UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Transcriptoma da glândula mucosa de *Rhinella schneideri*

Priscila Yumi Tanaka Shibao

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em toxicologia em 05/08/2016. A versão original encontrada

Ribeirão Preto
2016

RESUMO

SHIBAO, P. Y. T. **Transcriptoma da glândula mucosa de *Rhinella schneideri***. 2016. 118f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Bibliotecas de produtos naturais são fontes de moléculas com ações farmacológicas, com diversas aplicações biotecnológicas. Estes compostos apresentam alta especificidade para o alvo, resultante de longo processo de seleção natural, sendo interessantes como ferramentas de estudo e princípios ativos. Porém, apesar da riqueza de estruturas presentes em tais secreções, as dificuldades em obter moléculas puras em grandes quantidades, o alto custo e o tempo de purificação, tornam-se barreiras para seu uso. Assim, cada vez mais, as técnicas ômicas são usadas como uma alternativa para produção destas toxinas obtidas em maior escala. A transcriptômica, técnica que consiste na produção de biblioteca de cDNA a partir do RNA obtido da de organismo, tecido ou célula de interesse, é altamente relevante, já que identifica o material proteico que é realmente transcrito a partir do RNA obtido em determinado tempo e situação. Sapos ainda são animais pouco estudados, quando comparados a outros animais peçonhentos e venenosos, e um dos fatores responsáveis por isso é o baixo rendimento na purificação de toxinas de seu veneno. A fim de se identificar componentes presentes nas secreções do sapo *R. schneideri*, foi, primeiramente, realizada extração de RNA poli A⁺ das secreções recém obtidas das glândulas mucosas e das secreções armazenadas por 2 anos no laboratório. A secreção armazenada há dois anos revelou qualidade e quantidade mais apropriadas para o estudo e foi, portanto, usada como material de partida para a construção do transcriptoma por metodologia tradicional. Este transcriptoma resultou em 6 clones com boa qualidade, sendo que um deles, Rs02, apresentou similaridade com a região do pró peptídeo da odorranina. Uma vez que este transcriptoma não revelou resultados satisfatórios devido à sua baixa eficiência e visando maximizar o conhecimento sobre a secreção, um novo transcriptoma foi construído usando sequenciamento de nova geração, com sequenciador Illumina e RNA total extraído do tegumento contendo glândulas mucosas de um espécime como material de partida. O novo transcriptoma resultou em aproximadamente 131 milhões de *reads* brutos. Os *reads* foram filtrados de modo que apenas aqueles com boa qualidade (Q>20) fossem submetidos à montagem *de novo*. Esta etapa resultou em aproximadamente 130 milhões de *reads*, com média de 68 pb. Os *reads* foram então agrupados em *contigs* usando o programa SOAPdenovo2-Trans e submetidos a diversas abordagens de anotação funcional. Foram encontrados cDNAs codificantes de diversos peptídeos e proteínas com potencial aplicação biotecnológica. Além da abordagem ômica, ensaios de caracterização bioquímica, como atividade enzimática, cromatografia e eletroforese, auxiliaram a detecção de protease sem relatos prévios em secreções de sapo, uma fosfolipase A₂, bem como lectina e galectina. Adicionalmente, através do transcriptoma foram identificadas cobatoxinas, mucinas e ficolíinas. Portanto, este trabalho foi pioneiro no entendimento molecular do veneno da glândula mucosa de *R. schneideri* por métodos de vanguarda e análises bioquímicas.

Palavras chaves: *Rhinella schneideri*, NGS, transcriptoma, veneno

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1.Importância da toxinologia

A toxinologia é a área dedicada aos estudos de peçonhas e venenos de origem animal, vegetal e também proveniente de secreções de microrganismos. Tais secreções foram evolutivamente aprimoradas para predação, defesa ou competição intra e interespecífica (FRY et al., 2009; CASEWELL et al., 2012)

O uso de plantas, animais e microrganismos, seus extratos e secreções, como fontes de agentes ativos contra uma variedade de patologias e desequilíbrios homeostáticos são relatados desde tempos mais remotos (KOEHN e CARTER, 2005). As moléculas presentes nos produtos naturais, aprimoradas com funções específicas importantes para a sobrevivência do organismo, apresentam alta diversidade química e especificidade para seus alvos biológicos, tornando-as atrativa para descoberta de princípios ativos utilizados nas mais diversas terapias (NEWMAN e CRAGG, 2007). Tais características são resultantes da ação da pressão evolutiva que seleciona moléculas que reagem de modo mais efetivo com a proteína ou alvo em questão (KOEHN e CARTER, 2005).

Estas moléculas já são amplamente utilizadas no mundo contemporâneo: dentre fármacos com ação antibacteriana existem as estreptogaminas, derivadas de cepas de *Streptomyces spp*; antiparasitários, ivermectina, proveniente de *Actinoplanes sp*, e ramoplanina, derivada de *Streptomyces sp*; inibidores de transcriptase reversa, calanolida purificada da árvore *Calophyllum lanigerum* (SHU, 1998); e, provavelmente o exemplo mais famoso de uma molécula desenvolvida a partir de uma biblioteca natural, o inibidor da enzima conversora de angiotensina, o captopril, que é uma molécula semissintética desenhada com base na estrutura de um peptídeo purificado da peçonha de *Bothrops jararaca* (CUSHMAN e ONDETTI, 1991).

