

FIOCRUZ

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO INICIAL DE ATIVIDADES
IMUNOMODULADORAS DE EXTRATOS DE PELES E
GLÂNDULAS PAROTÓIDES DE ANUROS DO SEMI-
ÁRIDO BRASILEIRO**

MATHEUS SANTOS DE SÁ

Salvador – Bahia
2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-graduação em Patologia

**AVALIAÇÃO INICIAL DE ATIVIDADES
IMUNOMODULADORAS DE EXTRATOS DE PELES E
GLÂNDULAS PAROTÓIDES DE ANUROS DO SEMI-ÁRIDO
BRASILEIRO**

MATHEUS SANTOS DE SÁ

Orientador (a): MILENA BOTELHO PEREIRA SOARES

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia, como parte dos requisitos necessários para a obtenção de grau de mestre em Patologia Experimental.

**Salvador – Bahia – Brasil
2005**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ
Salvador-Bahia

S111 Sá, Matheus Santos de
Avaliação inicial de atividades imunomoduladoras de extratos de peles e glândulas paratóides de Anuros do semi-árido Brasileiro. [manuscrito] . / Matheus Santos de Sá. - 2005.
82 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2005.

Orientador: Dra.: Milena Botelho Pereira Soares.

1. Atividade imunomoduladora. 2. Anuros. 3. Semi-arido brasileiro . **I.**
Título.

CDU 615: 567.8: 504.73 (81)

**Aos meus pais, Ednaldo e Marta de Sá,
exemplos de amor, dedicação,
dignidade e compreensão. Pessoas
responsáveis pela minha formação
pessoal e profissional**

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade.”

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

A Deus, inteligência suprema, causa primária de todas as coisas. Por todos os presentes que tem me dado durante a minha vida, inclusive as pessoas que estão ao meu lado sempre.

Ao Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos e Dr^a Milena B. P. Soares, pela oportunidade, orientação, paciência e dedicação. Pelo incentivo nesse processo de formação dentro da ciência.

Ao Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho, grande professor e pesquisador, pela orientação nas purificações das proteínas.

À Prof^a Flora Açuña Juncá, pelo fornecimento das peles dos anuros.

À Prof^a Dr^a Mara Zélia de Almeida, minha orientadora de iniciação científica, exemplo como pesquisadora e como pessoa, pelo incentivo constante, por ter me dado a oportunidade de conhecer a ciência ainda nos tempos de graduação.

À Prof^a Dr.^a Juceni David, co-orientadora de iniciação científica. Pessoa que sempre se comportou como uma segunda mãe para os seus alunos sempre lhes lembrando dos seus deveres como futuros pesquisadores.

Às amigas Sheilla Andrade e Dr. Simone Macambira, pelas ricas sugestões e críticas na construção dessa dissertação.

À minha família: Ednaldo, Marta, Débora, Sarah e Yuri de Sá, pessoas que mesmo distante fisicamente sempre me apoiaram em minha caminhada e que estão sempre ao meu lado, em qualquer circunstância.

À Fabiana Sales, pela compreensão, dedicação e incentivo desde o início deste trabalho.

Aos amigos que viraram família, Paulo Roberto e Jorge Sadao, pessoas com as quais convivi desde o início do curso e que sempre foram meus parceiros nessa caminhada.

À Maria Betânia, grande amiga, pelos bons momentos de convivência desde o início do curso.

A todos do LPBI, especialmente Lívia, pela receptividade em todas as minhas visitas ao laboratório.

A Ricardo Santana, Cláudio Costa, Fabrício Silva, Bruno Cerqueira, grandes amigos, pessoas importantes para mim, com as quais eu dividi grandes momentos nesta fase da minha vida.

Aos colegas do LETI, pelos bons momentos nestes quatro anos de convivência.

Aos amigos José Fernando Costa, Ademir Evagelista, Fabio Galdino e Edlene Santos, pelos grandes momentos de convivência desde a época de iniciação científica.

