortes a partir do motivo de glicano $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$, não há nenhum relato que mostre o corte de até 4 manoses, resultando em estruturas de cadeias curtas ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}$) como as evidenciadas neste estudo. Glicanos de cadeias curtas foram detectados, até então, em fosfolipases A_2 glicosiladas de abelhas⁵².

No modelo molecular da Pa-PLA₂ é possível observar que os dois sítios putativos de glicosilação da Pa-PLA₂ (Asn 67 e Asn 108) estão localizados longe do sítio catalítico (Figura 30), sendo pouco provável que as porções de glicanos identificados causem quaisquer efeitos estéricos significativos na atividade catalítica desta enzima ou mesmo em regiões específicas do sítio de reconhecimento interfacial (IRS)^{88,89}. Isso é reforçado pelo fato de que a proteína deglicosilada também apresentou atividade fosfolipásica contra o DMPC. No entanto, como a análise foi apenas qualitativa não pudemos avaliar quantitativamente se houve alguma variação na intensidade da atividade enzimática, o que se faz necessário, uma vez que a fosfolipase A_2 lisossômica humana (hLPLA₂) glicosilada e deglicosilada demonstrou diferir em suas atividades catalíticas^{86,87}.

Além disso, a glicosilação desempenha um importante papel na estabilidade proteica^{57,87} e contra a degradação proteolítica⁹⁰, fato interessante para ser investigado na Pa-PLA₂, pois essa molécula contém em sua estrutura sítios de clivagem de serino-proteases (Lys 73, Lys 116, Arg 117, Lys 118) adjacentes aos sítios de N-glicosilação.

Embora sejam descritos na literatura muitos papéis desempenhados pela glicosilação em proteínas, seu papel biológico especificamente em fosfolipases ainda não é bem esclarecido. Na Pa-PLA₂ a glicosilação poderia, por exemplo, afetar a interação específica por determinado substrato lipídico^{86,87} ou na proteção da Pa-PLA₂ auxiliando em diversas atividades exercidas pela molécula na secreção cutânea de *Pithecopus azureus*.

De modo, geral, apesar das incertezas quanto ao papel desta molécula na secreção cutânea deste anfíbio, a caracterização estrutural da Pa-PLA₂ abriu uma possibilidade substancial para futuras investigações sobre as semelhanças estruturais e funcionais reais envolvendo esta enzima secretada pela pele de anfíbio e outras fosfolipases A_2 , em particular as de venenos de répteis (Crotalinae e Viperinae)^{19,24,51,82,85}, com as quais verificou-se maior homologia entre as sequências analisadas.

7.2 Fosfolipases A₂ de *Phyllomedusa tarsius*

O estudo realizado com *Phyllomedusa tarsius* descreve a detecção de atividade fosfolipásica em nove frações isoladas da secreção cutânea (Figura 32 B), bem como a caracterização de duas sPLA₂s oriundas do cDNA da referida espécie, as quais foram denominadas Pht-PLA₂-01 e Pht-PLA₂-02. As cadeias polipeptídicas de ambas as PLA₂s são compostas por 127 e 128 resíduos de aminoácidos com massas moleculares médias teóricas de 14137,89 Da e 14295,20 Da, respectivamente. Ambas apresentam um sítio putativos de N-glicosilação (Asn 108).

A comparação da sequência aminoacídica de Pht-PLA₂-01 e Pht-PLA₂-02 com outras fosfolipases A₂ mostrou similaridade com PLA₂s dos grupos I e II, bem como com a Pa-PLA₂ e PLA₂s preditas do genoma de espécies do gênero *Xenopus*, as quais apresentam maior similaridade com fosfolipases A₂ do grupo II (Figura 38). As Pht-PLA₂s apresentam elementos estruturais altamente conservados, como uma região do N-terminal composta por resíduos que formam o canal hidrofóbico das PLA₂s^{88,89}, resíduos constituintes do *loop* de ligação ao cálcio (Y₂₈CGXGG₃₃) e a díade do sítio catalítico (H₄₇/D₄₈)^{32,35,36}.

Ambas as PLA₂s contêm 17 resíduos de cisteína, dos quais 14 são conservados entre sequências fosfolipásicas de Elapídeos (Figura 38 A) e de Viperídeos (Figura 38 B). Os resíduos Cys 11 e Cys 71 observados nas Pht-PLA₂-01 e Pht-PLA₂-02 são elementos exclusivos de PLA₂s do GI (Figura 38 A), responsáveis pela formação da ligação dissulfeto que distingue as fosfolipases A₂ dos GI e GII^{16,91,92}, justificando, portanto, a similaridade com fosfolipases A₂ de Elapídeos do velho mundo. Contudo, também são observados os resíduos Cys 49 e Cys 120, exclusivos de PLA₂s do GII^{92,93,94} (Figura 38 B). Além disso, a região C-terminal das Pht-PLA₂-01 e Pht-PLA₂-02 contém, respectivamente, uma extensão de 6 e 7 resíduos de aminoácidos, incluindo um resíduo de cisteína (Cys 127), típico de PLA₂s do GII^{16,93,95}. Estas observações, claramente, justificam também a similaridade encontrada com fosfolipases A₂ de viperídeos.

Entretanto, é incomum em fosfolipases A₂ de ambos os grupos a quantidade de 17 resíduos de cisteína¹⁶. Normalmente as sPLA₂s contêm de 12 a 16 resíduos de cisteína e todos estão ligados em pares por ligações dissulfeto¹⁶, fato que sugere que em Pht-PLA₂-01 e Pht-PLA₂-02 existiriam oito ligações dissulfeto e um resíduo de cisteína com o grupamento tiol (SH) livre, estrutura que até o momento não foi detectada em outras PLA₂s.

É possível também que o resíduo extra de cisteína nas Pht-PLA₂-01 e Pht-PLA₂-02 esteja ligado a um resíduo de cisteína de outra molécula, tal como ocorre em β -bungarotoxinas (Figura 38 A, Q8QFW4.1; Q9PU97.1; CAD24463.1; P00618.2; Q90251.1), que são estruturas heterodiméricas, cuja cadeia A é constituída de uma sPLA₂ com um resíduo de cisteína extra (Cys 15) estabelecendo ligação dissulfeto com outro resíduo de cisteína extra na Cadeia B (inibidor de proteases tipo Kunitz)⁹⁶⁻⁹⁹. Essa hipótese é sustentada pela detecção de moléculas com massas moleculares que sugerem a presença de dímeros (Figura 35). Contudo, mais experimentos devem ser realizados, como, por exemplo, um ensaio com gel de eletroforese utilizando agentes redutores que poderá contribuir no teste dessa hipótese¹⁰⁰.

O imageamento por espectrometria de massa da pele de *Phyllomedusa tarsius* proporcionou a geração de imagens dos íons referentes à Pht-PLA₂-01 em condições quase nativas, preservando informações morfológicas e moleculares. Os espectros do imageamento confirmaram a presença de estruturas de PLA₂s N-glicosiladas com glicanos de cadeias curtas (GlcNAc₂Man₂) e mais complexas ricas em manose (Figura 36), tal como observado na Pa-PLA₂ de *Pithecopus azureus*. Os íons indicativos de estruturas com diferentes graus de glicosilação, também estão co-localizados entre os valores de m/z de 15000 e 7000, conforme observado nos perfis de distribuição destas moléculas em cada tecido analisado (Figura 42, Figura 45 e Figura 47). A variedade de glicofomas detectadas na pele pode refletir a pressão de seleção natural para a geração de fosfolipases A₂ específicas para cada predador. Além disso, os glicanos identificados tanto na secreção quanto nas fosfolipases A₂ na pele de *P. tarsius* apresentam o mesmo padrão daqueles detectados na Pa-PLA₂ de *P. azureus*, sugerindo, possivelmente, uma mesma origem evolutiva destas moléculas em espécies da família Phyllomedusidae. Contudo, a presença de fosfolipases A₂ glicosiladas na secreção cutânea de anfíbios pode ser também produto de convergência evolutiva e, provavelmente, presente em outras espécies de anfíbios que lidam com pressões seletivas semelhantes.

Ademais, a detecção destas moléculas apenas nesses três fragmentos do tecido epitelial e suas diferentes distribuições pode indicar a presença de especialização tecidual e/ou seletividade associada a alguma função de proteção nessas regiões de maior contato com as superfícies em que habitam. Pode indicar também que nessas regiões as sPLA₂s estão protegidas durante a predação por certas espécies de serpentes, uma vez que muitas espécies de *Phyllomedusa* se encolhem de forma a permitir sua total deglutição e preservar seu tecido

epitelial. Posteriormente, dentro do estômago liberam sua secreção cutânea que, dentre diversas atividades biológicas, provocam regurgitação no seu predador¹⁰¹.

Por fim, apesar dos múltiplos resultados obtidos no estudo com *P. tarsius*, e das inúmeras possibilidades de funções biológicas que as sPLA₂s podem exercer na secreção cutânea, reconhecemos que mais experimentos devem ser realizados, a fim de testarmos as hipóteses levantadas, bem como corroborar ou não as sequências oriundas do cDNA com as futuras sequências oriundas das fosfolipases A₂ presentes nas nove frações da secreção cutânea.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento atual sobre o envolvimento de fosfolipases A₂ em numerosos e diversos processos fisiológicos¹⁶ torna tentador especular sobre o papel biológico desempenhado pelas PLA₂s na secreção cutânea de *Pithecopus azureus* e *Phyllomedusa tarsius*, especialmente aqueles relacionados à manutenção da homeostase da membrana celular em tecidos epiteliais e/ou ao mecanismo de defesa contra predadores naturais e patógenos, dada a origem do material biológico sob investigação.

Nesse sentido, seria interessante avaliar os potenciais efeitos sinérgicos envolvendo estas PLA₂s com vários compostos presentes na secreção da pele de anfíbios, especialmente os inibidores de proteases, antimicrobianos e outros peptídeos nocivos, uma vez que já foi demonstrado que peptídeos antimicrobianos (AMPs) de anfíbios atuam também como moléculas entregadoras, facilitando a absorção e dispersão de outras toxinas da secreção cutânea de anfíbios em seus predadores¹⁰².

Ademais, este estudo levantou questões pertinentes com relação à glicobiologia de vertebrados, como a identificação dos motivos estruturais mais simples das porções glicídicas das PLA₂s (GlcNAc₂Man e GlcNAc₂Man₂) que não constam registrados na literatura especializada. Esses motivos sugerem uma particularidade dos processos associados à glicosilação de proteínas em anfíbios, constituindo um campo de investigação a ser aprofundado.

Frente às numerosas possibilidades de atividades biológicas destas PLA₂s alinhadas com a escassez de informações sobre PLA₂s em anfíbios, entendemos que mais investigações devem ser realizadas e que qualquer discussão aprofundada a respeito dos eventos/processos biológicos associados à presença de PLA₂s na secreção cutânea destes anfíbios deve ser apoiada e validada por evidências claras nesse sentido.

REFERÊNCIAS

- 1 POUGH, H. F.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- 2 DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibian**. Baltimore and London: Johns Hopkins University Press, 1994.
- 3 KÖNIG, E.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; SHAW, C. The diversity and evolution of anuran skin peptides. **Peptides**, v. 63, p. 96–117, 2015.
- 4 LIEM, K. F.; BEMIS, W. E.; WALKER JR., W. F.; GRANDE, L. **Anatomia funcional dos vertebrados: Uma perspectiva evolutiva**. 3ª ed. Norte-america. São Paulo: Cengage Learning, 2012.
- 5 WELLS, K. D. **The ecology and behavior of amphibians**. Chicago and London: The University of Chicago Press, 2007.
- 6 DOCKRAY, G. J.; HOPKINS, C. R. Caerulein secretion by dermal glands. **The Journal of Cell Biology**, v. 64, p. 724-733, 1975.
- 7 STEBBINS, R. C.; COHEN, N. W. **A Natural History of Amphibians**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1995.
- 8 TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibians venoms. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 111A, n. 1, p. 1-29, 1995.
- 9 BRAND, G. D. et al. Bradykinin related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**. v. 27, 2137–2146, 2006.
- 10 MAGALHÃES, M. T. Q. et al. Conformational and functional effects induced by D- and L-amino acid epimerization on a single gene encoded peptide from the skin secretion of *Hypsiboas punctatus*. **PLOS One**. v. 8, p. 1–14, 2013.
- 11 PRATES, M. V. et al. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the Anuran *Hyla punctata*. **J. Biol. Chem.** v. 279, n. 13, p. 13018–13026, 2004.
- 12 TABOADA, C. et al. Naturally occurring fluorescence in frogs. **PNAS**. v. 114, p. 3672–3677, 2017.
- 13 LIBÉRIO, M. da S. et al. The crude skin secretion of the pepper frog *Leptodactylus labyrinthicus* is rich in metallo and serine peptidases. **PLOS One**. v. 9, p. 1–9, 2014.
- 14 ZHAO et al. Purification and characterization of an irreversible serine protease inhibitor from skin secretions of *Bufo andrewsi*. **Toxicon**. v. 46, p. 635–640, 2005.
- 15 ZHANG, Y., WANG, M., WEI, S. Toxicon Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from the skin secretions of *Kaloula pulchra hainana*. **Toxicon**. v. 56, p. 502–507, 2010.
- 16 DENNIS, E. A. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function,

disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chem. Rev.** v. 111, n. 10, p. 6130–6185, 2011.

17 DAVIDSON, F. F.; DENNIS, E. A. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms. **J. Mol. Evol.** v. 31, p. 228–238, 1990.