Neste contexto, venenos e peçonhas são ricas fontes de compostos ativos, já que são misturas complexas de proteínas, peptídeos, esteroides, alcaloides e aminas biogênicas, com sua composição variando de acordo com a função desempenhada para favorecer a sobrevivência do animal que o produz. Animais peçonhentos possuem aparelho inoculador de peçonha, e esta desempenha função importante para predação, defesa e alimentação do animal. Já os animais venenosos não possuem

aparato especializado e a secreção produzida está ligada à sua defesa contra predação (KOEHN e CARTER, 2005).

Atualmente, além do captopril, outros princípios ativos aprovados pelo órgão de regulação americana (FDA) incluem epitifibatide e tirofibrin, aprovados em 1998; ziconotide, em 2004 e a toxina botulínica, em estudo clínico, além daqueles que utilizaram toxinas como modelos para desenvolvimento de moléculas sintéticas ou semissintéticas (KING, 2011; HARVEY, 2014). A maioria destes compostos foi isolada de peçonha de serpentes e lagartos, principalmente pela maior quantidade de matéria prima que é produzida por tais animais (KING, 2013); porém tal panorama vem sendo modificado desde a geração ômica.

1.2.Toxinas de sapos

Os anfíbios, pertencentes à classe Amphibia, são divididos nas ordens Caudata, representados pelas salamandras, Gymnophiona, representados pelas “cobras-cegas” e ordem Anura, representados pelos sapos e rãs. Os sapos da espécie *Rhinella schneideri* pertencem à família Bufonidae, também conhecida como família dos sapos verdadeiros, e gênero *Rhinella*, previamente chamado Bufo. (WERNER, 1894; LUTZ, 1925). Acredita-se que a família Bufonidae originou-se no período Eoceno e desde então evoluiu entre os diversos gêneros (PRAMUK et al., 2008)

Na América do Sul, esta espécie de sapos pode ser encontrada tanto em áreas urbanas quanto em matas, principalmente no Paraguai, Bolívia, Argentina, Uruguai e Brasil. No Brasil, sapos da espécie *Rhinella schneideri* estão amplamente distribuídos em todo seu território, principalmente nas áreas de cerrado (FROST, DARREL R. 2016).

Esta espécie de sapo possui dois tipos de glândulas venenosas: granulosas e mucosas (Fig. 1). As glândulas granulosas são formadas por volumosas tuberosidades e estão localizadas na região pós-orbital do animal, sendo, por isso, também denominadas parotóides. Tal disposição está relacionada com a sobrevivência do animal, uma vez que o protegem contra ingestão por predadores. Ao se sentirem ameaçados, os animais inflam os pulmões, e as glândulas ganham destaque, fazendo com que o animal pareça maior. O veneno pode ser extraído por compressão mecânica e possui em sua composição duas classes majoritárias de moléculas: as aminas biogênicas e os esteroides. Além dessas moléculas, ainda podem ser

encontrados peptídeos e proteínas e glicoconjugados (BRAZIL e VELLARD, 1926; TOLEDO, 1995; CLARKE, 1997; JOHN W. DALY et al., 2005; MAILHO-FONTANA et al., 2013). A grande quantidade de micromoléculas biologicamente ativas nesta secreção está relacionada com a alimentação do animal. Estes sapos alimentam-se preferencialmente de besouros (ordem *Coleoptera*) e formigas (família *Formicidae*), apesar de variar a alimentação na ausência destes insetos (BATISTA, 2011)

Figura 1. Sapo *Rhinella schneideri*. O círculo azul indica a localização da glândula parotóide (glândula granulosa). Os círculos amarelos indicam a localização de algumas glândulas mucosas, que se encontram distribuídas por todo o corpo do animal

A partir da secreção da glândula granulosa (ou parotoide) já foram isoladas mais de 800 micromoléculas orgânicas ativas diferentes, com várias funções em diversos sistemas biológicos (DALY et al., 2005). Dentre as diferentes classes de micromoléculas orgânicas (Fig. 2), ressalta-se as bufogeninas e bufotoxinas, amplamente exploradas por sua ação no sistema cardíaco. Outras ações são relacionadas ao sistema imune (ANJOLETTE et al., 2015), regulação de atividade enzimática (SHIBAO et al., 2015) e efeitos antiproliferativos em células de câncer

(SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2014), ressaltando a importância de estudos sobre a ação de compostos provenientes destas secreções.

Figura 2. Exemplos de moléculas das principais classes orgânicas encontradas no veneno de *R. schneideri*. **A:** Bufogenina, um bufodienolídeo. **B:** Bufotenina, um alcaloide e **C:** bufotoxina, uma amina biogênica.

Já as glândulas mucosas podem ser encontradas em toda extensão do tegumento do sapo, e sua função está intimamente ligada à adaptação ao seu habitat. A secreção produzida é menos viscosa se comparada à secreção das glândulas granulosas e é importante para manutenção da umidade do tegumento do animal, retardando perda de água e evitando a desidratação, além de protegê-lo contra ressecamento e choques mecânicos. Sua constituição permite proteção mecânica contra microrganismos patogênicos, através do aprisionamento e imobilização no muco, e presença de possíveis compostos antifúngicos e bactericidas, provavelmente de caráter proteico (BRAZIL e VELLARD, 1926; CLARKE, 1997; DALY et al., 2005).