Ao pessoal da biblioteca, em especial Fiscina e Vânia, pela paciência conosco e pela grande contribuição nas referências bibliográficas.

À Rosália Silva e Iumara Envagelista, pessoas indispensáveis ao curso de pós graduação, pelo carinho e dedicação a nós alunos.

Ao CPqGM/FIOCRUZ, pela estrutura e pela facilidade de realização dos trabalhos.

Ao CNPQ e a Fiocruz, pela bolsa de pós-graduação.

RESUMO

AVALIAÇÃO INICIAL DE ATIVIDADES IMUNOMODULADORAS DE EXTRATOS DE PELES E GLÂNDULAS PAROTÓIDES DE ANUROS DO SEMI-ÁRIDO BRASILEIRO. **MATHEUS SANTOS DE SÁ.**

[INTRODUÇÃO] A pele dos anfíbios exibe um verdadeiro arsenal de compostos químicos naturais, com diversificadas atividades biológicas. Esses compostos fazem parte de um complexo sistema de defesa passiva dos anfíbios contra substâncias prejudiciais com as quais eles têm contato nos seus habitats. O semi-árido brasileiro abrange cerca de aproximadamente 11,5% do território nacional, incluindo oito estados da região nordeste e dois da sudeste. O objetivo do trabalho foi investigar a atividade imunomoduladora dos extratos preparados de peles (EP) e glândulas (EG) de espécies de anuros nativos ou endêmicos da região do semi-árido brasileiro. **[MÉTODOS]** Extratos aquosos foram obtidos a partir da homogeneização da pele dos anuros. (espécies *Hyla crepitans*, *Hyla albopunctata*, *Hyla spn*, *Leptodactylus ocellatus*, *Bufo rubescens*, *Ceratophrys joazeirensis*, *Hyla spn2* e *Bufo Jimi*) em PBS. Para a avaliação da inibição da produção de NO, nós utilizamos células da linhagem J774 (monócitos) que foram cultivadas na presença de IFN - γ , LPS e os extratos (EP e EG). Visando a avaliação da possível capacidade dos extratos em modularem a atividade de macrófagos na produção de NO e de interferir na proliferação de linfócitos, realizamos dosagem de nitrito através do método de Griess e o cultivo de esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com concanavalina A na presença dos extratos de anuros em concentrações atóxicas, respectivamente. A inibição da linfoproliferação foi determinada pela incorporação de ^3H -timidina. **[RESULTADOS]** Dos oito extratos analisados, três tiveram atividade inibitória superior a 50% da proliferação de esplenócitos estimulados e apenas um extrato na inibição da produção de NO. Um desses extratos (preparado a partir da pele de *Bufo rubescens*) apresentou atividade inibitória de 100%. Identificamos uma molécula ativa neste extrato, com atividade supressora, que é termo-estável e está presente numa fração de peso molecular menor que 10 kDa. **[CONCLUSÃO]** Nosso trabalho demonstra que espécies de anuros são uma potencial fonte de moléculas com atividade imunomoduladora. Estudos para isolar e caracterizar a molécula ativa da pele de *Bufo rubescens* estão sendo realizados. **[PALAVRAS-CHAVE]** Atividade imunomoduladora, Anuros, Semi-árido brasileiro.

ABSTRACT

INITIAL EVALUATION OF IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF SKIN AND PAROTOIDS GLANDS EXTRACTS OF ANURE OF THE BRAZILIAN SEMI-ARID.