18 HEINRIKSON, R. L.; KRUEGER, E. T.; KEIM, P. S. Amino acid sequence of phospholipase of *Crotalus adamanteus* A2- α from the venom. **J. Biol. Chem.** v. 252, n. 14, p. 4913–4921, 1977.

19 DUFTON, M. J.; HIDER, R. C. Classification of phospholipases A2 according to sequence. **Eur. J. Biochem.** v. 137, p. 545–551, 1983.

20 SEILHAMER, J. J. et al. Cloning and Recombinant Expression of Phospholipase AS Present in Rheumatoid Arthritic Synovial Fluid. **J. Biol. Chem.** v. 264, n. 10, p. 5335–5338, 1989.

21 KRAMER, R. M. et al. Structure and Properties of a Human Non-pancreatic Phospholipase A2. **J. Biol. Chem.** v. 264, n. 10, p. 5768–5775, 1989.

22 CLARK, J. D. et al. A Novel Arachidonic Acid-Selective Cytosolic PLA2 Contains a Ca²⁺-Dependent Translocation Domain with Homology to PKC and GAP. **Cell.** v. 65, p. 1043–1051, 1991.

23 KRAMER, R. M. et al. The Ca²⁺-sensitive Cytosolic Phospholipase A2 Is a 100-kDa Protein in Human Monoblast U937 Cells. **J. Biol. Chem.** v. 266, n. 8, p. 5268–5272, 1991.

24 DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **J. Biol. Chem.** v. 269, n. 18, p. 13057–13060, 1994.

25 ACKERMANN, E. J.; KEMPNER, E. S.; DENNIS, E. A. Ca²⁺-independent Cytosolic Phospholipase A2 from Macrophage-like P388D₁ Cells. **J. Biol. Chem.** v. 269, n. 12, p. 9227–9233, 1994.

26 STAFFORINI, D. M. et al. Human Macrophages Secrete Platelet-activating Factor Acetylhydrolase. **J. Biol. Chem.** v. 265, n. 17, p. 9682–9687, 1990.

27 TJOELKER, L. W. et al. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. **Nature.** v. 374, p. 549–553, 1995.

28 SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1488, p. 1–19, 2000.

29 SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1761, 1246–1259, 2006.

30 BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Letters.** v. 531, p. 2–6, 2002.

- 31 SAIKIA, D.; THAKUR, R.; MUKHERJEE, A.K. An acidic phospholipase A 2 (RVVA-PLA 2-I) purified from *Daboia russelli* venom exerts its anticoagulant activity by enzymatic hydrolysis of plasma phospholipids and by non-enzymatic inhibition of factor Xa in a phospholipids/Ca²⁺ independent manner. **Toxicon**. v. 57, p. 841–850, 2011.
- 32 SOBRINHO, A. J. C. et al. Anti-platelet aggregation activity of two novel acidic Asp49-phospholipases A2 from *Bothrops brazili* snake venom. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 107. p. 1014-1022, 2018.
- 33 GUY, J. E.; STÄHL, U.; LINDQVIST, Y. Crystal Structure of a Class XIB Phospholipase A2 (PLA2) RICE (*Oryza sativa*) ISOFORM-2 PLA2 AND AN OCTANOATE COMPLEX. **J. Biol. Chem.** v. 284, n. 29, p. 19371-19379, 2009.
- 34 MATOBA, Y.; KATSUBES, Y.; SUGIYAMA, M. The Crystal Structure of Prokaryotic Phospholipase A2. **J. Biol. Chem.** v. 277, n. 22, p. 20059-20069, 2002.
- 35 VERHEIJ, H. M. et al. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A2. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry**. v. 19, 743–750, 1980.
- 36 BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 biochemistry. **Cardiovasc. Drugs Ther.** v. 23, n. 1 49–59, 2009.
- 37 GRÖNROOS, J. O. et al. Bactericidal properties of group IIA and group V phospholipases A2. **J. Immunol.** v. 166, p. 4029–4034, 2001.
- 38 HARWIG, S. S. L. et al. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A2. **J. Clin. Investig.** v. 95, p. 603–610, 1995.
- 39 WEINRAUCH, Y. et al. The potent anti-Staphylococcus aureus activity of a sterile rabbit inflammatory fluid is due to a 14-kD phospholipase A2. **J. Clin. Investig.** v. 97, n. 1, p. 250–257, 1996.
- 40 FENARD, D. et al. A peptide derived from bee venom-secreted phospholipase A2 inhibits replication of T-cell tropic HIV-1 strains via interaction with the CXCR4 chemokine receptor. **Mol. Pharmacol.** v. 60, n. 2, p. 341–347, 2001.
- 41 KIM, J.-O. et al. Lysis of human immunodeficiency virus type 1 by a specific secreted human phospholipase A2. **J. Virol.** v. 81, n. 3, p. 1444–1450, 2007.
- 42 MITSUISHI, M. et al. Group V and X secretory phospholipase A2 prevents adenoviral infection in mammalian cells. **Biochem. J.** v. 393, p. 97–106, 2006.
- 43 PASCHOAL, T. S. **Caracterização bioquímica e funcional de Fosfolipase A2 isolada da peçonha de *Bothrops alternatus***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia. 2015.
- 44 NEVALAINEN, T. J.; HAAPAMÄKI, M. M.; GRÖNROOS, J. M. Roles of secretory phospholipases A2 in inflammatory diseases and trauma. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1488, p. 83-90, 2000.

- 45 GRAFF, J. R. et al. Expression of Group IIa Secretory Phospholipase A2 Increases with Prostate Tumor Grade. **Clinical Cancer Research**. v. 7, p. 3857-3861, 2001.
- 46 JIANG, J. et al. Expression of Group IIA Secretory Phospholipase A2 Is Elevated in Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Adenocarcinoma. **American Journal of Pathology**. v. 160, n. 2. p. 667-671, 2002.
- 47 KALLAJOKI, M. et al. Group II Phospholipase A2 in Human Male Reproductive Organs and Genital Tumors. **The Prostate**. v.35, p. 263-272, 1998.
- 48 LAYE, J. P.; GILL, J. H. Phospholipase A2 expression in tumours: a target for therapeutic intervention? **DDT**. v. 8, n. 15, p. 710-716, 2003.
- 49 CORMIER, R. T. et al. Secretory phospholipase Pla2g2a confers resistance to intestinal tumorigenesis. **Nature genetics**. v. 17, p. 88-91, 1997.
- 50 SCOTT, K. F. et al. Emerging roles for phospholipase A2 enzymes in cancer. **Biochimie**. v. 92, p. 601-610, 2010.
- 51 HARRIS, J. B.; SCOTT-DAVEY, T. Secreted Phospholipases A2 of Snake Venoms: Effects on the Peripheral Neuromuscular System with Comments on the Role of Phospholipases A2 in Disorders of the CNS and Their Uses in Industry. **Toxins**. v. 5, p. 2533–2571, 2013.
- 52 LAI, C., HER, G., Analysis of phospholipase A2 glycosylation patterns from venom of individual bees by capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry using an ion trap mass spectrometer. **Rapid Commun. Mass Spectrom**. v. 14, p. 2012–2018, 2000.
- 53 MARTINS, M. J. P. Phospholipasic activity in skin secretion of Amazonian anuran (amphibia) species. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis**. v. 13, p. 205, 2007.
- 54 CONCEIÇÃO, K. Major biological effects induced by the skin secretion of the tree frog *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Toxicon**. v. 49, p. 1054–1062, 2007.
- 55 CONLON, J. M. et al. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the carpenter frog *Rana virgatipes* (Ranidae, Aquarana). **Regulatory Peptides**. v. 131, p. 38-45, 2005.
- 56 JILEK, A.; KREIL, G. D-Amino Acids in Animal Peptides. **Monatshefte für Chemie**. v. 139, p. 1-5, 2008.
- 57 MOREMEN, K. W.; TIEMEYER, M.; NAIRN, A.V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 13, p. 448–462, 2012.
- 58 MORELLE, W.; MICHALSKI, J.-C. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. **Nat. Protoc**. v. 2, n. 7, p. 1585–1602, 2007.
- 59 NAIR, A.; MOREMEN, K. Glycotranscriptomics. In: CUMMINGS, R. D.; PIERCE, J. M. **Handbook of GLYCOMICS**. EUA: Elsevier Inc. p. 95-136, 2009.

- 60 FREEZE, H. H. et al. Solving Glycosylation Disorders: Fundamental Approaches Reveal Complicated Pathways. **The American Journal of Human Genetics**. v. 94, p. 161–175, 2014.
- 61 KRASNOVA, L.; WONG, C.-H. Understanding the Chemistry and Biology of Glycosylation with Glycan Synthesis. **ARI**. v. 14, n.2, p. 26.1-26.32 2016.
- 62 RUHAAK, L. R. et al. Mass Spectrometry Approaches to Glycomic and Glycoproteomic Analyses. **Chem. Rev.** v. 118, p. 7886-7930, 2018.
- 63 DUELLMAN, W. E.; MARION, A. B.; HEDGES, S. B. Phylogenetics, Classification, and Biogeography of the Treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). **Zootaxa**. v.4104, n. 1, p. 001-109, 2016.
- 64 BUDGETT, J. S. Notes on the Batrachians of the Paraguayan Ohaco, with Observations upon their Breeding Habits and Development, especially with regard to *Phyllomedusa hypochondrialis*, Cope. Also a Description of a New Genus. **Quart. Journ. of Microsc. Science**. v. 42, p. 305-333, 1899.
- 65 CARAMASCHI, U. Redefinição do grupo de *Phyllomedusa hypochondrialis*, com redescricao de *P. megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926), revalidação de *P. azurea* Cope, 1862 e descrição de uma nova especie (Amphibia, Anura, Hylidae). **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro. v. 64, p. 159-179. 2006.
- 66 CALDERON, L. A. Amphibia, Anura, Hylidae, Phyllomedusinae, *Phyllomedusa azurea*: Distribution extension and geographic distribution map. **Check List**. v. 5. n. 2, p. 317-319, 2009.
- 67 FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.0**. American Museum of Natural History, New York, USA. 2007. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Bibliography/F/Frost-2007-Amph.-Spec.-World-vers.-5.0>>. Acesso em: 04 jun 2018.
- 68 PRADO, V. H. M. Amphibia, Anura, Hylidae, *Phyllomedusa azurea* - Distribution extension. **Check List**. v. 4, n.1, p. 55-56, 2008.
- 69 LIMA, A. P. et al. **Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central**. Manaus: Áttema Design Editorial, 2008.
- 70 NCBI. **PREDICTED: *Xenopus tropicalis* phospholipase A2 group IID (pla2g2d), mRNA** [WWW Document]. NCBI Ref. Seq. XM_004916424.2. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/847151364>> Acesso em: 04 jun 2018.
- 71 NCBI. **PREDICTED: basic phospholipase A2 homolog Vur-S49-like [*Xenopus laevis*]**. NCBI Ref. Seq. XP_018083942.1. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_018083942.1> Acesso em: 4 jun 2018.
- 72 SEBEN, A. Microdissecação fisiológica a fresco: uma nova visão sobre a anatomia de anfíbios e répteis. In: NASCIMENTO, L. B.; OLIVEIRA, M. E. (Ed.). (Org.). **Herpetologia**

no **Brasil II**. 1ed. Belo Horizonte – MG: Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2007, v. 1, p. 311-325.

73 BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. **NORMATIVAS DO CONCEA**: para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, 2008. 279 p.

74 MARGULIES, M. Genome sequencing in microfabricated highdensity picolitre reactors. **Nature**. v. 437, p. 376–381, 2005.

75 PATEL, R. K.; JAIN, M. NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. **PLOS One**, v. 7, n. 2, p. 1-7, 2012.

76 BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**. v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

77 BROWN, C.T.; HOWE, A.; ZHANG, Q.; PYRKOSZ, A.B.; BROM, T.H. A Reference-Free Algorithm for Computational Normalization of Shotgun Sequencing Data. **arXiv: 1203.4802 [q-bio.GN]**. v1, 2012.

78 ZHANG, Q. These are not the k-mers you are looking for: efficient online k-mer counting using a probabilistic data structure. **PLOS One**. v. 9, n. 7, p. 1-13, 2014.

79 GRABHERR, M. G. et al. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nat. Biotechnol.**, v. 29, n. 7, p. 644–652, 2013.

80 HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41:95-98, 1999.

81 PHILLIPS, J.C. Scalable molecular dynamics with NAMD. **J. Comput. Chem.** v. 26, n. 16, p. 1781–1802, 2005.

82 ZHAO, K. et al. Structure of a basic phospholipase A2 from *Agkistrodon halys pallas* at 2.13 Å resolution. **Acta Crystallogr.** v. 54, p. 510–521, 1998.

83 BATISTA, C. V. F. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. **Peptides**. v. 20, p. 679–686, 1999.

84 ZHAO, K.; ZHOU, Y.; LIN, Z. Structure of basic phospholipase A 2 from *Agkistrodon halys Pallas*: implications for its association, hemolytic and anticoagulant activities. **Toxicon**. v. 38, p. 901–916, 2000.

85 PRIGENT-DACHARY, J. Snake Venom Phospholipases A2: a fluorescence study of their binding to phospholipid vesicles correlation with their anticoagulant activities. **J. Biol. Chem.** v. 255, n. 16, p. 7734–7739, 1980.

86 HIRAOKA, M. et al. Role of N -glycosylation of human lysosomal phospholipase A2 for the formation of catalytically active enzyme. **J. Lipid Res.** v. 54, p. 3098–3105, 2013.