Desta secreção foram isolados peptídeos com ação farmacológica, pertencentes às classes da angiotensina, bombesina, bradisininas, caeruleinas e demorfinas, além de proteases responsáveis pela clivagem destes peptídeos a partir de polipeptídios maiores (BEVINS e ZASLOFF, 1990). Pode-se citar o isolamento e caracterização da proteína BAS-AH, com propriedades anti-HIV, isolada do *Bufo*

andrewsi (ZHAO et al., 2005); dos inibidores de tripsina, elafina e esculentina-1 das secreções de *Rana areolata* (ALI et al., 2002); e limonectinas a partir das secreções mucosas de *Limnonectes fujianensis* (WU et al., 2011). Assim, tal veneno é uma fonte rica e ainda pouco explorada de compostos ativos.

1.3. Transcriptoma e toxinologia

Apesar da grande diversidade e potencial de utilização de moléculas provenientes de fontes naturais, existe uma dificuldade muito grande em sua aplicação. Normalmente, os métodos tradicionais iniciam-se com uma etapa de fracionamento da mistura complexa buscando o isolamento de um composto único, para, em seguida, partir para sua caracterização estrutural e ensaios funcionais pertinentes. Atualmente, muitos autores utilizam cromatografia líquida de alta eficiência como passo inicial de fracionamento por apresentar boa resolução dos componentes, utilizando grande quantidade do veneno ou peçonha. No entanto, a obtenção de toxinas isoladas continua sendo o maior problema para o estudo de secreções de animais que produzem pouco veneno ou peçonha (VETTER et al., 2010). Além disso, existe ainda a dificuldade de purificação de moléculas a partir da mistura complexa obtida da planta/secreção animal/microrganismo, devido ao baixo rendimento e ao longo tempo necessário para tal purificação, comumente envolvendo diversas etapas e colunas com características distintas (SHU, 1998). Todos estes fatores acabam por encarecer e dificultar o estudo, consequentemente, a aplicação biotecnológica destas moléculas.

Neste panorama, nos últimos anos houve um grande salto no desenvolvimento e utilização de tecnologias “de ponta” para o estudo de toxinas. O termo venômica foi criado para abranger o uso de técnicas ômicas complementares que visam o estudo mais completo e aprofundado de toxinas, sendo elas a genômica, transcriptômica, proteômica e peptidômica (VETTER et al., 2010; CALVETE, 2012). Ademais, houve também um grande avanço em técnicas de bioinformática para integrar e analisar a grande quantidade de dados agora obtidos (KAAS e CRAIK, 2015).

Transcriptômica é tradicionalmente conceituado como o estudo dos transcritos presentes em uma célula ou tecido em determinado momento por meio da construção de bibliotecas de cDNA. O termo foi cunhado em 1997 quando o transcriptoma de *Saccharomyces cerevisiae* foi sequenciado, porém a tecnologia necessária para tais

estudos já havia sido descrito em 1977, quando Sanger (SANGER et al., 1977) criou o método de terminalização de cadeia para sequenciamento de cDNA, revolucionando a ciência na época. A partir de então, o sequenciamento ganhou destaque no meio científico, sendo parcialmente automatizado e utilizando fluoróforos após uma década (SMITH e ET AL., 1986) e, finalmente, disponível como método automatizado e comercializado no final da década seguinte (MARSH e ET AL., 1997).

A abordagem tradicional permite a criação de seu perfil através de etiquetas de sequências expressas (ESTs). Cada EST pode ser responsável por um peptídeo ou pode agrupar-se de modo a formar um *contig*, ou seja, uma sequência de DNA maior (VETTER et al., 2010; MCGETTIGAN, 2013). A técnica utiliza o RNA como base para que a enzima transcriptase reversa transcreva o cDNA. O cDNA sintetizado é, então, sequenciado, podendo ser utilizado para diversos fins. Assim, ao extrair o RNA total do veneno ou da glândula alvo, pode-se obter uma visão geral das proteínas e peptídeos que podem ser expressos no tecido (FORREST e CARNINCI, 2009).

O primeiro passo da construção do transcriptoma requer a obtenção do RNA total da amostra a ser analisada. No caso de venenos e peçonhas animais, utiliza-se a glândula de peçonha o que resulta na morte do animal. No intuito de evitar a eutanásia dos animais em estudo, alguns trabalhos sugeriram a obtenção do RNA a partir do veneno animal, no entanto, poucos alcançaram sucesso utilizando esta estratégia (CHEN et al., 2006; WU et al., 2011; CURRIER et al., 2012; BAI et al., 2013)

A utilização de ferramentas ômicas permite conhecer a composição do veneno/peçonha, contribuindo para a elucidação dos mecanismos de envenenamento, bem como para melhorar a qualidade da antivenômica. Também deve-se considerar a importância de bibliotecas no desenvolvimento de novas drogas terapêuticas para patologias que ainda não possuem tratamento adequado, bem como para a obtenção de possíveis ferramentas moleculares (CALVETE, 2009). A construção da biblioteca de cDNA utiliza a tecnologia do DNA recombinante, que constitui um conjunto de técnicas que permitem identificar, isolar e multiplicar genes de quaisquer organismos. Consequentemente, essas técnicas podem ser utilizadas com o objetivo de estudar mecanismos de replicação e expressão gênica, bem como a determinação da sequência de um gene e/ou proteína que ele codifica e desenvolver culturas microbianas capazes de produzir substâncias funcionais (insulina, hormônios, enzimas industriais). Além disso, bibliotecas de cDNA permitem analisar um organismo evolutivamente de acordo com seu perfil genético e identificar novos

peptídeos/proteínas na amostra analisada (WU et al., 2003), além de permitir análises filogenéticas, predição de isoformas por meio de *splicing* alternativo e compreensão de diversos tecidos e sistemas (SCHUSTER, 2008; ANSORGE, 2009; ZAVODNA et al., 2013).