MATHEUS SANTOS DE SÁ

[INTRODUCTION] The skin of the amphibians shows several natural chemical products, with diverse biological activities. These compounds are part of a complex system of passive defense of amphibians against pathogens and harmful substances to they are exposed in their habitats. The brazilian semi-arid region comprises 11,5% of the national territory, including eight states of the northeastern and two from the southeast region of the country. The objective of this work was to investigate the immunomodulatory activity of skin (SE) and gland (GE) extracts prepared from species of anures native or endemic of the brazilian semi-arid region. **[METHODS]:** Aqueous extracts were prepared by homogenization of the anure skins (species *Hyla crepitans*, *Hyla albopunctata*, *Hyla spn*, *Leptodactylus ocellatus*, *Bufo rubescens*, *Ceratophrys joazeirensis*, *Hyla spn2* and *Bufo jimi*) in PBS. To evaluate the inhibition of nitric oxide (NO) production, we used J774 cells (monocyte) that were cultivated in the presence of IFN- γ and LPS and the extracts. Aiming at the evaluation of the possible capacity of the extracts in modulating the macrophages activity in the NO production and to intervene with the lymphocytes proliferation, we carry through assessment of nitrite concentration through the Griess method and the culture of spleen cells from BALB/c mice stimulated with concanavalin A in the presence of anure extracts in non-toxic concentrations, respectively. The lymphoproliferative response was determined by measurement of ^3H -thymidine incorporation. **[RESULTS]** Of the eight extracts analyzed, three had inhibitory activity superior to 50% in lymphoproliferation and only one extract in NO production. One of these extracts (prepared from *Bufo rubescens* skin) had an inhibitory activity of 100%. We identified an active molecule in this extract with immune suppressive activity, which is heat-stable and is present in a fraction of molecular weight below 10 kDa. **[CONCLUSION]** Our work demonstrates that anure species are a potential source of molecules with Immunomodulatory activity. Studies to isolate and characterize the activity molecule in the skin of *Bufo rubescens* are being carried out. **[KEYWORDS]** Immunomodulatory activity, Anure, Brazilian semi-arid.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 A IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA BIODIVERSIDADE NO BRASIL.....	16
1.2 ESTUDO DA BIODIVERSIDADE NO SEMI-ÁRIDO BRASILEIRO.....	17
1.3 SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DA PELE DOS ANUROS.....	19
1.4 AS DOENÇAS MEDIADAS PELO SISTEMA IMUNE.....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 ANIMAIS E TECIDOS ESTUDADOS.....	30
4.2 PREPARO DOS EXTRATOS.....	32

4.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	33
4.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS DE CAMUNDONGOS.....	34
4.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM J774 (MONÓCITOS, SARCOMA – ATCC Nº TIB 67).....	34
4.6 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
4.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	35
4.8 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO (NO). 36	
4.9 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA LINFOPROLIFERAÇÃO.....	37
4.10 TRATAMENTO DO EXTRATO DE PELE <i>BUFO RUBESCENS</i>	38
4.11 PURIFICAÇÃO EM COLUNA MONO Q POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (FPLC).....	39
4.12 TESTES ESTATÍSTICOS UTILIZADOS.....	40
4.12.1 CÁLCULO DE INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO.....	40
4.12.2 CÁLCULO DE INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE ESPLÊNOCITOS.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos de pele e glândula de anuros do semi-árido brasileiro.....	41
5.2 Avaliação da atividade inibitória da produção de óxido nítrico de extrato de peles de anuros.....	43
5.3 Avaliação da atividade inibitória da linfoproliferação por extratos de peles e glândulas de anuros.....	46

5.4 Ensaio de linfoproliferação antígeno-específico utilizando antígeno de <i>T .cruzi</i>	56
5.5 Identificação da molécula ativa no extrato de pele <i>Bufo rubescens</i>	59
5.6 Purificação do extrato de pele de <i>Bufo rubescens</i>	61
6. DISCUSSÃO.....	65
7. CONCLUSÕES.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

Con A: Concanavalina A

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

FDA: Agência americana do controle de drogas e alimentos (Food and Drug Administration)

FPLC: Fast Protein, peptide and polynucleotide liquid chromatography

IFN - γ : Interferon gama

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível (inducible nitric oxide synthase)