- 87 SOLÁ, R. J.; GRIEBENOW, K. A. I. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. **J. Pharm. Sci.** v. 98, p. 1223–1245, 2009.
- 88 JAIN, M. K.; BERG, O. G. Coupling of the i-face and the active site of phospholipase A2 for interfacial activation. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 10, p. 473–479, 2006.
- 89 MURAKAMI, M. T. et al. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA2 - active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA2 homologues. **Toxicon.** v. 49, p. 378–387, 2007.
- 90 VEEN, H. A. et al. The role of Nlinked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. **Eur. J. Biochem.** v. 271, p. 678–684, 2004.
- 91 SINGH, G. et al. Sequence and Crystal Structure Determination of a Basic Phospholipase A2 from Common krait (*Bungarus caeruleus*) at 2.4 Å Resolution: Identification and Characterization of its Pharmacological Sites. **J. Mol. Biol.** v. 307, p. 1049-1059, 2001.
- 92 SUZUKI, M. et al. Molecular diversity in venom proteins of the Russell's viper (*Daboia russellii russellii*) and the Indian cobra (*Naja naja*) in Sri Lanka. **Biomedical Research.** v. 31, n. 1, p. 71-81, 2010.
- 93 SIDDIQI, A. R.; ZAIDI, Z. H.; JÖRNVALL, H. Purification and characterization of two highly different group II phospholipase A2 isozymes from a single viperid (*Eristocophis macmahoni*) venom. **Eur. J. Biochem.** v. 201, p. 675-679, 1991.
- 94 SINGH, R. K. et al. Crystal structure of the complex of group I PLA2 with a group II-specific peptide Leu-Ala-Ile-Tyr-Ser (LAIYS) at 2.6 Å resolution. **Journal of Drug Targeting.** v. 13, n. 6, p. 367-374, 2005.
- 95 ATANASOV, V. S. et al. Acute toxicity of vipoxin and its components: is the acidic component an “inhibitor” of PLA2 toxicity? **Interdiscip. Toxicol.** v. 5, n. 4, p. 169-172, 2012.
- 96 KHOW, O. et al. Isolation of the major lethal toxin in the venom of *Bungarus flaviceps*. **Toxicon.** v. 40, p. 463-469, 2002.
- 97 TSAI, I.-H.; HSU, H.-Y.; WANG, Y.-M. A novel phospholipase A2 from the venom glands of *Bungarus candidus*: cloning and sequence-comparison. **Toxicon.** v. 40, p. 1363-1367, 2002.
- 98 YANOSHITA, R. et al. Molecular cloning of the major lethal toxins from two kraits (*Bungarus flaviceps* and *Bungarus candidus*). **Toxicon.** v. 47, p. 416-424, 2006.
- 99 SIANG, A. S. et al. Transcriptomic analysis of the venom gland of the red-headed krait (*Bungarus flaviceps*) using expressed sequence tags. **BMC Molecular Biology.** v. 11, n. 24, p. 1471-2199, 2010.
- 100 CHU, C.-C.; LI, S.-H.; CHEN, Y.-H. Resolution of isotoxins in the β-bungarotoxin family. **Journal of Chromatography A.** v. 694, p. 492-497, 1995.

101 SAZIMA, I. Experimental predation on the leaf-frog *Phyllomedusa rohdei* by the water snake *Liophis miliaris*. **Journal of Herpetology**. v. 8, n. 4, 1974.

102 RAAYMAKERS, C. et al. Antimicrobial peptides in frog poisons constitute a molecular toxin delivery system against predators. **Nat. Commun.** v. 8, p. 4–11, 2017.

ABREVIACOES

ACN: *Acetonitrile* (Acetonitrila).

APCI: *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (Ionizao Química  Presso Atmosfrica).

BSA: *Bovine Serum Albumin* (Albumina do Soro Bovino).

ESI-Q-TOF/MS: *Electrospray Ionisation – Quadrupole - Time-of-Flight/Mass Spectrometry* (Ionizao Eletrospray – Quadrupolo – Tempo de voo/Espectrometria de Massa).

FA: *Formic Acid* (cido Frmico).

ISD: *In-Source Decay* (Decaimento na Fonte).

LC: *Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida).

m/z: *mass/charge* (massa/carga).

MALDI-TOF/MS: *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight/Mass Spectrometry* (Ionizao e dessoro a Laser Assisitida por Matriz).

Pa-PLA₂: *Pithecopus azureus*-Fosfolipase A₂.

Pht-PLA₂: *Phyllomedusa tarsi*-Fosfolipase A₂.

PLA₂: *Phospholipase A₂* (Fosfolipase A₂).

PNGase: *Peptide N-Glycosidase* (Peptídeo N-Glicosidase).

RP-HPLC: *Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Performance – Fase Reversa).

SPE: *Solid-Phase Extraction* (Extrao de Fase Sólida).

sPLA₂: *secreted Phospholipase A₂* (Fosfolipase A₂ secretrada).

sPLA₂s: *secreted Phospholipases A₂* (Fosfolipases A₂ secretadas).

TFA: *Trifluoroacetic acid* (Ácido Trifluoroacético).

TIC: *Total Ion Current* (Corrente de Íon Total).

EIC: *Extracted-Ion Chromatogram* (Cromatograma dos Íons Extraídos).

DMPC: *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine* (1,2-dimeristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina).

DTT: *Dithiothreitol* (Ditiotreitól).

IAA: *Iodoacetamide* (Iodoacetamida).

GFP: *Glu FibrinoPeptide* (Glu FibrinoPeptídeo).

CHCA: *α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid* (Ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico).

DAN: *Diaminonaphthalene* (1,5-diaminonaftaleno).

DHB: *2,5-dihydroxybenzoic acid* (Ácido 2,5-dihidroxibenzoico).

OST: *Oligosaccharyltransferase* (Oligossacariltransferases).

LLO: *Lipid-linked oligosaccharide* (Oligossacarídeo ligado ao lipídeo).

RE: Retículo endoplasmático.

PAF: *Platelet Activating Factor* (Fator de ativação plaquetária).

TABELA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Símbolo de uma letra	Símbolo de três letras	Massa monoisotópica
Ácido aspártico	D	Asp	115,026
Ácido glutâmico	E	Glu	129,042
Alanina	A	Ala	71,037
Arginina	R	Arg	156,101
Asparagina	N	Asn	114,042
Cisteína	C	Cys	103,009
Fenilalanina	F	Phe	147,068
Glicina	G	Gly	57,021
Glutamina	Q	Gln	128,058
Histidina	H	His	137,058
Isoleucina	I	Iso	113,084
Leucina	L	Leu	113,084
Lisina	K	Lys	128,094
Metionina	M	Met	131,04
Prolina	P	Pro	97,052
Serina	S	Ser	87,032
Tirosina	Y	Tyr	163,063
Treonina	T	Thr	101,047
Triptofano	W	Trp	186,079
Valina	V	Val	99,068

ARTIGO



Identification and characterization of phospholipases A₂ from the skin secretion of *Pithecopus azureus* anuran

Beatriz Blenda P. Souza^{a,b}, José L. Cardozo Fh^{a,e}, André M. Murad^a, Maura V. Prates^a, Marcelo M.A. Coura^{a,c}, Guilherme D. Brand^d, Eder A. Barbosa^d, Carlos Bloch Jr.^{a,*}

^a Laboratório de Espectrometria de Massa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brazil

^b Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brazil

^c Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brazil

^d Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas – LSAB, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brazil

^e Instituto Mato-grossense do Algodão, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Phospholipase A₂
Amino acid and cDNA sequencing
Pithecopus azureus
N-Glycosylation
Molecular modeling

ABSTRACT

The present work reports the isolation, characterization and the complete sequence of a phospholipase A₂ (PLA₂) present in the skin secretion of *Pithecopus azureus*. Among several peptides and small proteins previously described by our group from some species belonging to this amphibian genus (formerly named *Phyllomedusa*), a 15 kDa N-glycosylated protein showing PLA₂ activity was purified, assayed, sequenced and named Pa-PLA₂. The *Pithecopus azureus* skin phospholipase A₂ polypeptide chain is composed by 125 amino acid residues linked by seven disulfide bonds and two N-glycosylated sites (N67 and N108). The Pa-PLA₂ enzymatic activity was qualitatively evaluated and compared to classical viperid PLA₂ showing that both, native and deglycosylated Pa-PLA₂ forms, are catalytically functional. The tridimensional molecular model of Pa-PLA₂ indicates that the observed glycan moieties are suggestively placed far from the active site of that enzyme and therefore having little or no significant role on the direct interaction of the Pa-PLA₂ catalytic pocket and its substrates.

1. Introduction

Physiological and morphological adaptations are commonly encountered in amphibians, mostly linked to species-specific surviving mechanisms and behavioral strategies such as mimicry, aposematism and camouflage (Duellman and Trueb, 1994; Erspamer and Vialli, 1951). Given the natural hostilities of the biological contexts in which they are inserted, amphibians are also equipped with a distinct defensive machinery fostered by a glandular system responsible for the accumulation and/or synthesis of secretions rich in various types of alkaloids, biogenic amines, peptides and proteins (König et al., 2015, 2013; Toledo and Jared, 1995). The release of the amphibian's noxious glandular content induced by predators or any other kind of biotic stress is believed to be one of the major features responsible for their evolutionary success (Batista et al., 1999; Brand et al., 2002; König et al., 2015; Toledo and Jared, 1995).

Therefore, the molecular composition of amphibian's cutaneous secretions has been the subject of numerous reports for decades. It is noticeable that the large majority of these studies focuses on the

structural and functional characterization of peptides and secondary metabolites (Brand et al., 2006, 2002; Conlon et al., 2009; Leite et al., 2005; Magalhães et al., 2013; Prates et al., 2004; Resende et al., 2008; Rollins-Smith and Conlon, 2005; Taboada et al., 2017; Wegener et al., 1999). Conversely, much less information is available on higher molecular mass proteins, enzymes (Darby et al., 1991; Libério et al., 2014; Mizuno et al., 1987; Resnick et al., 1991) and enzymatic inhibitors (Darby et al., 1991; König et al., 2013; Zhang et al., 2010; Zhao et al., 2005). Nevertheless, regarding these molecules, it is known that some enzymes were found to be involved in the processing of precursor peptides into mature molecules, catalysis of different post-translational modifications (König et al., 2015) and inactivation of mature peptides after release onto the skin, in order to protect the animal from harmful exposure of their own toxic molecules (Giovannini et al., 1987; König et al., 2013).

Additionally, phospholipase A₂ (PLA₂), one of the most abundant and studied enzymes present in snake venoms has also been detected in the cutaneous secretion of amphibians and, in particular, PLA₂ activity in the crude extract of some species belonging to the *Phyllomedusa*

* Corresponding author. Laboratório de Espectrometria de Massa, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Estação Parque Biológico, Final W5, Asa Norte Brasília-DF, 70770-900, Brazil.

E-mail address: carlos.bloch@embrapa.br (C. Bloch).

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.002>

Received 29 January 2019; Received in revised form 17 April 2019; Accepted 3 June 2019

Available online 04 June 2019

0041-0101/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

genus such as *P. tarsius*, *P. bicolor* (Martins et al., 2007) and *P. hypochondrialis* (Conceição et al., 2007) were reported.

Phospholipases, particularly the secretory forms of PLA₂ (sPLA₂), are generally one of the major components of vertebrate and invertebrate venoms (Davidson and Dennis, 1990; Heinrikson et al., 1977; Lai and Her, 2000; Lomonte et al., 2003; Mukherjee, 2014; Owen et al., 1990; Stanley, 2006). These molecules are typically constituted by a single polypeptide chain internally stabilized by 6–8 disulfide bonds (Burke and Dennis, 2009; Saikia et al., 2011; Sobrinho et al., 2017), with molecular masses ranging from 14 to 18 kDa. Phospholipases A₂ belong to a superfamily of enzymes that catalyze the hydrolysis of fatty acids at the sn-2 position of phospholipids, by means of the His/Asp dyad at the active site, in a calcium-dependent reaction (Bergh et al., 1988; Dennis et al., 2011; Han et al., 1997; Hou et al., 2017; Saikia et al., 2011; Schaloske and Dennis, 2006; Verheij et al., 1980; Zhao et al., 2000).

These enzymes have been described to display other roles in a wider biological scenario, although their more specific functions may differ from one group or subgroup to another. In general, their activities include maintenance of cellular phospholipids, generation of prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes during inflammatory processes (Burke and Dennis, 2009), antibacterial action against Gram-positive and Gram-negative bacteria (Grönroos et al., 2001; Harwig et al., 1995; Weinrauch et al., 1996) and antiviral activity (Fenard et al., 2001; Kim et al., 2007; Mitsuishi et al., 2006).

The present work reports the unequivocally detection, purification, characterization, complete cDNA and amino acid sequences of a glycosylated Phospholipase A₂, named Pa-PLA₂, isolated from the skin secretion of *Pithecopus azureus*, previously designated as *Phyllomedusa azurea*. Furthermore, in order to contribute to an initial understanding on the possible cutaneous role(s) of Pa-PLA₂, we have also provided here a set of preliminary studies on the structural-functional features of this molecule.

2. Experimental section

2.1. Animal capture and extraction of cutaneous secretion

Adult specimens of *Pithecopus azureus* were captured in Mimoso - Goiás, authorized by the legal Ethics Committee on Animal Use (Nº 013/2015) and by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Nº63740-1). The extraction of the cutaneous secretion was performed using 6 V pulsed electrical stimulation, during 30 s at the dorsal part of each specimen. Once obtained, the secretion was immediately filtered, frozen in liquid nitrogen and lyophilized.