Em meados dos anos 2000, houve outro marco histórico na era ômica: o lançamento do primeiro sequenciador de nova geração (do inglês *Next-Generation Sequencing* – NGS), que partindo da tecnologia de sequenciamento por síntese, permitiu a redução dos custos do sequenciamento além de aumentar a quantidade de dados gerados em um único sequenciamento (SCHUSTER, 2008; REIS-FILHO, 2010).

O NGS possibilitou o desenvolvimento do sequenciamento de RNA (RNA-seq), no qual o DNA complementar sintetizado a partir de RNAs é sequenciado em plataformas de alto rendimento, seguindo para as etapas de montagem e anotação funcional (WANG et al., 2008; MCGETTIGAN, 2013). A técnica do RNA-seq permite a análise de polimorfismos em nucleotídeos únicos (SNP), quantificação de transcritos expressos além de sua identificação no organismo, órgão, tecido ou, até mesmo, célula de partida (. Ainda, pode ser usado na elucidação da regulação fina da transcrição e tradução de proteínas por permitir identificação e estudo de RNAs não codificantes. (K e DOMSCHKE, 2016; KUERSTEN e ET AL., 2016)

Na construção de um transcriptoma, o fluxograma é iniciado como no modo tradicional: extração de RNA. Então, segue-se a síntese de cDNA a partir do RNA de interesse obtido, por meio de kits adequados, e sequenciamento que culmina com a criação de uma biblioteca virtual de dados (Fig. 3).

Figura 3. Fluxograma para análise de transcriptomas de maneira tradicional (Método de Sanger) e NGS. Ambas as técnicas têm o passo inicial comum de extração de RNA total a partir do material de origem. A integridade do RNA pode ser avaliada tanto usando gel de agarose 1% quanto utilizando o Número de Integridade do RNA (do inglês *RNA Integrity Number* – *RIN*) disponibilizado por análise em Bioanalyzer (Agilent Tech, Santa Clara, CA). A metodologia tradicional envolve clonagem do cDNA nos respectivos vetores e análise dos resultados. Já no NGS, não se realiza clonagem dos cDNAs, apenas sua amplificação e sequenciamento, com posterior notação dos resultados. Adaptado de (BRAHMA et al., 2014)

Por tratar-se de uma técnica relativamente nova, ainda há poucos trabalhos realizados utilizando o NGS no campo de toxinologia. Até a presente data, foram reportados 47 transcriptomas de serpentes, um dos grupos de animais peçonhentos mais estudados, sendo que 39 foram construídos a partir de metodologia tradicional, 8 por método de pirosequenciamento 454 e apenas 3 por plataforma Illumina (BRAHMA et al., 2014).

Tanto a abordagem tradicional, por meio de sequenciamento por método de Sanger, quanto NGS, têm suas vantagens e desvantagens. Se, por um lado, a abordagem tradicional permite que sejam lidos fragmentos de cDNA maiores, até 700 pb, facilitando a montagem de *contigs* (sequências montadas com segmentos contíguos de cDNA) e aumentando a frequência de *singlets* encontrados, a quantidade

de dados gerados é substancialmente menor que aqueles gerados por NGS (YEE e CONKLIN, 1998; NAGARAJ et al., 2006; MARTIN e WANG, 2011). Além disso, a criação de um transcriptoma por método tradicional resulta em uma biblioteca de plasmídeos, que podem ser diretamente clonados e expressos heterologicamente, enquanto no NGS isso não é possível; porém há a alternativa de sintetizar primer específico baseado nos dados de biblioteca virtual e, então partir para clonagem e expressão heteróloga. Ainda, no que concerne às análises de bioinformática, o algoritmo tradicional utilizado na montagem de dados obtidos em sequenciamento por método dideoxi necessita de muito mais espaço virtual do que o algoritmo usado em NGS, apesar de que tal fato pode ser compensado pela menor quantidade de dados gerados na abordagem tradicional.

Quanto aos anuros, o advento do sequenciamento de nova geração permitiu identificar novas moléculas a partir de secreções já estudadas anteriormente. De maneira especial, o foco em peptídeos antimicrobianos e fatores de regulação de expressão gênica puderam ser melhor entendidos e abordados. Estudos utilizando NGS limitam-se a temática relacionada à ecologia e biodiversidade (ZAVODNA et al., 2013), evolução e adaptação para habitats com grande altitude (YANG et al., 2012), proteínas relacionadas a função de regeneração em salamandras (ABDULLAYEV et al., 2013), descoberta de novas proteínas com possível ação farmacológica a partir de mistura de ovidutos de rãs chinesas (ZHANG et al., 2013). Até a presente data, não foram relatados estudos utilizando NGS para identificação de toxinas de sapo.