LPS: Lipopolissacarídeo

MCT: Ministério da Ciência e Tecnologia

MMA: Ministério do Meio Ambiente

NEED: N-(1-naftil) etil-enediamina ((N-(1-naphthyl) ethyl-enediamine)

NO: Óxido Nítrico

PBS: Solução salina tamponada com fosfato (phosphate buffered saline), pH=7,2

SBF: Soro bovino fetal

EP: Extrato de pele

EG: Extrato de glândula

SE: skin extract

GE: gland extract

CPM: Contagem de radiação β (beta) por minuto

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Ensaio de inibição da produção de NO por células da linhagem J774, estimuladas com LPS e IFN- γ 45

FIGURA 2 - Ensaio de inibição da linfoproliferação por extratos de peles de anuros do semi-árido brasileiro..... 48

FIGURA 3 - Ensaio de inibição da linfoproliferação por extratos de pele e glândula de anuros do semi-árido brasileiro..... 51

FIGURA 4 - Ensaio dose-resposta da inibição da linfoproliferação por extrato de pele de *B. rubescens*..... 53

FIGURA 5 – Ensaio dose-resposta da inibição da linfoproliferação por extrato de glândula de *B. rubescens*..... 55

FIGURA 6 - Ensaio de linfoproliferação antígeno-específico..... 58

FIGURA 7 - Fracionamento do extrato de pele de *Bufo rubescens*..... 62

FIGURA 8 - Ensaio de inibição da linfoproliferação com frações da coluna Mono Q..... 64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Relação de peles e glândulas de anuros.....	31
TABELA 2 - Avaliação da toxicidade dos extratos de pele e glândula de anuros do semi-árido brasileiro.....	42
TABELA 3 - Avaliação da inibição da produção de NO por células da linhagem J774, estimuladas com LPS e IFN - γ e tratadas com extratos de pele e glândula de anuros do semi-árido brasileiro.....	44
TABELA 4 - Avaliação da atividade inibitória da linfoproliferação por extratos de pele de anuros.....	47
TABELA 5 - Avaliação de inibição da linfoproliferação por extratos de pele e glândula de anuros do gênero <i>Bufo</i>	50
TABELA 6 - Ensaio dose-resposta da inibição da linfoproliferação por extrato de pele de <i>Bufo rubescens</i>	52
TABELA 7 - Ensaio dose-resposta da inibição da linfoproliferação por extrato de glândula de <i>B. rubescens</i>	54
TABELA 8 - Ensaio de linfoproliferação antígeno-específico utilizando antígeno de <i>T. cruzi</i> e extrato de pele de <i>Bufo rubescens</i>	57
TABELA 9 - Análise da atividade inibitória de do extrato de pele de <i>Bufo rubescens</i> em diferentes condições.....	60
TABELA 10 - Fracionamento do extrato de pele de <i>Bufo rubescens</i>	61
TABELA 11 - Ensaio de inibição da proliferação com frações da coluna Mono Q.....	63

1. INTRODUÇÃO

As indústrias farmacêuticas multinacionais têm investido considerável soma de recursos na busca de novos medicamentos motivadas, por exemplo, pela necessidade de inovar e desenvolver drogas capazes de tratar patologias ainda sem tratamento adequado. Diante dos elevados custos, dos riscos de investimento, do longo tempo de pesquisas e da alta tecnologia envolvida, o desenvolvimento de novos medicamentos está restrito a empresas sediadas em países ricos (STROHL, 2000).

Estima-se que o mercado mundial dos medicamentos derivados de produtos naturais, como plantas por exemplo, seja da ordem de 30 a 40 bilhões de dólares anuais e vem crescendo em taxas expressivas. O mercado brasileiro de fitoterápicos deve movimentar 1 bilhão de dólares por ano, cerca de 10% do mercado de medicamentos do país (CALIXTO, 2000).