2.2. Isolation of Pa-PLA₂

Aliquots of about 2 mg of the lyophilized crude extract were solubilized in 500 µL of a TFA 0.1% (v/v) solution (solvent A) and fractionated by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography – RP-HPLC (Shimadzu Corporation, Japan) using a Jupiter 4µ Proteo, (C₁₈, 90 Å, 250 × 10ID mm - Phenomenex) semi-preparative column. Fractions were eluted by using a linear acetonitrile gradient ranging from 5 to 65% (solvent B; containing TFA 0.1%), during 55 min at a flow rate of 2.5 mL/min. Fractions presenting PLA₂ activity were submitted to additional chromatographic procedures using both analytical reverse phase columns Aeris Widepore (3.6µ XB-C¹⁸ 250 × 4.6ID mm – Phenomenex) and SOURCE 5RPC-ST (4.6/150 mm – GE) by applying optimized solvent B gradients. PLA₂ elution during all steps was monitored at 216 and 280 nm and the respective chromatographic fractions were manually collected and freeze-dried using a vacuum concentrator (SpeedVac, Labconco). MALDI-TOF-MS mass analyses and purity evaluations were performed throughout the role process.

2.3. Sample preparation for structural analysis

The Pa-PLA₂ fraction solubilized in 50 µL (1 µg/µL) of 50 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 8.0) was submitted to reduction and S-alkylation protocol using dithiothreitol (DDT) (100 mM) and iodoacetamide (IAA) (300 mM) fresh solutions during 30 min at 60 °C and 30 min in dark at room temperature, respectively. The resulting denatured/alkylated sample was fractionated by RP-HPLC using analytical column Vydac (5µ C₁₈ 4.6 × 250 mm – DIONEX) as previously described using optimized solvent B gradient. Following the MALDI-TOF-MS and ESI-MS analyses, denatured/alkylated Pa-PLA₂ was submitted to proteolysis using sequencing grade Trypsin (Sigma) in ammonium bicarbonate buffer 50 mM at 37 °C for 24 h. When necessary, RapiGest SF (Waters) solution was used according to the manufacturer's instructions. Pa-PLA₂ tryptic peptides were mass analyzed and sequenced using both MALDI-TOF-MS/MS and nano LC-MS/MS methodologies.

2.4. Mass spectrometry MALDI-TOF/MS

MALDI-TOF/MS and MS/MS analyses were performed in an UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen – Germany). Samples were applied onto a MALDI target plate after mixing 1:3 (v/v) with a saturated solution of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA). MS spectra were collected in linear or reflector positive modes.

Intact Pa-PLA₂ was partially sequenced by In-Source Decay (ISD) fragmentation methods after sample mixing 1:6 (v/v) with a saturated solution of 1,5-diaminonaftaleno (DAN) and application onto a MALDI target plate. *De novo* sequencing of Pa-PLA₂ tryptic peptides was obtained by manual assignment and interpretation of the MS/MS spectra acquired in LIFT™ mode. All spectra were processed and analyzed using FlexAnalysis software 3.4 (Bruker Daltonics, Bremen – Germany).

2.5. Mass spectrometry ESI-Q-TOF/MS

The molecular mass evaluations of both glycosylated and deglycosylated Pa-PLA₂ were obtained by direct infusion of sample reconstituted in 1:1 acetonitrile:water containing 0.1% (by volume) formic acid (FA). All mass analyses were conducted in positive ion mode using an Impact II™ mass spectrometry (Bruker Daltonics, Bremen - Germany) controlled by Bruker otofControl software. Analysis time was 3 min (per sample) and spectra were collected using an optimized method for high mass compounds with m/z range between 100 and 2500. Software Compass DataAnalysis 4.3.110 (Bruker Daltonics, Bremen – Germany) was used to process and analyze the obtained data.

2.6. NanoLC-MS/MS acquisition

Pa-PLA₂ tryptic peptides solubilized in 10 µL of a FA 0.1% (v/v) solution (solvent A) were fractionated by Reversed-Phase High-Performed Liquid Chromatography – RP-HPLC using a nanoACQUITY™ system (Waters Corp., USA) equipped with a Symmetry (C¹⁸, 5 µm, 5 mm × 300 µm) pre-column and a HSST3 (C¹⁸, 1.8 µm, 75 µm × 150 mm analytical column (Waters Corp., Manchester, UK). Fractions were eluted by using a gradient of 3–40% of acetonitrile, containing 0.1% FA (solvent B) during 30 min at a flow rate of 600 nL/min. The Pa-PLA₂ tryptic peptides were mass analyzed on a Synapt G2 HDMS™ mass spectrometer (Waters Corp., Manchester, UK). The MS survey was acquired over the 200–3000 m/z range at 0.5s scan time and switched to MS/MS mode if intensity of individual ion rises above 5000 TIC. The MS/MS data was acquired over the range m/z 50 to 4500 in 0.5s scan time with a maximum of 3 ions selected from a single MS survey and switched back to MS survey mode if intensity of individual ion drops below 5000 TIC. Charge state peak selection was allowed only to double and triple charge states and trap collision energy was applied according the charge recognition. Data were processed and analyzed

using the following tools from MassLynx software v4.1 (Waters Corp., Manchester, UK). Precursor mass spectra were selected using DDAtool, processed using MaxEnt 3 algorithm and manually *de novo* sequenced using PepSeq (Waters Corp., Manchester, UK).

2.7. Transcript sequencing

Total RNA was extracted from the dorsal cutaneous tissue of eight animals using Trizol reagent (Invitrogen) and then quantified by QuantiT[™] RiboGreen[®] RNA Reagent and Kit (Invitrogen) according to manufacturer recommendations. Total RNA was treated with DNase-I and the quality and quantity of RNA were checked with a Bioanalyzer (2100, RNA Nano 6000 Agilent). The 1st strand cDNA synthesis was performed using 1 µg total RNA and the SMARTer[™] PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech). After double-stranded DNA synthesis, the DNA (~5 µg) was nebulized to a mean fragment size of 650 bp, ligated to an adapter using standard procedures (Margulies et al., 2005) and then sequenced using GS-FLX Titanium (Beckman Coulter Genomics SA, Grenoble, France). All sequencing procedures (excepted RNA extraction) were performed by 454 Life Science/Roche Company (EUA). The search of Pa-PLA₂ precursor sequence was performed across more than 600 resulting reads using Geneious software.

2.8. Multiple alignments

The Pa-PLA₂ sequence was submitted and compared with sequences described in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) non-redundant protein database, using BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool_protein). The alignment was performed with sequences above 50% of identity, using BioEdit Sequence Alignment Editor software, version 7.2.5.

2.9. LC-MS and MALDI-TOF-MS free N-glycan analysis

Denatured/alkylated Pa-PLA₂ was treated with PNGase F overnight to release the N-glycans. Free N-glycans were purified by Solid Phase Extraction (SPE) using Sep Pak C18 columns, dried in a vacuum concentrator, permethylated with ICH₃, and once again submitted to SPE in C₁₈ columns, according to well established methods in the literature (Morelle and Michalski, 2007). Samples were reconstituted in 40 µL methanol and added with 10 mM Sodium Acetate immediately before analysis. The derivatized N-glycans were injected (6 µL of sample) in an ekspert ultraLC 100 (Sciex, Framingham, MA, USA) coupled to a TripleTOF 5600 + mass spectrometer operating in positive mode. Chromatographic separation was performed in a Kinetex (2.6µ, C18, 100th, 50 × 2.1 mm) column maintained at 40 °C at a flow rate of 0.2 mL/min by applying a linear gradient of 30%–95% of 0.1% Formic acid in MeOH for 12 min. The TripleTOF 5600 + ion source operated in the positive mode at a temperature of 650.0 °C. Mass spectrometer worked in the High-Resolution mode with curtain gas equal to 15. The mass range of acquisitions was between m/z 800–2000 Da. The other acquiring parameters were: number of cycles = 2043; polarity = positive; period cycle time = 525 ms; pulser frequency = 13.569 kHz and accumulation time = 500.00 ms. Mass spectrometer was calibrated using APCI positive calibration solution before acquisitions. MS/MS spectra were obtained using the Information Dependent Acquisition (IDA) mode.

The native Pa-PLA₂ (6.4 µM) was treated with PNGase F and PNGase A in PBS buffer (pH 6.0) at 37 °C in volume final of 100 µL for 16 h. Buffered deglycosylation reaction mixtures were directly submitted to MALDI after mixing 1:3 (v/v) with a saturated solution of 1 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA). MS spectra were collected in linear positive modes.

2.10. The sPLA₂ activity test

The sPLA₂ activity of Pa-PLA₂ was evaluated by incubating the glycoprotein (1.6 mM) with dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) 100 µM in PBS buffer (pH 8.5) containing Ca²⁺ 5 mM in a final volume of 500 µL. The reaction tube was kept at 40 °C for 15 min. An assay using deglycosylated Pa-PLA₂ (6.4 µM) in non-denaturing conditions was carried out in the same way with a modification (pH 6.5, volume final of 100 µL). Assays were performed in triplicates using *Bothrops moojeni* (jararaca snake) venom (1.6 mM) as positive control and then analyzed by MALDI-TOF/TOF MS as previously described. Samples were mixed 1:3 (v/v) with a saturated solution of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and spectra were acquired in positive and reflector mode.

2.11. Pa-PLA₂ molecular modeling

Molecular modeling was done using Schrödinger biologics suite release 2018-3. The mature primary sequence of Pa-PLA₂ was loaded into multiple sequence viewer of Bioluminate v3.2 software and homology model was built using consensus alignment of the following PLAs tridimensional structures: 1JIA, 4HG9, 5WZO, 1C1J, 5WZM, 1VAP, 1U73, 5G3N, 1POE, 1RGB, 2IOU, 1OQS, 2H4C, 1VIP (Supplementary Fig. S1). Further model adjustments were performed manually, disulfide bridges were fixed and one calcium ion was added and the resulting model was submitted to molecular dynamics using NAMD (Phillips et al., 2005). Briefly, the 3D model was solvated in a droplet water sphere using NaCl as counter ions to equilibrate system charges. The total system energy was minimized using OPLS force field until the root mean square deviation (RMSD) dropped below 0.1 kcal/mol/Å (Zhao et al., 1998). This system was then equilibrated for 100ps and molecular dynamics were performed for 1 ns at 300k for both conditions. The final structure from the trajectory was energy minimized and water with more than 4 Å away from the molecule was removed. The amino acid side chains and loop refinements were done and searches for reactive residues were performed using software tools from Schrödinger biologics suite.

3. Results

3.1. Fractionation of the cutaneous secretion of *Pithecopus azureus*

Reverse-phase liquid chromatography of the crude skin secretion of *Pithecopus azureus* yielded not only the separation and identification of several compounds previously described by our group (Batista et al., 1999; Brand et al., 2002, 2006) but also a large, unresolved and heterogeneous fraction (G04) eluted between 41 and 45 min retention times, where phospholipase A₂ activity was originally detected (Fig. 1A). The compounds obtained in the fraction G04 were submitted to further separation steps resulting in 15 fractions (Fig. 1B) and a major, highly homogeneous component showing phospholipase A₂ activity was isolated and named Pa-PLA₂ (Fig. 1C), respectively.

3.2. Molecular mass investigations

The protein Pa-PLA₂ was firstly mass analyzed by MALDI-TOF/MS under linear mode and the ion corresponding to [M + H]⁺ = 15462.44 Da was detected. Other ions from Pa-PLA₂ with different charge states, such as [M + 2H]²⁺ = 7731.82 Da and [M + 3H]³⁺ = 5154.75 Da, were also observed (Supplementary Fig. S2). The major component present in the most intense chromatographic fraction displayed in Fig. 1 C was mass analyzed by high resolution ESI-QTOF/MS. This experiment revealed a classical protein glycosylation profile (Morelle and Michalski, 2007) that was confirmed by the well resolved series of 162 Da mass increment as shown in Fig. 2A. The monoisotopic mass of the most intensely detected ion related to glycosylated Pa-PLA₂ was found to be [M + 10H]¹⁰⁺ = 1578.593 Da that

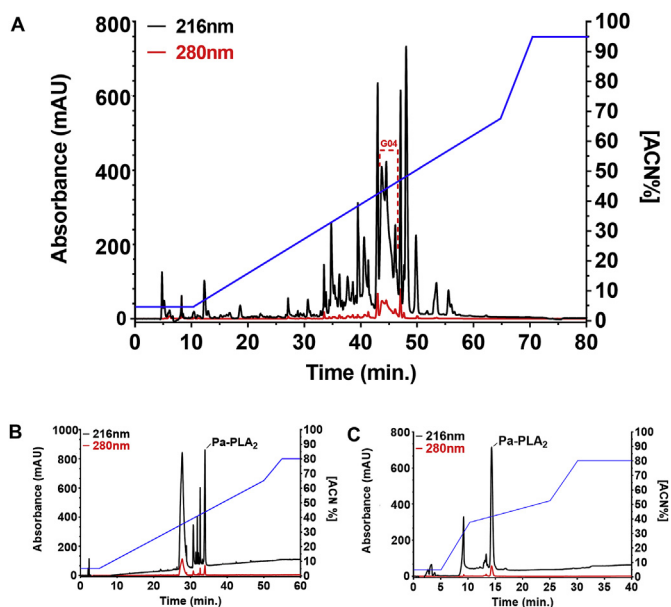


Figure 1. Chromatographic steps of Pa-PLA₂ isolation. On top, (A) shows the reverse-phase HPLC semi-preparative profile of the crude skin secretion of *Pithecopus azureus*. Below, the chromatograms of the two additional separation steps obtained from the G04 fraction showing (B) heterogeneous Pa-PLA₂ fraction and (C) homogeneous fraction of Pa-PLA₂ eluted at 44% acetonitrile gradient.

corresponds to a deconvoluted molecular mass of 15775.930 Da, as shown in Fig. 2B. The low intensity ions detected suggest the presence of minor isoforms of the same polypeptide with a similar glycosylation pattern.