Por outro lado, a metodologia tradicional de construção de transcriptoma permitiu a produção de diversos componentes do veneno em quantidade suficiente para caracterização estrutural e funcional. Chen e colaboradores (CHEN, FARRAGHER, et al., 2003) construíram bibliotecas de cDNA de diversas espécies de sapos e rãs (*X. laevis*, *R. pipiens*, *Bombina maxima*, *L. caerulea*), o que resultou na identificação de peptídeos com atividade anti-protozoárias, anticancerígenos e anti-HIV. Outros estudos identificaram e produziram peptídeos inibidores de serinoprotease a partir do veneno de *Bombina orientalis* e *Bombina variegata* (CHEN e SHAW, 2003). O grupo de Wang obteve êxito na identificação de um novo grupo de peptídeos com atividade antimicrobiana no veneno da rã *Bombina máxima* (WANG et al., 2005). Ademais, o transcriptoma feito com o veneno da rã da espécie *Phyllomedusa nordestina*, também endêmica no território brasileiro, revelou que a maior parte do veneno tem potencial farmacológico, uma vez que foram encontradas sequências que

codificam peptídeos antimicrobianos (25,5%), hipotensores (23,4%), agonistas de receptores opioides (27,6%) e inibidores enzimáticos (19,1%), ressaltando, assim, a importância deste tipo de estudo para a descoberta de potenciais novos fármacos (NEIVA et al., 2012).

Diante do panorama listado acima, o projeto proposto visa a produção de biblioteca de cDNA a partir do RNA obtido do veneno liofilizado de *Rhinella schneideri* extraído da glândula mucosa, bem como do RNA isolado da glândula em si, visando a elucidação da composição do veneno, identificação de possíveis peptídeos e proteínas com potencial aplicação biotecnológica. A biblioteca de cDNA permitirá futuros estudos de clonagem e expressão heteróloga de toxinas bem como, estudos sobre relação estrutura/atividade, mecanismos moleculares, além de estudos sobre o próprio veneno.

Conclusões

4. CONCLUSÕES

- A amostra de veneno bruto da glândula mucosa liofilizada e armazenada há 2 anos no laboratório apresentou melhor rendimento e qualidade de material genético;
- A construção da biblioteca por método de Sanger não resultou em número satisfatório de ESTs, mas foi possível identificar uma sequência de PAM;
- A construção da biblioteca virtual de RNA resultou em um banco de dados inovador e inédito, com sequências codificantes de peptídeos e proteínas extremamente relevantes para a sobrevivência do animal e com potencial aplicação biotecnológica;
- O fracionamento do veneno resultou em 26 frações, sendo que 4 delas (Vm1, Vm24, Vm25 e Vm26) apresentam compostos de caráter proteico, sendo possível identificar lectinas e fosfolipase A2.

Referências

5. REFERÊNCIAS

- ABDULLAYEV, I. et al. A reference transcriptome and inferred proteome for the salamander *Notophthalmus viridescens*. **Exp Cell Res**, v. 319, n. 8, p. 1187-97, 2013.
- ALI, M. F. et al. Antimicrobial peptides and protease inhibitors in the skin secretions of the crawfish frog, *Rana areolata*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1601, p. 55-63, 2002.
- ANJOLETTE, F. A. et al. Biological characterization of compounds from *Rhinella schneideri* poison that act on the complement system. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 21, p. 25, 2015.
- ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. **N Biotechnol**, v. 25, n. 4, p. 195-203, 2009.
- BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. In: (Ed.). **Pharmaceuticals (Basel)**, v.6, 2013. p.1543-75. ISBN 1424-8247 (Electronic).
- BAI, B. et al. The structures of four bombesins and their cloned precursor-encoding cDNAs from acid-solvated skin secretion of the European yellow-bellied toad, *Bombina variegata*. **Peptides**, v. 36, n. 2, p. 221-9, 2012.
- BAI, B. et al. Parallel peptidome and transcriptome analyses of amphibian skin secretions using archived frozen acid-solvated samples. **Mol Biotechnol**, v. 54, n. 2, p. 187-97, 2013.
- BARRA, D.; SIMMACO, M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. **Trends Biotechnol**, v. 13, p. 205-9, 1995.
- BATISTA, C. D. C. D.-C., CRIZANTO BRITO; FREITAS, EVELLYN BORGES; FRANCO, STEPHANE DA CUNHA; BATISTA, CASSIO DE CARVALHO; COELHO, WELLINGTON ARAÚJO; FARIA, RENATO GOMES. Diet of *Rhinella schneideri* (Werner, 1894) (Anura: Bufonidae) in the Cerrado, Central Brazil. **Herpetology Notes**, v. 4, p. 17-21, 2011.
- BEN BACHA, A.; ABID, I. Secretory phospholipase A2 in dromedary tears: a host defense against staphylococci and other gram-positive bacteria. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 169, n. 6, p. 1858-69, 2013.
- BEVINS, C. L.; ZASLOFF, M. Peptides from Frog Skin. **Annual Review of Biochemistry**, v. 59, p. 395-414, 1990.
- BIANCHET, M. A. et al. Soluble beta-galactosyl-binding lectin (galectin) from toad ovary: crystallographic studies of two protein-sugar complexes. **Proteins**, v. 40, n. 3, p. 378-88, 2000.

BRAHMA, R. K. et al. Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. **Toxicon**, v. 93, p. 1-10, 2014.

BRAZIL, V.; VELLARD, J. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DOS BATRACHIOS. **Memórias do Instituto de Butantan**, v. 3, p. 7-70, 1926.