Para se ter uma noção do impacto dos medicamentos no mercado mundial, apenas as estatinas, drogas que reduzem a síntese endógena de colesterol (RADER, 2003), foram responsáveis por US\$ 19 bilhões em 2002 (DOWNTON e CLARK, 2003). Em um mercado que atinge vários bilhões de dólares por ano, estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na farmacoterapia atual foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (GORDON *et al.*, 1997). No período entre 1983-1994, das 520 novas drogas aprovadas pela agência americana de controle de medicamentos e alimentos (FDA), 220 (39%) foram desenvolvidas a partir de produtos naturais.

Além disso, um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo são de origem natural. No caso das drogas anticancerígenas e dos antibióticos, por exemplo, esse percentual atinge cerca de 70% (GORDON *et al.*, 1997).

O Brasil é o país que possui uma das maiores biodiversidades do planeta, estimada em cerca de 20% do número total de espécies de animais e vegetais (SUFFREDINI *et al.*, 2004). Patrimônio genético como esse, já escasso nos países desenvolvidos (DAVILA *et al.*, 2004), tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável. O maior potencial desta biodiversidade está no desenvolvimento de novos fármacos. Esta afirmação é facilmente demonstrada quando se analisa o número de medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais, que podem ser produzidos a partir de derivados das plantas superiores, toxinas animais e microrganismos (CALIXTO, 2003).

O estudo de espécies vegetais e animais do semi-árido brasileiro deverá permitir o aproveitamento de maneira racional, e poderá contribuir para a obtenção de novas descobertas no campo dos produtos naturais com reflexos na valorização sócio-econômica desta região e também do Brasil.

1.1 A importância econômica da biodiversidade no Brasil

A biodiversidade pode ser definida como a variedade de organismos vivos de todas as origens e os complexos ecológicos de que fazem parte, compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas (SMA, 1997).

O interesse por substâncias de origem natural como fonte de fármacos é explicado pela grande diversidade química com complexidade estrutural e potencial biológico (YU, 2002). Além disso, o seu estudo pode guiar o desenvolvimento de compostos sintéticos (TSUKAGOSHI, 1990).

No Brasil há a necessidade de se buscar alternativas para superar, no mercado de fármacos, a dependência externa, principalmente quando se confrontam os altos preços utilizados no país em comparação com os preços utilizados nos países desenvolvidos. O panorama brasileiro nessa área mostra que 84% de todos os fármacos são importados e que 78% da produção brasileira é feita por empresas multinacionais. Nesse quadro, confronta-se um hemisfério norte rico em tecnologia e menos favorecido em recursos genéticos (já muito escassos ou mesmo inexistentes), com um hemisfério sul deficiente em tecnologia, mas muito rico em diversidade biológica (SIMÕES, 2003).

Portanto, o isolamento, a identificação e a avaliação biológica de produtos naturais podem constituir os melhores caminhos para a descoberta de novos fármacos, considerando que a busca de moléculas ativas com estruturas moleculares complexas, por parte das indústrias farmacêuticas, é extremamente difícil de ser obtida por um processo sintético de custo racional.

1.2 Estudo da biodiversidade no semi-árido brasileiro

O semi-árido brasileiro é uma região que possui predominantemente uma vegetação denominada caatinga, que cobre a maior parte da área com clima semi-árido da região nordeste do Brasil. A região do semi-árido abrange cerca de 975.000 km² correspondendo a cerca de 11,5% do território nacional, incluindo partes dos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo (SAMPAIO *et al.*, 2002). É uma região marcada pela irregularidade das chuvas, onde ocorrem longos períodos de secas, com graves conseqüências sociais para seus 20 milhões de habitantes, os quais apresentam elevada dependência dos recursos naturais e os piores indicadores sociais do país. Em relação ao meio ambiente, dois dos maiores problemas associados ao semi-árido são o elevado grau de degradação ambiental e o baixo conhecimento quantitativo e qualitativo de sua biodiversidade (INSTITUTOS DO MILÊNIO/MCT, 2004).