The monoisotopic mass value of the deglycosylated Pa-PLA₂ was also determined by ESI-QTOF/MS as 14317.424 Da (Fig. 3).

3.3. Phospholipase activity test

Qualitative phospholipase activity of Pa-PLA₂ was determined by the direct incubation of buffered samples of the native glycosylated enzyme with the phospholipid DMPC ($[M + H]^+ = 678.50$ Da). The resulting products of this incubation under MALDI-TOF/MS mass analyses yielded three ions that confirmed PLA₂ activity on DMPC: a) $[M + H]^+ = 468.3$ Da, $[M + Na]^+ = 490.3$ Da and $[M + K]^+ = 506.3$ Da corresponding to the lysophosphatidic acid (Fig. 4A and B) and b) $[M + Na]^+ = 431.2$ Da corresponds to the lysophosphatidic acid with a loss of the methylamine group by a heterolytic cleavage in the mass spectrometer, whereas the ions m/z 426.0 Da, 438.1 Da, 445.0 Da and 452.1 were not identified (Insert Fig. 4A). Identical components were obtained when samples of DMPC were incubated with aliquots of lyophilized venom of *B. moojeni* under the same experimental conditions (Fig. 4B). Similar results were also observed for the deglycosylated enzyme, suggesting that the catalytic activity of Pa-PLA₂ qualitatively equivalent to its glycosylated form (data not shown).

3.4. Identification and characterization of N-glycans from Pa-PLA₂

The LC-MS/MS analysis of N-glycans released from denatured and S-alkylated Pa-PLA₂ after the treatment with PNGase F revealed a number of fractions and molecules eluting in different retention times (Fig. 5 and Supplementary Fig. S3). Among them, the MS/MS spectra of the ions $[M + Na]^+ = 763.376$ Da, $[M + Na]^+ = 967.482$ Da and $[M + Na]^+ = 1171.582$ Da indicate the presence of the glycan moieties GlcNAc₂Man, GlcNAc₂Man₂, GlcNAc₂Man₃, respectively. MS spectra were acquired for two other ions, $[M + Na]^+ = 1375.681$ Da and $[M + Na]^+ = 1579.783$ Da, consistent with the composition GlcNAc₂Man₄

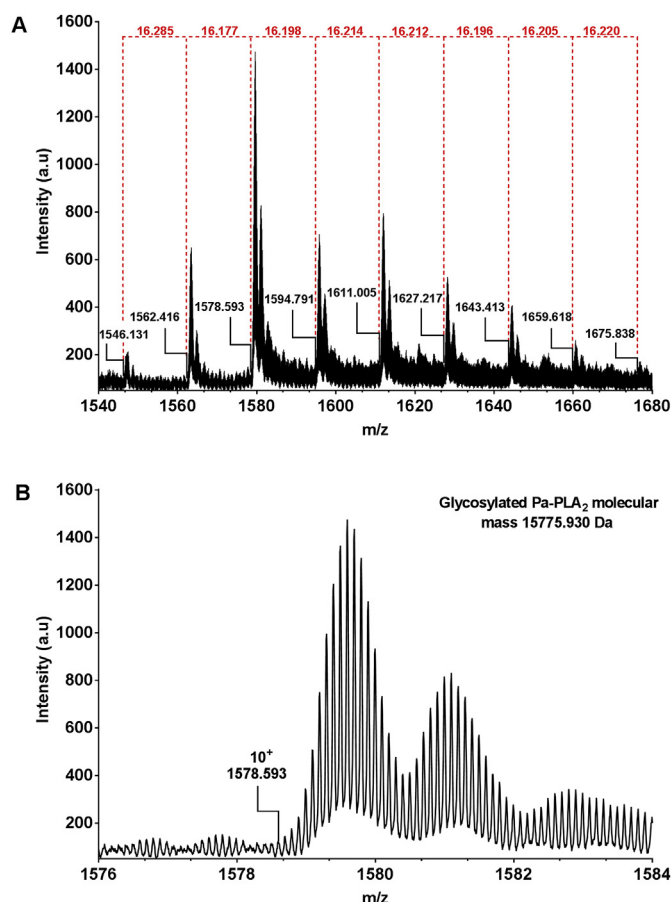


Fig. 2. Monoisotopic mass spectra of isolated Pa-PLA₂ analyzed by ESI-QTOF/MS. (A) Ion cluster $[M + 10H]^{10+}$ showing a mass increment of 16.2 Da (162 Da) correspondent to the molecular mass value of a hexose residue. (B) Detailed mass range showing the monoisotopic mass profile of the most intense signals related to the glycosylated Pa-PLA₂ ions.

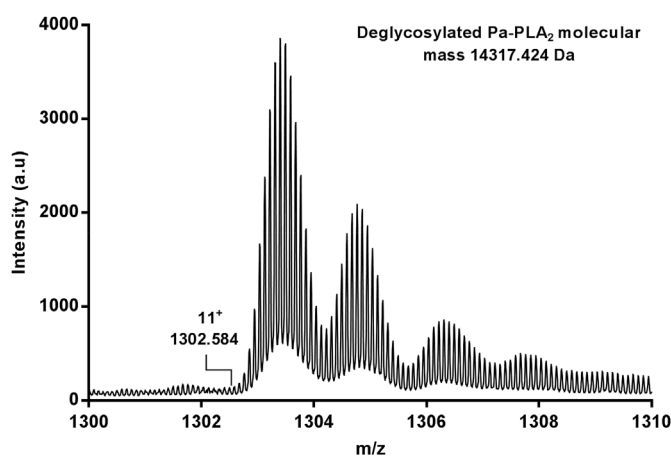


Fig. 3. Detailed mass spectrum range showing the monoisotopic ion cluster $[M + 11H]^{11+}$ of the deglycosylated Pa-PLA₂ obtained by ESI-TOF/MS.

and GlcNAc₂Man₅ (Fig. 6A e B), two other mannose-rich type glycans. However, due to low signal/noise ratio, MS/MS spectra were not obtained for these species and their identifications were assumed based on the mass accuracy of the MS measurements alone. It is noteworthy that more than one retention time were observed for each N-glycan in MS mode (Supplementary Fig. S3), suggesting the existence of structural isomers for each elucidated glycan composition.

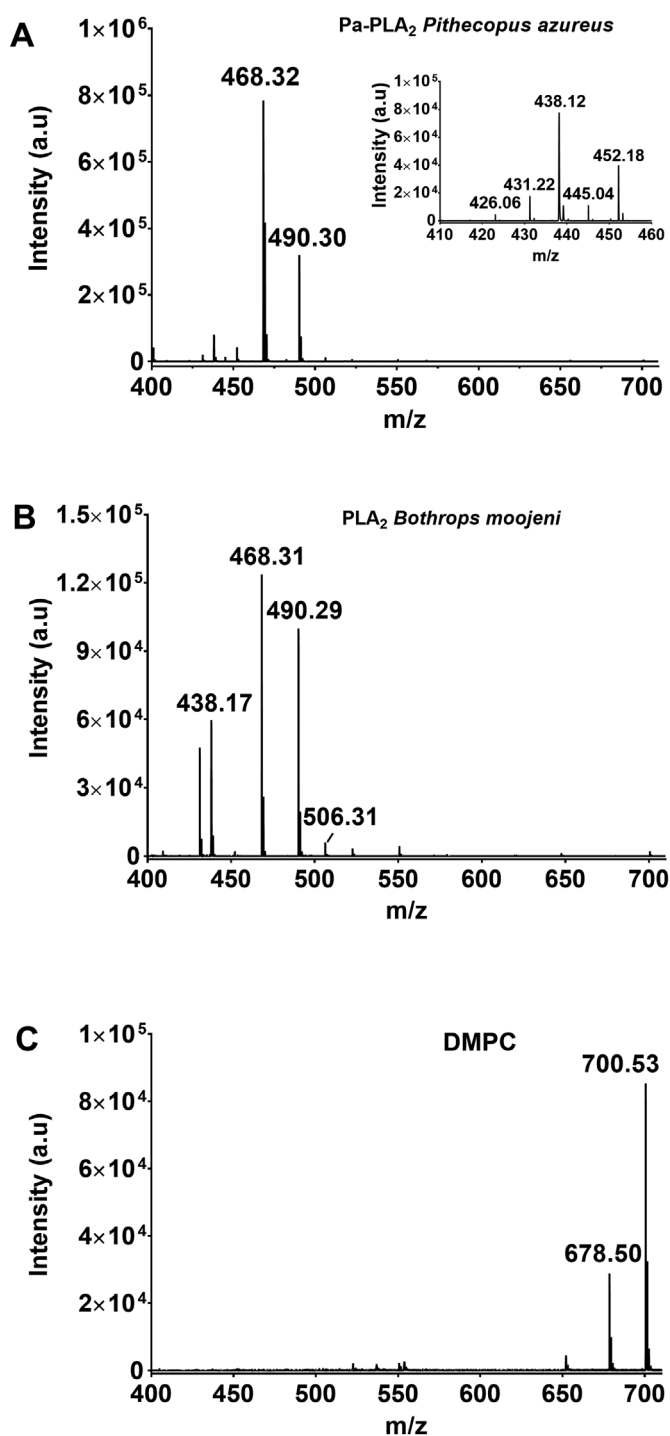


Figure 4. MALDI-TOF mass spectrometry analyses of the phospholipase catalytic products of DMPC ($[M + H]^+ = 678.50$ Da) after the incubation with Pa-PLA₂ in PBS buffer. (A) Mass spectrum showing the hydrolyzed DMPC products after 15 min incubation with Pa-PLA₂. (B) Mass spectrum showing the hydrolyzed DMPC products after 15 min incubation with *B. moojeni* venom (positive control), also indicating similar the PLA₂ cleavage at the *sn*-2 position of DMPC as above. (C) Mass spectrum showing the ions $[M + H]^+ = 678.5$ Da and $[M + Na]^+ = 700.5$ Da corresponding to DMPC intact molecule in the absence of PLA₂ activity (negative control).

3.5. Determination of the primary structure of Pa-PLA₂

Using MALDI in source decay fragmentation technique it was possible to unveil 41 residues that constitute the N-terminal portion of the

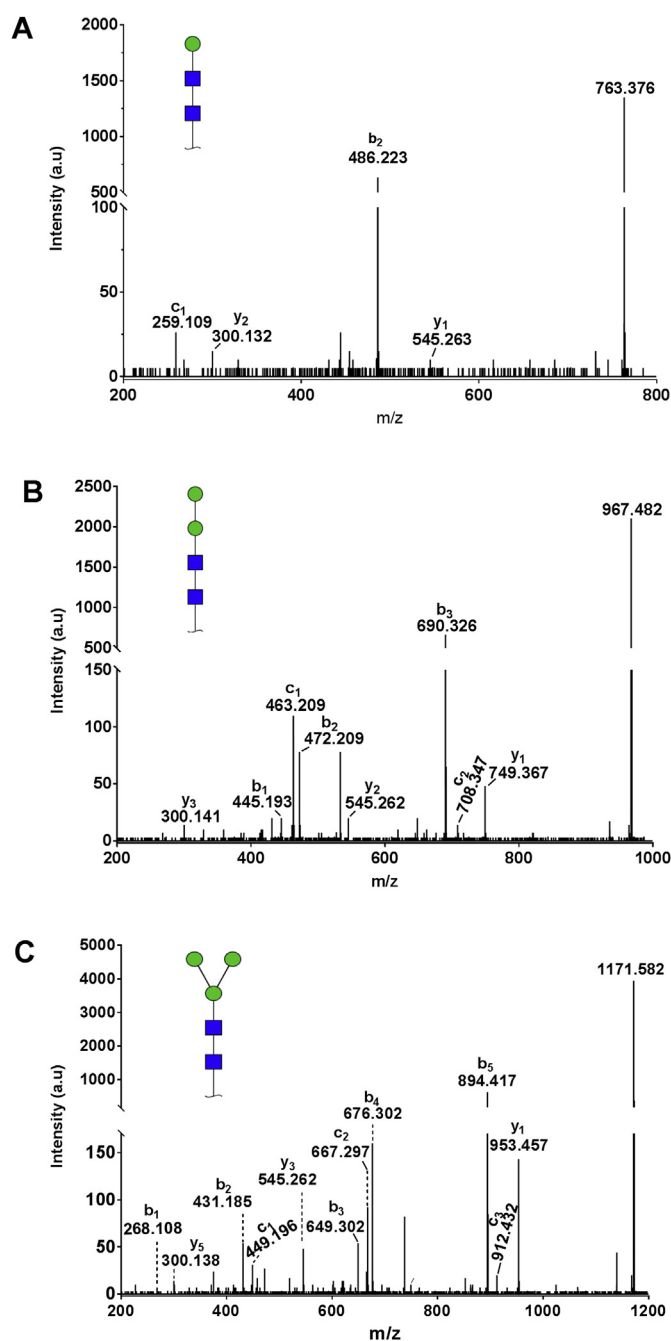


Fig. 5. Identification and structural characterization of the N-glycans released from the Pa-PLA₂ treated with PNGase F. MS/MS spectra of the precursors ions $[M + Na]^+ = 763.376$ Da (A), $[M + Na]^+ = 967.482$ Da (B) and $[M + Na]^+ = 1171.582$ Da (C), corresponding to the glycan moieties GlcNAc₂Man, GlcNAc₂Man₂, GlcNAc₂Man₃, respectively.

native Pa-PLA₂ (Fig. 7). The complete sequence of the N-terminal region of the mature Pa-PLA₂ was determined by the *de novo* sequencing of peptides obtained from tryptic proteolysis of the denatured and S-alkylated Pa-PLA₂ (Table 1, Fragments 1 and 2). Seven other tryptic fragments from Pa-PLA₂ were obtained and sequenced (Table 1, Fragments 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9). The complete primary structure of the mature Pa-PLA₂ was unequivocally determined by the summation of cDNA, accurate mass spectrometric and MS fragmentation data (Fig. 8). The MS/MS spectra of fragments 6 and 7 (Table 1) could not be acquired and their identities were confirmed by cDNA sequencing data (Supplementary Fig. S4; Fig. 8). The primary structure of Pa-PLA₂ was shown to have 14 cysteine residues involved in seven disulfide bonds.