BUCHHOLZ, D. R.; HAYES, T. B. Variation in thyroid hormone action and tissue content underlies species differences in the timing of metamorphosis in desert frogs. **Evol Dev**, v. 7, n. 5, p. 458-67, 2005.

CALVETE, J. J. Venomics: digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. In: (Ed.). **J Proteomics**. Netherlands, v.72, 2009. p.121-6. ISBN 1874-3919 (Print).

_____. Venomics, what else? **Toxicon**, v. 60, p. 427-33, 2012.

CAMBY, I. et al. Galectin-1: a small protein with major functions. **Glycobiology**, v. 16, n. 11, p. 137r-157r, 2006.

CASEWELL, N. R. et al. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. **Trends Ecol Evol**, v. 28, n. 4, p. 219-29, 2012.

CHEN, T. et al. Granular gland transcriptomes in stimulated amphibian skin secretions. **Biochem J**, v. 371, n. Pt 1, p. 125-30, 2003.

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

CHEN, T.; TANG, L.; SHAW, C. Identification of three novel *Phyllomedusa sauvagei* dermaseptins (sVI-sVIII) by cloning from a skin secretion-derived cDNA library. **Regul Pept**, v. 116, n. 1-3, p. 139-46, 2003.

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

CHOI, J. K. The fine structure of the urinary bladder of the toad, *Bufo marinus*. **J Cell Biol**, v. 16, p. 53-72, 1963.

CHOPRA, R. et al. Comparisons of de novo transcriptome assemblers in diploid and polyploid species using peanut (*Arachis spp.*) RNA-Seq data. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. 1-16, 2014.

CLARKE, B. T. THE NATURAL HISTORY OF AMPHIBIAN SKIN SECRETIONS, THEIR NORMAL FUNCTIONING AND POTENTIAL MEDICAL APPLICATIONS. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 72, n. 03, p. 365 - 379, 1997.

CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. **Biochim Biophys Acta**, v. 1696, p. 1-14, 2004.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 22, p. 10881-90, 1988.

CURRIER, R. B. et al. Unusual Stability of Messenger RNA in Snake Venom Reveals Gene Expression Dynamics of Venom Replenishment. **Plos One**, v. 7, p. 1-10, 2012.

CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v. 17, p. 589-92, 1991.

DALY, J. W.; SPANDE, T. F.; GARRAFFO, H. M. Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. **J Nat Prod**, v. 68, p. 1556-75, 2005.

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1462, p. 71-87, 1999.

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, n. 3, p. 228-38, 1990.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **Eur J Biochem**, v. 1, n. 1, p. 80-91, 1967.

ERGUNER, B.; USTEK, D.; SAGIROGLU, M. S. Performance comparison of Next Generation sequencing platforms. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc., 2015, United States. Piscataway, NJ : IEEE Service Center, c2004-.

FLETCHER, R. B.; WATSON, A. L.; HARLAND, R. M. Expression of *Xenopus tropicalis* *noggin1* and *noggin2* in early development: two *noggin* genes in a tetrapod. **Gene Expr Patterns**, v. 5, n. 2, p. 225-30, 2004.

FORREST, A. R.; CARNINCI, P. Whole genome transcriptome analysis. **RNA Biol**, v. 6, p. 107-12, 2009.

FRY, B. G. et al. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 10, p. 483-511, 2009.

FRY, B. G. et al. Functional and structural diversification of the Anguimorpha lizard venom system. **Mol Cell Proteomics**, v. 9, n. 11, p. 2369-90, 2010.

GENDLER, S. J.; SPICER, A. P. Epithelial mucin genes. **Annu Rev Physiol**, v. 57, p. 607-34, 1995.

HARVEY, A. L. Toxins and drug discovery. **Toxicon**, v. 92, p. 193-200, 2014.

HEILIG, R. et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 14. **Nature**, v. 421, n. 6923, p. 601-7, 2003.

HELLSTEN, U. et al. The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. **Science**, v. 328, n. 5978, p. 633-6, 2010.

HERNANDEZ-OLIVEIRA, S. et al. Biochemical, pharmacological and structural characterization of a new PLA2 from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom. **Protein J**, v. 24, n. 4, p. 233-42, 2005.

HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. **Glycobiology**, v. 3, n. 4, p. 297-304, 1993.

HO, S. B. et al. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. **Cancer Res**, v. 53, n. 3, p. 641-51, 1993.

HUANG, L. et al. Comparative transcriptome analyses of seven anurans reveal functions and adaptations of amphibian skin. **Sci Rep**, v. 6, p. 24069, 2016.

JOHN W. DALY; THOMAS F. SPANDE, A.; GARRAFFO, H. M. Alkaloids from Amphibian Skin: A Tabulation of Over Eight-Hundred Compounds. 2005.

JOUIROU, B. et al. Cobatoxin 1 from *Centruroides noxius* scorpion venom: chemical synthesis, three-dimensional structure in solution, pharmacology and docking on K⁺ channels. **Biochem J**, v. 377, n. Pt 1, p. 37-49, 2003.

K, G. D.; DOMSCHKE. Making sense of deep sequencing. - PubMed - NCBI. 2016.

KAAS, Q.; CRAIK, D. J. Bioinformatics-Aided Venomics. **Toxins (Basel)**, v. 7, p. 2159-87, 2015.

KAPTAN, E.; BOLKENT, S. Seasonal lectin binding variations of thumb pad in the frog (*Pelophylax ridibundus*). **J Morphol**, v. 275, n. 1, p. 76-86, 2014.