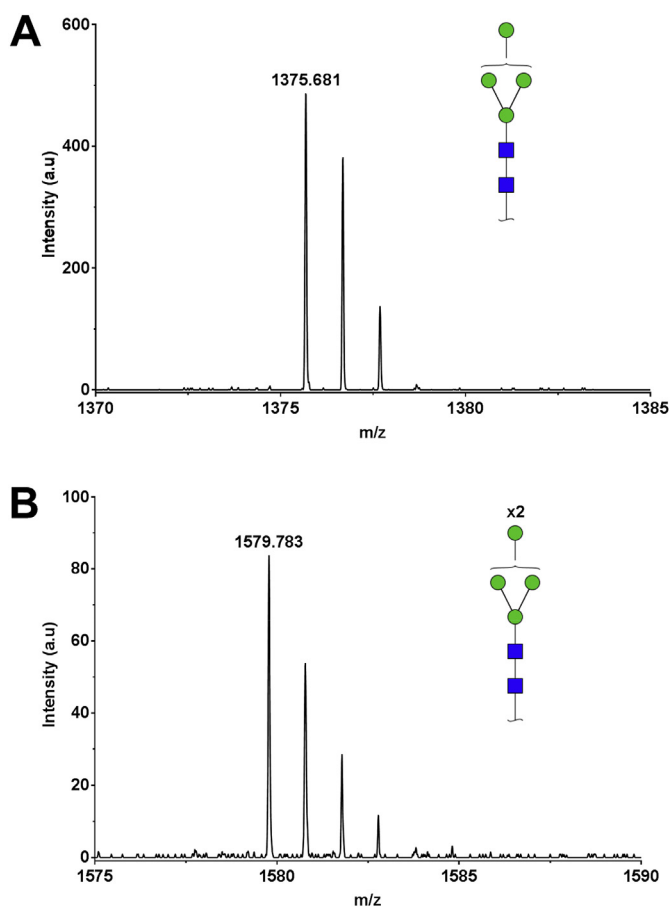


Fig. 6. Identification of the N-glycans released from the Pa-PLA₂ treated with PNGase F. (A) MS spectra showing ions $[M + Na]^+ = 1375.681$ Da and (B) $[M + Na]^+ = 1579.783$ Da, which are inferred to be related to glycan moieties GlcNAc₂Man₄ and GlcNAc₂Man₅, respectively.

Searches on NCBI non-redundant protein data bank indicated that the Pa-PLA₂ primary structure share significant degrees of amino acid identity with several proteins belonging to group II phospholipase A₂. Among them, those with the highest identities ($\geq 50\%$) were the ones

found in the viperid group of PLA₂'s sequences (Supplementary Fig. S5).

Once the primary structure of the Pa-PLA₂ protein was obtained (Fig. 8), the presence of two possible glycosylation sites in the Pa-PLA₂ polypeptide chain (N67 and N108) was inferred using a glycosylation prediction algorithm (NetNGlyc 1.0 Server) and by mass spectrometric analyses of the protein before and after deglycosylation under non-denaturing conditions (Fig. 9). Additional confirmation of the about glycosylation sites was obtained by MS/MS experiments on tryptic glycopeptides, more specifically, fragments 8 and 9 (Table 1), which revealed molecular mass values corresponding to GlcNAc₂Man₅ and GlcNAc₂Man₃ moieties, respectively (Supplementary Figs. S6 and S7).

3.6. Molecular modeling

The quality report of the Pa-PLA₂ molecular model shows only 6 and 18 residues in disallowed and allowed regions of the Ramachandran plot respectively. All these residues are located in loop section and are in a solvent exposed position (Supplementary Fig. S8). No steric clashes were detected. Pa-PLA₂ primary sequence shows 60% of similarity with PLA₂ found in the venom of *Agkistrodon halys* (Ah-PLA) (PDB:1JIA) (Zhao et al., 1998) and demonstrate a RMSD-C α value of 6.44 Å. This value is coherent with the large flexible loop regions present in both structures (Fig. 10A), and the final result of Pa-PLA₂ obtained after the submission of this molecule to molecular dynamics that creates a more relaxed structure compared to the Ah-PLA crystal.

The Pa-PLA₂ tridimensional structure is constituted of three helix regions, helix 1 (He1) from amino acid residue Phe3 to Thr13, helix 2 (He2) from Asp41 to Ser55 and helix 3 (He3) from Cys85 to Gln102, one β -wing (Bw1) from amino acid residue Asn67 to Val78 and 5 loops (Lo), Lo1 from Gly14 to Ile40, Lo2 from Ala56 to Tyr66, Lo3 from Ile71 to Asn74, Lo4 from Glu79 to Gly84 and Lo5 from residue His103 to Asn130 (Supplementary Fig. S1). Seven disulfide bonds stabilize important regions of the Pa-PLA₂: Cys56-Cys85, Cys50-Cys92 and Cys43-Cys99 preserve He2 and He3 structures that contain the catalytic pocket, Cys77-Cys90 restrain Bw1 to He3 and the remaining disulfide bonds Cys26-Cys121 and Cys49-Cys128 locks loop Lo5 to both He2 and Lo1 while Cys28-Cys44 locks Lo1 to He2 forcing a portion of Lo1 (Gly29 to Ala39) to shape into a pocket where a calcium ion is mounted in place (Fig. 10B). Additionally, Pa-PLA₂ present two possible N-Glycosylation sites in residues Asn67 located in the beginning of Bw1 and Asn108 in the middle of Lo5. One N-Glycosylation site is found in Ah-PLA in residue Asn70 set in Lo3 (Fig. 10A).

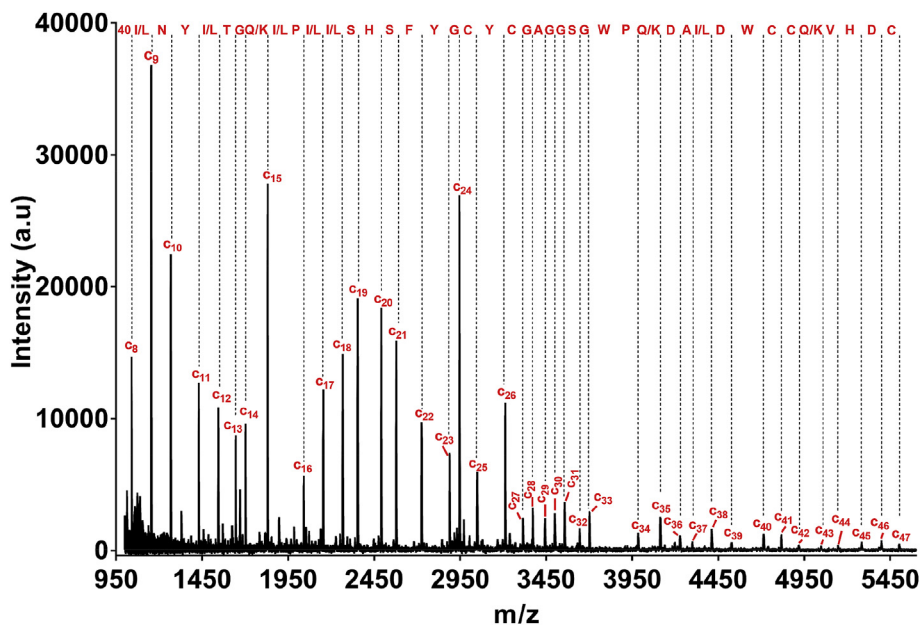


Fig. 7. Mass spectrum of the native Pa-PLA₂ analysis with the C-ions series assigned, corresponding to an internal fragment composed by 41 amino acid residues of the intact protein obtained by source decay (ISD) fragmentation method. The isobaric amino acids (K/Q and L/I) appear alternatively represented due a technical limitation to distinguish between them.

Table 1

List of tryptic fragment sequences from Pa-PLA₂ determined by Nano-LC-MS/MS and MALDI-TOF-MS and MS/MS data analysis. The identities of the isobaric amino acids (K/Q and I/L) were confirmed by cDNA sequencing.

Peptide	Sequence	[M + H] ⁺ Exp. (ESI)	[M + H] ⁺ Exp. (MALDI)	[M + H] ⁺ Theoretical
01	SLFQFR	797.432 Da	797.540 Da	797.430 Da
02	LMINYLTGK	1052.594 Da	Not detected	1052.580 Da
03	NLQCVETDTSGCPR	1636.692 Da	1636.703 Da	1636.705 Da
04	DAIDWCCQVHDCCYGR	2114.801 Da	2114.856 Da	2114.829 Da
05	LPILSHSFYGCYCGAGGSGWPK	2414.115 Da	2414.177 Da	2414.105 Da
06	RICECDR ^a	Not detected	1008.539 Da	1008.434 Da
07	ICECDR ^a	Not detected	852.403 Da	852.333 Da
08	GlcNAc ₂ Man ₅ LASICFQQHDAATYNSSNLDPK	3625.522 Da	Not detected	3625.536 Da
Peptide	Sequence	[M + 2H]²⁺ Exp. (ESI)	[M + 2H]²⁺ Exp. (MALDI)	[M + 2H]²⁺ Theoretical
09	GlcNAc ₂ Man ₃ MSASGCDPYFQPNFSYINK ^b	1641.066 Da	Not detected	1641.175 Da

^a Sequences inferred from MS and cDNA.

^b Partially elucidated sequence by MSMS spectra.

The calcium-binding loop is formed by a metal interaction from Ca²⁺ ion with Asp48 side chain and carbonyl oxygens from Tyr27, Gly29, Gly31 and four water molecules. Pa-PLA₂ active site dyad is very conserved compared to other PLA₂s (Supplementary Fig. S1).

In accordance to Verheij et al. (1980) that proposed a catalytic mechanism analogous to serine proteases (where the water molecule performs a nucleophilic attack to the lipid ester), the Pa-PLA₂ model presents the same structural and functional features, i.e., the imidazole ring of His47 picks up a proton from this water molecule powering the reaction. This proton is donated to alkoxy oxygen, throws a proton transfer from Asp93 to His47, thus finalizing the hydrolytic reaction. The Ca²⁺ ion binds to the negative charge of phosphate exposing the susceptible ester bond to the nucleophile.

4. Discussion

To our best knowledge, there have being only few studies reporting PLA₂ activity found in the cutaneous secretion of anurans (Conceição et al., 2007; Martins et al., 2007) some personal communications on

similar occurrence in related species and a predicted amino acid sequence of this enzyme, based on genomic information of *Xenopus tropicalis* (NCBI, 2016), without any experimental evidence to support its actual presence and activity on the skin of that specific animal. The present work describes the identification, characterization and primary structure of a glycosylated Phospholipase A₂ (Pa-PLA₂) isolated from the cutaneous secretion of *Pithecopus azureus*. The Pa-PLA₂ polypeptide chain is composed of 125 amino acid residues and has a monoisotopic molecular mass of 14317.424 Da, determined after deglycosylation.