KAWAI, Y.; ANNO, K. Glycopeptides from the egg jelly coat of the toad *Bufo vulgaris*. **Biochim Biophys Acta**, v. 381, n. 1, p. 195-202, 1975.

KING, G. Venoms to Drugs: Translating Venom Peptides into Therapeutics. **Australian Biochemist**, v. 44, n. 3, p. 4, 2013.

KING, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opin Biol Ther**, v. 11, n. 11, p. 1469-84, 2011.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-40, 2004.

KLEIN, S. L. et al. Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. **Dev Dyn**, v. 225, n. 4, p. 384-91, 2002.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, p. 206-20, 2005.

KONISHI, Y. et al. Molecular cloning and multifunctional characterization of host defense peptides from the bullfrog Harderian gland with special reference to catesbeianalexin. **Zoolog Sci**, v. 30, n. 3, p. 185-191, 2013.

KUERSTEN, S.; ET AL. Translation regulation gets its 'omics' moment. - PubMed - NCBI. 2016.

LACOMBE, C. et al. Peptide secretion in the cutaneous glands of South American tree frog *Phyllomedusa bicolor*: an ultrastructural study. **Eur J Cell Biol**, v. 79, p. 631-41, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LAI, R. et al. A novel proline rich bombesin-related peptide (PR-bombesin) from toad *Bombina maxima*. **Peptides**, v. 23, n. 3, p. 437-42, 2002.

LI, J. et al. Anti-infection peptidomics of amphibian skin. **Mol Cell Proteomics**, v. 6, p. 882-94, 2007.

LOPEZ-LUCENDO, M. F. et al. Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. **J Mol Biol**, v. 343, n. 4, p. 957-70, 2004.

LUTZ, A. Batraciens du Brésil. **Comptes Rendus et Mémoires Hebdomadaires des Séances de la Société de Biologie et des ses Filiales**, v. 93, n. 2, p. 137-139, 1925.

MAILHO-FONTANA, P. L. et al. Passive and active defense in toads: the parotoid macroglands in *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus*. **J Exp Zool A Ecol Genet Physiol**, v. 321, n. 2, p. 65-77, 2013.

MARSH, M.; ET AL. High-throughput DNA sequencing on a capillary array electrophoresis system. **J Capillary Electrophor**, v. 2, n. 4, p. 83-89, 1997.

MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 10, p. 671-82, 2011.

MATSUSHITA, M. Ficolins in complement activation. **Mol Immunol**, v. 55, n. 1, p. 22-6, 2012.

MCGETTIGAN, P. A. Transcriptomics in the RNA-seq era. **Curr Opin Chem Biol**, v. 17, p. 4-11, 2013.

MOREAU, J. M. et al. Phospholipase A(2) in rabbit tears: a host defense against *Staphylococcus aureus*. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, n. 10, p. 2347-54, 2001.

MORELLE, W.; STRECKER, G. Structural analysis of hexa to dodecaoligosaccharide-alditols released by reductive beta-elimination from oviducal mucins of *Bufo bufo*. **Glycobiology**, v. 7, n. 8, p. 1129-51, 1998.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A2. **J Biochem**, v. 131, n. 3, p. 285-92, 2002.

NAGARAJ, S. H.; GASSER, R. B.; RANGANATHAN, S. A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. **Brief Bioinform**, v. 8, n. 1, p. 6-21, 2006.

NEIVA, M. et al. Gene expression analysis by ESTs sequencing of the Brazilian frog *Phyllomedusa nordestina* skin glands. **Toxicon**, v. 61, p. 139-50, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**, v. 70, p. 461-77, 2007.

OMPRABA, G. et al. Identification of a novel family of snake venom proteins Veficolins from *Cerberus rynchops* using a venom gland transcriptomics and proteomics approach. **J Proteome Res**, v. 9, n. 4, p. 1882-93, 2010.

ONUMA, Y. et al. A lectin-based glycomic approach to identify characteristic features of *Xenopus* embryogenesis. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56581, 2013.

PEIREN, N. et al. Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. **Toxicon**, v. 52, n. 1, p. 72-83, 2008.

PEREZ DI GIORGIO, J. et al. Prediction of aquaporin function by integrating evolutionary and functional analyses. **J Membr Biol**, v. 247, n. 2, p. 107-25, 2013.

PRAMUK, J. B. et al. Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). **Global Ecology and Biogeography**, v. 17, p. 72-83, 2008.

QIAO, L. et al. Transcriptome profile of the green odorous frog (*Odorrana margaretae*). **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75211, 2013.

REDDY, K. V.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **Int J Antimicrob Agents**, v. 24, p. 536-47, 2004.

REIS-FILHO, J. S. Next-generation sequencing. **Breast Cancer Res**, v. 11 Suppl 3, p. S12, 2010.

RINALDI, A. C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario: Commentary. v. 6, p. 799–804, 2002.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Web Server issue, p. W320-4, 2014.

ROSENBLUM, E. B. et al. Only skin deep: shared genetic response to the deadly chytrid fungus in susceptible frog species. **Mol Ecol**, v. 21, n. 13, p. 3110-20, 2012.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, p. 5463-7, 1977.

SAVAGE, A. E. et al. Conservation and divergence in the frog immunome: pyrosequencing and de novo assembly of immune tissue transcriptomes. **Gene**, v. 542, n. 2, p. 98-108, 2014.