The Pa-PLA₂ molecular model opened a substantial possibility to further investigations on the actual structural and functional similarities involving this amphibian skin secreted enzyme and other phospholipases A₂, in particular those from reptiles (*Crotalinae* and *Viperinae*) venoms (Dennis, 1994; Dufton and Hider, 1983; Harris and Scott-davey, 2013; Prigent-Dachary et al., 1980; Zhao et al., 1998). According to several structural studies (Burke and Dennis, 2009; Dennis et al., 2011; Dufton and Hider, 1983; Harris and Scott-davey, 2013; Schaloske and Dennis, 2006; Verheij et al., 1980), the tertiary structure of PLA₂'s comprises three α-helices, a calcium-binding loop, two

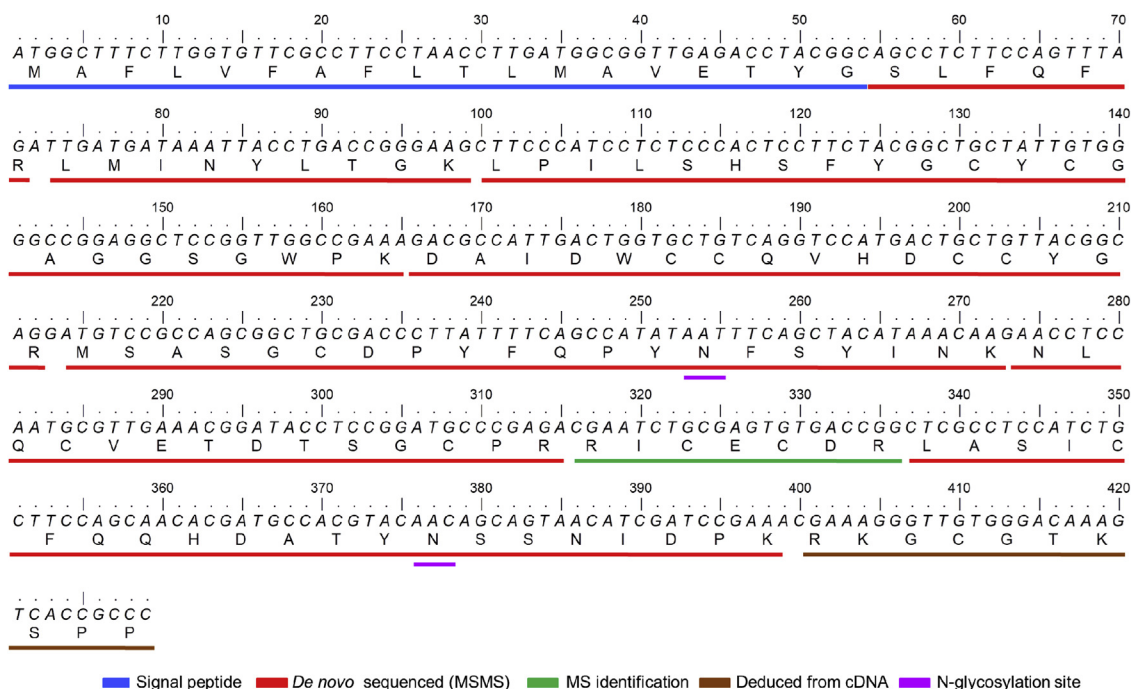


Fig. 8. The complete primary structure of Pa-PLA₂ elucidated by cDNA sequencing, mass spectrometry and protein chemistry techniques. In italics and in one letter code are represented the nucleic acid and the amino acid sequence, respectively. Solid lines segments in blue, red, green and pink, indicate the predicted signal peptide region, tryptic peptides sequences determined by MS/MS and MS and N-glycosylation sites, respectively. The segment in brown indicates the C-terminal sequence deduced from cDNA. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

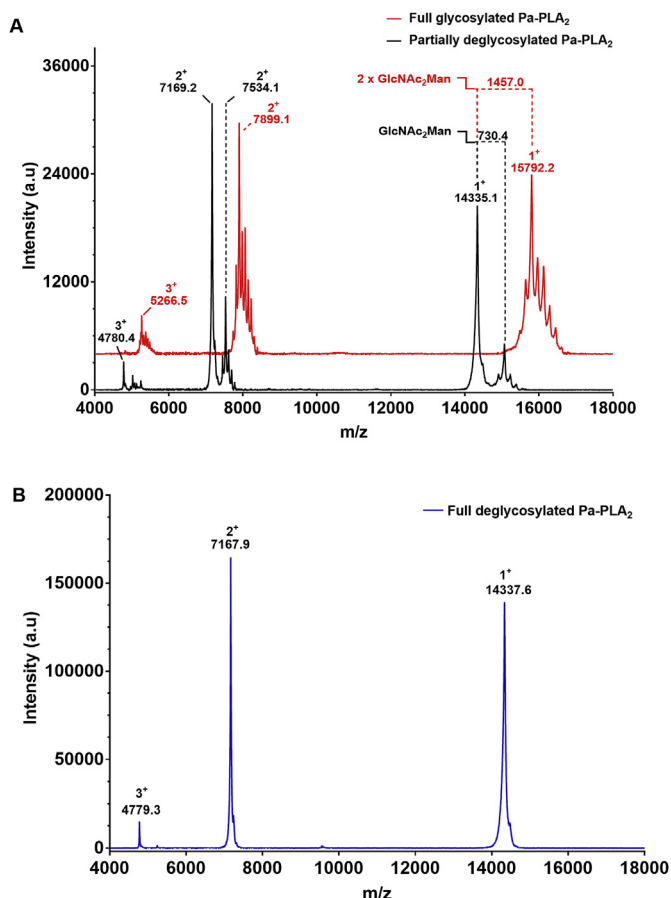


Fig. 9. MALDI-TOF/MS analyses of the glycosylation profile of Pa-PLA₂. (A) Linear mode mass spectrum corresponding to the MS analysis of glycosylated Pa-PLA₂ (red line) and partially deglycosylated (after 1 h of incubation with PNGase F) (black line). (B) Linear mode mass spectrum corresponding to the MS analysis of the totally deglycosylated Pa-PLA₂ after 16 h of incubation with PNGase F. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

antiparallel β -pleated sheets (β -wing) and a less conserved C-terminal region, as shown in our Pa-PLA₂ tridimensional model (Fig. 10). Accordingly, the Pa-PLA₂ framework is stabilized by seven disulfide bonds formed by highly conserved cysteine residues (Supplementary 1 and Figure 10), which is one of the most important structural features of group II PLA₂s (Burke and Dennis, 2009; Dennis, 1994; Dufton and Hider, 1983; Harris and Scott-davey, 2013; Phillips et al., 2005; Prigent-Dachary et al., 1980; Sobrinho et al., 2017). Moreover, the active site dyad (H47 e D48) of our Pa-PLA₂ model is highly conserved when compared to other group II PLA₂'s, which is a strong indicative of the conserved catalytic mechanism proposed by Verheij et al. (1980).

As demonstrated here, the two putative Pa-PLA₂ glycosylation sites (N67 and N108) are located far from the catalytic site (Fig. 10), and it is unlikely that the glycan moieties to cause any significant steric effects on the catalytic activity of this enzyme or even on specific regions of the interfacial recognition site (IRS) (Jain and Berg, 2006; Murakami et al., 2007). Moreover, according to a qualitative analysis, the Pa-PLA₂ enzymatic activity against DMPC seems to be not affected by deglycosylation. However, a quantitative evaluation must be carried out, since glycosylated and deglycosylated lysosomal phospholipase A₂ (hLPLA₂) were demonstrated to differ in their catalytic activities (Hiraoka et al., 2013; Solá and Griebenow, 2009). Furthermore, the glycosylation is supposed to play a role in protein stability (Moremen et al., 2012; Solá and Griebenow, 2009) and against proteolytic degradation (Veen et al., 2004).

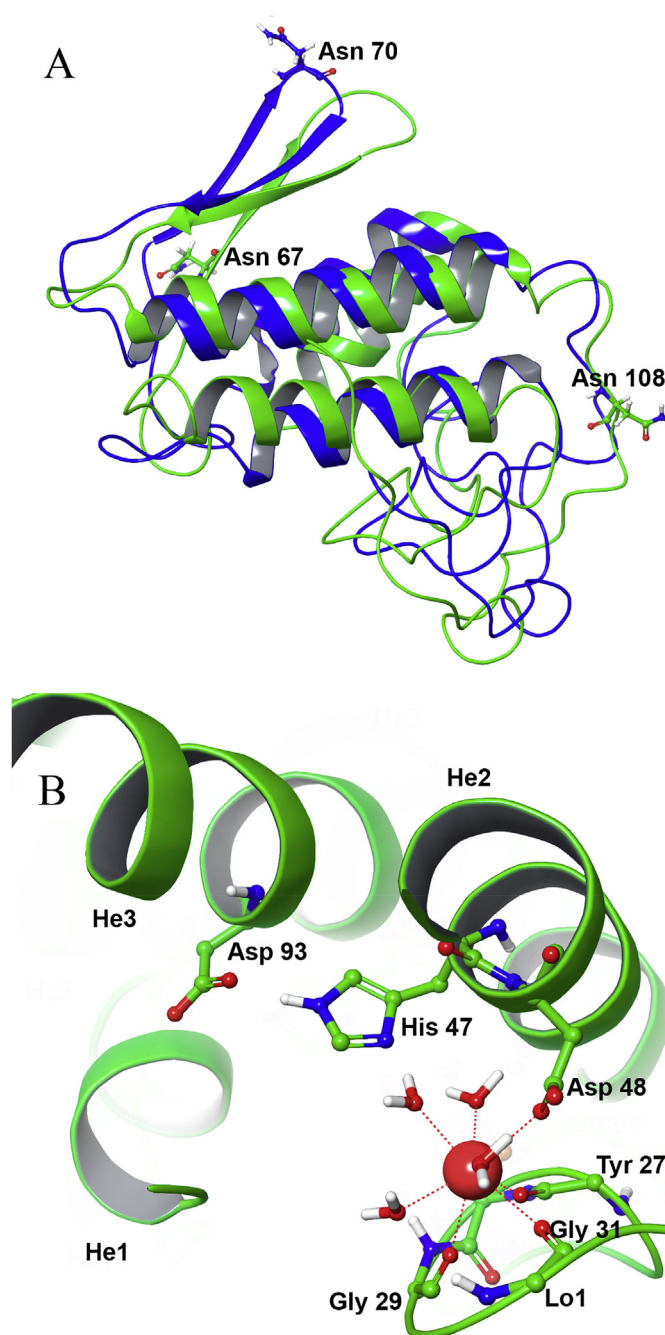


Fig. 10. Homology modeling prediction of the tridimensional structure of Pa-PLA₂. (A) Structure superposition of Pa-PLA₂ model (green) with the crystal resolved structure of Ah-PLA (blue). Asn67, Asn108 and Asn70 are the N-Glycosylation sites found in Pa-PLA₂ and Ah-PLA respectively. (B) Detailed view of Pa-PLA₂ catalytic site, showing the dyad His47, Asp93 and the water molecule as a nucleophile. Red sphere represents Ca²⁺ ion. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

According to our mass spectrometry experiments, the form of Pa-PLA₂ with short-chain glycans exhibits a GlcNAc₂Man moiety at both sites (N67 and N108). However, enzymes with more complex mannose-rich glycans at both N-glycosylation sites, such as GlcNAc₂Man₅, could be detected, as well as other combinations of different glycan compositions. Concerning the structures of the glycans identified in Pa-PLA₂, the detection of short chains mannose-rich, as found in insects, is noteworthy (Lai and Her, 2000). However, at this point of our findings, aligned with the scarcity of information on amphibian phospholipases

at present, an attempt to discuss the biochemical origins or the biological relevance of these small glycan moieties detected in the Pa-PLA₂ polypeptide chain would not be more than naive speculation.

Finally, the current knowledge on phospholipases associated to numerous physiological processes (Dennis et al., 2011) indicates that, at the present stage of our research, it would be not more than a speculative exercise to infer any consistent biological role played by Pa-PLA₂ in the cutaneous secretion of *P. azureus*. However, since Pa-PLA₂ appeared to be expressed constitutively at the skin of this anuran, it could well be linked to the maintenance of cell membrane homeostasis on epithelial tissues and/or to the defense mechanism of *P. azureus* against natural predators and pathogens. Therefore, it would be interesting to evaluate the potential synergistic effects involving the Pa-PLA₂ and various compounds present in the skin secretion, especially the protease inhibitors, antimicrobials and other noxious peptides (Raaymakers et al., 2017).

5. Conclusion

The identification and characterization of the phospholipase Pa-PLA₂ reported in this study extends a bit more our knowledge on the complex and rich molecular composition of the skin secretion of *Pithecopus azureus*. Our present findings reveal structural details of this novel polypeptide chain and its major post-translational modification (glycosylation) that, in turn, may embody a substantial meaning to what might be the real physiological role of this enzyme, especially when one considers the kind of environmental conditions on which *P. azureus* is submitted. Additionally, our data rise intriguing and more direct questions on amphibian's glycobiology that were not recorded in the specialized literature, so far.

Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interest.

Funding

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) directly supported the first author's research and PhD program. Other sources of funding: Serrapilheira Institute (Grant Number Serra-1708-16056) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Grant Number: 303750/2015-4).

Acknowledgments

We would like to thank Professor Spartaco Astolfi Filho and Dr. Alan Carvalho Andrade for providing some reagents and sequencing support. We are also grateful to Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Universidade de Brasília, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the infrastructure and material maintenance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.002>.

Ethical statement

The experiments were carried out in strict agreement with ethical standards under authorization of the legal Ethics Committee on Animal Use (Nº 013/2015) and the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Nº63740-1).