SCHAFFNER, A. R. Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? **Planta**, v. 204, n. 2, p. 131-9, 1998.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal Biochem**, v. 166, n. 2, p. 368-79, 1987.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Antiproliferative activity and new argininyl bufadienolide esters from the "cururu" toad *Rhinella (Bufo) schneideri*. **J Ethnopharmacol**, v. 155, n. 2, p. 1076-85, 2014.

SCHUSTER, S. C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nat Methods**, v. 5, p. 16-8, 2008.

SELISKO, B. et al. Cobatoxins 1 and 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann constitute a subfamily of potassium-channel-blocking scorpion toxins. **Eur J Biochem**, v. 254, n. 3, p. 468-79, 1998.

SHI, Y. B. et al. Thyroid hormone regulation of apoptotic tissue remodeling during anuran metamorphosis. **Cell Res**, v. 11, n. 4, p. 245-52, 2002.

SHIBAO, P. Y. et al. First serine protease inhibitor isolated from *Rhinella schneideri* poison. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 21, p. 30, 2015.

SHIMODA, Y. et al. Isolation, structural determination, and calcium-binding properties of the major glycoprotein present in *Bufo japonicus japonicus* egg jelly. **Eur J Biochem**, v. 223, n. 1, p. 223-31, 1994.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **J Nat Prod**, v. 61, p. 1053-71, 1998.

SMITH, L. M.; ET AL. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. - PubMed - NCBI. **Nature**, v. 6071, n. 321, p. 674-679, 1986.

STRAUSBERG, R. L. et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 26, p. 16899-903, 2002.

SU, C. Y. et al. Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications. **Science**, v. 311, n. 5767, p. 1617-21, 2006.

SUN, T.; ZHAN, B.; GAO, Y. A novel cathelicidin from *Bufo bufo gargarizans* Cantor showed specific activity to its habitat bacteria. **Gene**, 2015.

SUN, Y. B. et al. Whole-genome sequence of the Tibetan frog *Nanorana parkeri* and the comparative evolution of tetrapod genomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 11, p. E1257-62, 2015.

TOLEDO, R. C. J., C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. v. 111, n. 1, p. 1-29, 1995.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 55, p. 4-30, 2000.

VERKMAN, A. S.; MITRA, A. K. Structure and function of aquaporin water channels. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 278, n. 1, p. F13-28, 2000.

VETTER, I. et al. Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. **Amino Acids**, v. 40, p. 15-28, 2010.

WANG, H. et al. Molecular cloning and characterization of antimicrobial peptides from skin of the broad-folded frog, *Hylarana latouchii*. **Biochimie**, v. 94, n. 6, p. 1317-26, 2012.

WANG, J. L. et al. Expression profiles of six novel C-type lectins in response to bacterial and 20E injection in the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). **Dev Comp Immunol**, v. 37, n. 2, p. 221-32, 2012.

WANG, J. L. et al. Involvement of a pattern recognition receptor C-type lectin 7 in enhancing cellular encapsulation and melanization due to its carboxyl-terminal CRD domain in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Dev Comp Immunol**, v. 44, n. 1, p. 21-9, 2013.

WANG, M. et al. Five novel antimicrobial peptides from skin secretions of the frog, *Amolops loloensis*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 155, n. 1, p. 72-6, 2009.

WANG, Q. et al. Immune responses of *Helicoverpa armigera* to different kinds of pathogens. **BMC Immunol**, v. 11, p. 9, 2010.

WANG, T. et al. Maximins S, a novel group of antimicrobial peptides from toad *Bombina maxima*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 327, p. 945-51, 2005.

WANG, W. J.; SHIH, C. H.; HUANG, T. F. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 324, n. 1, p. 224-30, 2004.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2008.

WERNER, F. Herpetologische nova. **Zoologischer Anzeiger**, v. 17, n. 461, p. 410-415, 1894.

WU, W. et al. **Gene Biotechnology**. Boca Raton, USA: CRC Press, 2003.

WU, Y. et al. Limnonectins: a new class of antimicrobial peptides from the skin secretion of the Fujian large-headed frog (*Limnonectes fujianensis*). **Biochimie**, v. 93, p. 981-7, 2011.

YANG, W. et al. Toward understanding the genetic basis of adaptation to high-elevation life in poikilothermic species: a comparative transcriptomic analysis of two ranid frogs, *Rana chensinensis* and *R. kukunoris*. **BMC Genomics**, v. 13, p. 588, 2012.

YEE, D. P.; CONKLIN, D. Automated clustering and assembly of large EST collections. **Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol**, v. 6, p. 203-11, 1998.

ZAVODNA, M.; GRUEBER, C. E.; GEMMELL, N. J. Parallel tagged next-generation sequencing on pooled samples - a new approach for population genetics in ecology and conservation. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61471, 2013.

ZHANG, M. et al. Transcriptome sequencing and de novo analysis for *Oviductus Ranae* of *Rana chensinensis* using illumina RNA-Seq technology. **J Genet Genomics**, v. 40, n. 3, p. 137-40, 2013.

ZHAO, F. et al. Comprehensive transcriptome profiling and functional analysis of the frog (*Bombina maxima*) immune system. **DNA Res**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2013.

ZHAO, Y. et al. A novel heme-containing protein with anti-HIV-1 activity from skin secretions of *Bufo andrewsi*. **Toxicon**, v. 46, p. 619-24, 2005.