References

- Batista, C.V.F., Rosendo Da Silva, L., Sebben, A., Scaloni, A., Ferrara, L., Paiva, G.R., Olamendi-Portugal, T., Possani, L.D., Bloch Jr., C., 1999. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. *Peptides* 20, 679–686. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(99\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(99)00050-9).
- Bergh, C.J. Van Den, Slotboom, A.J., Verheij, H.M., Haas, G.H. de, 1988. The role of aspartic acid-49 in the active site of phospholipase A2. *Eur. J. Biochem.* 176, 353–357.
- Brand, G.D., Krause, F.C., Silva, L.P., Leite, J.R.S.A., Melo, J.A.T., Prates, M.V., Pesquero, J.B., Santos, E.L., Nakaie, C.R., Costa-neto, C.M., Bloch Jr., C., 2006. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides* 27, 2137–2146. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.04.020>.
- Brand, G.D., Leite, J.R.S.A., Silva, L.P., Albuquerque, S., Prates, M.V., Azevedo, R.B., Carregaro, V., Silva, J.S., Sá, V.C.L., Brandão, R.A., Bloch Jr., C., 2002. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: anti-trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. *JBC* 277, 49332–49340. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209289200>.
- Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23, 49–59. <https://doi.org/10.1007/s10557-008-6132-9>. Phospholipase A2.
- Conceição, K., Miriane Bruni, F., Antoniazzi, M.M., Jared, C., Camargo, A.C.M., Lopes-Ferreira, M., Pimenta, D.C., 2007. Major biological effects induced by the skin secretion of the tree frog *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Toxicon* 49, 1054–1062. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.12.010>.
- Conlon, J.M., Kolodziejek, J., Nowotny, N., 2009. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1556–1563. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.018>.
- Darby, N.J., Lackey, D.B., Smyth, D.G., 1991. Purification of a cysteine endopeptidase which is secreted with bioactive peptides from the epidermal glands of *Xenopus laevis*. *Zaevs* 70, 65–70.
- Davidson, F.F., Dennis, E.A., 1990. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms. *J. Mol. Evol.* 31, 228–238.
- Dennis, E.A., 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 269, 13057–13060.
- Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magriotti, V., Kokotos, G., 2011. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* 111, 6130–6185. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>. Phospholipase A2.
- Duellman, W.E., Trueb, L., 1994. In: Hopk, Johns (Ed.), *Biology of Amphibian*. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Dufton, M.J., Hider, R.C., 1983. Classification of phospholipases A₂ according to sequence. *Eur. J. Biochem.* 137, 545–551. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07860.x>.
- Erspamer, V., Vialli, M., 1951. Presence of eperamine in the skin of Amphibia. *Nature* 4260, 1033.
- Fenard, D., Lambeau, G., Maurin, T., Lefebvre, J.-C., Doglio, A., 2001. A peptide derived from bee venom-secreted phospholipase A2 inhibits replication of T-cell tropic HIV-1 strains via interaction with the CXCR4 chemokine receptor. *Mol. Pharmacol.* 60, 341–347. <https://doi.org/10.1124/mol.60.2.341>.
- Giovannini, M.G., Poulter, L., Gibson, B.W., Williams, D.H., 1987. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. *Biochem. J.* 243, 113–120.
- Grönroos, J.O., Laine, V.J., Janssen, M.J., Egmond, M.R., Nevalainen, T.J., 2001. Bactericidal properties of group IIA and group V phospholipases A2. *J. Immunol.* 166, 4029–4034. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.6.4029>.
- Han, S.K., Yoon, E.T., Scott, D.L., Sigler, P.B., Cho, W., 1997. Structural aspects of interfacial adsorption. *J. Biol. Chem.* 272, 3573–3582.
- Harris, J.B., Scott-davey, T., 2013. Secreted Phospholipases A2 of Snake Venoms: Effects on the Peripheral Neuromuscular System with Comments on the Role of Phospholipases A2 in Disorders of the CNS and Their Uses in Industry. pp. 2533–2571. <https://doi.org/10.3390/toxins5122533>.
- Harwig, S.S.L., Tan, L., Qu, X.-D., Cho, Y., Eisenhauer, P.B., Lehrer, R.I., 1995. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A2. *J. Clin. Investig.* 95, 603–610.
- Heinrikson, R.L., Krueger, E.T., Keim, P.S., 1977. Amino acid sequence of phospholipase A2 from *Crotalus adamanteus* A2-α from the venom. *J. Biol. Chem.* 252, 4913–4921.
- Hiraoka, M., Okamoto, K., Ohguro, H., Abe, A., 2013. Role of N-glycosylation of human lysosomal phospholipase A2 for the formation of catalytically active enzyme. *J. Lipid Res.* 54, 3098–3105. <https://doi.org/10.1194/jlr.M041640>.
- Hou, S., Xu, T., Xu, J., Qu, L., Xu, Y., Chen, L., Liu, J., 2017. Structural basis for functional selectivity and ligand recognition revealed by crystal structures of human secreted phospholipase A2 group IIE. *Sci. Rep.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11219-8>.
- Jain, M.K., Berg, O.G., 2006. Coupling of the i-face and the active site of phospholipase A2 for interfacial activation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.08.015>.
- Kim, J.-O., Chakrabarti, B.K., Guha-Niyogi, A., Louder, M.K., Mascola, J.R., Ganesh, L., Nabel, G.J., 2007. Lysis of human immunodeficiency virus type 1 by a specific secreted human phospholipase A2. *J. Virol.* 81, 1444–1450. <https://doi.org/10.1128/JVI.01790-06>.
- König, E., Bininda-Emonds, O.R.P., Shaw, C., 2015. The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides* 63, 96–117. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.11.003>.
- König, E., Wesse, C., Murphy, A.C., Zhou, M., Wang, L., Chen, T., Shaw, C., Bininda-Emonds, O.R.P., 2013. Molecular cloning of the trypsin inhibitor from the skin secretion of the Madagascan Tomato Frog, *Dyscophus guineti* (Microhylidae), and

- insights into its potential defensive role. *Org. Divers. Evol.* 13, 453–461. <https://doi.org/10.1007/s13127-013-0128-4>.
- Lai, C., Her, G., 2000. Analysis of phospholipase A2 glycosylation patterns from venom of individual bees by capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry using an ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 2012–2018.
- Leite, J.R.S.A., Silva, L.P., Rodrigues, M.L.S., Prates, M.V., Brand, G.D., Lacava, B.M., Azevedo, R.B., Bocca, A.L., Albuquerque, S., Bloch Jr., C., 2005. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the Phyllomedusa genus. *Peptides* 26, 565–573. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.11.002>.
- Libério, M. da S., Bastos, I.M.D., Júnior Pires, O.R., Fontes, W., Santana, J.M., Castro, M.S., 2014. The crude skin secretion of the pepper frog *Leptodactylus labyrinthicus* is rich in metallo and serine peptidases. *PLoS One* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096893>.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L., 2003. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicol* 42, 885–901. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2003.11.008>.
- Magalhães, M.T.Q., Barbosa, E.A., Prates, M.V., Verly, R.M., Munhoz, V.H.O., Araújo, I.E., Bloch, C.J., 2013. Conformational and functional effects induced by D- and L-amino acid epimerization on a single gene encoded peptide from the skin secretion of *hypsiboas punctatus*. *PLoS One* 8, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059255>.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgeson, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.L., Jarvie, T.P.,irage, K.B., Kim, J., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M., 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376–381. <https://doi.org/10.1038/nature03959>.
- Martins, M.J.P., Araújo, T.F., Higa, A.M., Noronha, M.D., Muniz, E.G., Medeiros, B.M., Lopez-Lozano, J.L., 2007. Phospholipase activity in skin secretion of *Amazonia anuran* (amphibia) species. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 13, 205.
- Mitsuishi, M., Masuda, S., Kudo, I., Murakami, M., 2006. Group V and X secretory phospholipase A2 prevents adenoviral infection in mammalian cells. *Biochem. J.* 393, 97–106. <https://doi.org/10.1042/BJ20050781>.
- Mizuno, K., Ohsuye, K., Wanda, Y., Fuchimura, K., Tanaka, S., Matsou, H., 1987. Cloning and sequence of cDNA encoding a peptide C-terminal A-amidating enzyme from *Xenopus laevis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 546–552.
- Morelle, W., Michalski, J.-C., 2007. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 2, 1585–1602. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.227>.
- Moremen, K.W., Tiemeyer, M., Nairn, A.V., 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 448–462. <https://doi.org/10.1038/nrm3383>.
- Mukherjee, A.K., 2014. A major phospholipase A 2 from *Daboia russellii russellii* venom shows potent anticoagulant action via thrombin inhibition and binding with plasma phospholipids. *Biochimie* 99, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.11.026>.
- Murakami, M.T., Viçoti, M.M., Abrego, J.R.B., Lourenzoni, M.R., Cintra, A.C.O., Arruda, E.Z., Tomaz, M.A., Melo, P.A., Arns, R.K., 2007. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA2 -active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA2 homologues. *Toxicol* 49, 378–387. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2006.10.011>.
- NCBI, 2016. PREDICTED: *Xenopus tropicalis* phospholipase A2 group IID (pla2g2d). mRNA [WWW Document]. NCBI Ref. Seq. XM_004916424.2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/847151364>.
- Owen, M.D., Pfaff, L.A.N.N., Reisman, R.E., Wypych, J., 1990. Phospholipase A2 in venom extracts from honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Toxicol* 28, 813–820.
- Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kalé, L., Schulten, K., 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.
- Prates, M.V., Sforça, M.L., Regis, W.C.B., Leite, J.R.S.A., Silva, L.P., Pertinhez, T.A., Araújo, A.L.T., Azevedo, R.B., Spisni, A., Bloch Jr., C., 2004. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the *Anuran Hyla punctata*. *J. Biol. Chem.* 279, 13018–13026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310838200>.
- Prigent-Dachary, J., Boffa, M.C., Boisseau, M.R., Dufourcq, J., 1980. Snake Venom Phospholipases A2: a fluorescence study of their binding to phospholipid vesicles correlation with their anticoagulant activities. *J. Biol. Chem.* 255, 7734–7739.
- Raaymakers, C., Verbrugghe, E., Hernot, S., Hellebuyck, T., Betti, C., Peleman, C., Claeys, M., Bert, W., Cavelliers, V., Ballet, S., Martel, A., Pasmans, F., Roelants, K., 2017. Antimicrobial peptides in frog poisons constitute a molecular toxin delivery system against predators. *Nat. Commun.* 8, 4–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01710-1>.
- Resende, J.M., Moraes, C.M., Prates, M.V., Cesar, A., Almeida, F.C.L., Mundim, N.C.C.R., Valente, A.P., Bemquerer, M.P., Piló-Veloso, D., Bechinger, B., 2008. Solution NMR structures of the antimicrobial peptides phylloseptin-1, -2, and -3 and biological activity: the role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations. *Peptides* 29, 1633–1644. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.06.022>.
- Resnick, N.M., Maloy, W.L., Guy, H.R., Zasloff, M., 1991. A novel endopeptidase from *Xenopus* that recognizes α -helical secondary structure. *Cell* 66, 541–554. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90017-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90017-9).
- Rollins-Smith, L.A., Conlon, J.M., 2005. Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 589–598. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.11.004>.
- Saikia, D., Thakur, R., Mukherjee, A.K., 2011. An acidic phospholipase A 2 (RVVA-PLA 2-D) purified from *Daboia russellii* venom exerts its anticoagulant activity by enzymatic hydrolysis of plasma phospholipids and by non-enzymatic inhibition of factor Xa in a phospholipids/Ca²⁺ independent manner. *Toxicol* 57, 841–850. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2011.02.018>.
- Schaloske, R.H., Dennis, E.A., 2006. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1761, 1246–1259. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.011>.
- Sobrinho, A.J.C., Kayano, A.M., Alfonso, J.J., Gomez, A.F., Vega, M.C., Zanchi, F.B., Moura, L.A., Vivian, R., 2017. Anti-platelet aggregation activity of two novel acidic Asp49-phospholipases A2 from *Bothrops brazili* snake venom. *Int. J. Biol. Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.069>.
- Solá, R.J., Griebenow, K.A.I., 2009. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* 98, 1223–1245. <https://doi.org/10.1002/jps.21504>.
- Stanley, D., 2006. The non-venom insect phospholipases A2. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1383–1390. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.05.011>.
- Taboada, C., Brunetti, A.E., Pedron, F.N., Carnevale, F., Estrin, D.A., Bari, S.E., Chemes, L.B., Lopes, N.P., Lagorio, M.G., Faivovich, J., 2017. Naturally occurring fluorescence in frogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 114, 3672–3677. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701053114>.
- Toledo, R.C., Jared, C., 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Camp. Biochem. Physiol.* 111, 1–29. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)98515-1](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)98515-1).
- Veen, H.A. Van, Geerts, M.E.J., Berkel, P.H.C. Van, Nuijens, J.H., 2004. The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 271, 678–684. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2003.03965.x>.
- Verheij, H.M., Volwerk, J.J., Jansen, E.H.J.M., Puyk, W.C., de Haas, G.H., Dijkstra, B.W., Drenth, J., 1980. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A2. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry* 19, 743–750. <https://doi.org/10.1021/bi00545a021>.
- Wegener, K.L., Wabnitz, P.A., Carver, J.A., Bowie, J.H., Chia, B.C.S., Wallace, J.C., Tyler, M.J., 1999. Host defence peptides from the skin glands of the Australian Blue Mountains tree-frog *Litoria citropa*. Solution structure of the antibacterial peptide citropin 1. *Eur. J. Biochem.* 265, 627–637.
- Weinrauch, Y., Elsbach, P., Madsen, L.M., Foreman, A., Weiss, J., 1996. The potent anti-Staphylococcus aureus activity of a sterile rabbit inflammatory fluid is due to a 14-kD phospholipase A2. *J. Clin. Investig.* 97, 250–257. <https://doi.org/10.1172/JCI118399>.
- Zhang, Y., Wang, M., Wei, S., 2010. Toxicol Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from the skin secretions of *Kalouala pulchra hainana*. *Toxicol* 56, 502–507. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2010.05.006>.
- Zhao, K., Song, S., Lin, Z., Zhou, Y., 1998. Structure of a basic phospholipase A2 from *Agkistrodon halys pallas* at 2.13 Å resolution. *Acta Crystallogr.* 54, 510–521. <https://doi.org/10.1107/S0907444997013644>.
- Zhao, K., Zhou, Y., Lin, Z., 2000. Structure of basic phospholipase A 2 from *Agkistrodon halys Pallas*: implications for its association, hemolytic and anticoagulant activities. *Toxicol* 38, 901–916.
- Zhao, Y., Jin, Y., Wei, S., Lee, W., Zhang, Y., 2005. Purification and characterization of an irreversible serine protease inhibitor from skin secretions of *Bufo andrewsi*. *Toxicol* 46, 635–640. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2005.07.003>.