Várias causas podem ser apontadas para esta situação, dentre elas o distanciamento entre o conhecimento gerado no meio acadêmico e as populações locais. Desse modo, algumas das linhas de pesquisa devem ser priorizadas para um melhor conhecimento da biodiversidade e seu uso pelas populações locais. Isso se justifica pelo fato do semi-árido apresentar uma das biotas mais particulares do mundo, em composição e adaptações às condições do meio. De modo geral, o semi-árido tem sido encarado como um conjunto de problemas ambientais, sociais e desafios científicos, tecnológicos e de desenvolvimento.

Portanto, são necessárias estratégias para a produção de conhecimentos que possam contribuir para sua superação.

Em outras regiões do país, como no cerrado, estudos sobre moléculas bioativas obtidas a partir de anuros vêm sendo realizados com resultados animadores. Uma molécula denominada dermaseptina isolada da pele de *Phyllomedusa oreades*, uma perereca nativa do cerrado brasileiro, apresenta potente atividade anti-*Trypanosoma cruzi* (BRAND *et al.*, 2002). Diante dessas considerações, acredita-se que um trabalho sistemático de prospecção de substâncias com atividade imunomodulatória a partir da pele de anuros do semi-árido brasileiro, com identificação e isolamento destas, possibilitará o desenvolvimento de novos fármacos, a partir de espécies pertencentes à biodiversidade ali existente.

1.3 Substâncias bioativas da pele dos anuros

Os anuros constituem uma ordem de anfíbios (ordem Anura) dividida em três sub-ordens: Archaeobatrachia, Mesobatrachia e Neobatrachia. Essas três sub-ordens reúnem 30 famílias, 337 gêneros e 4877 espécies (HOEGG *et al.*, 2004). A ordem anura reúne os sapos, rãs e pererecas. Os anuros não trazem prejuízos ao homem, pois não se alimentam de frutas ou grãos, não são agressivos, não transmitem enfermidades graves, nem possuem mecanismo para inoculação do veneno. Além disso, cumprem um importante papel no controle das populações de insetos e outros invertebrados, principais constituintes de sua dieta alimentar (MMA, 2004).

No Brasil há 600 espécies de anfíbios identificadas. Destas, 455 (76%) são endêmicas. Desse modo não existem em nenhuma outra parte do planeta. Mais da metade dessas espécies encontra-se na Mata Atlântica, ocorrendo não somente em razão da alta pluviosidade daquela região, com grande quantidade de micro-ambientes úmidos muito apreciados por esses animais, mas também pelo terreno acidentado da região da Serra do Mar, gerando isolamento geográfico das populações e como conseqüência, o surgimento de novas espécies. Na região da Mata Atlântica, já foram catalogadas 372 espécies de anfíbios, sendo 260 (70%) endêmicas (http://www.agirazul.com.br/fsm4/_fsm/00000135.htm).

A pele desses animais desempenha uma série de funções vitais, destacando-se a respiração, o transporte de água e solutos, a regulação da temperatura corpórea e a defesa contra o ataque de microrganismos e predadores (LEITE *et al.*, 2005). A manutenção da umidade da superfície externa da pele,

condição fundamental para a difusão dos gases respiratórios, é garantida pela secreção de muco produzido pelas glândulas mucosas (HUTCHINSON e SAVITZKY, 2004). Um outro tipo de glândula dérmica, as glândulas granulosas, geralmente maiores que as mucosas e presentes em maior número na pele dorsal, está presente em praticamente todas as espécies de anfíbios. A essas glândulas atribui-se as funções de produção e armazenamento de substâncias bioativas que são liberadas sobre a pele do animal em situações de perigo. Nos sapos comuns, como *Bufo jimi*, é evidente a presença das glândulas parotóides atrás dos olhos, que consistem em agregações de glândulas granulosas que estocam grande quantidade de secreção (SEBBEN, 1993).

Os sapos eram tidos, na antiguidade, como animais extremamente venenosos. No entanto, as secreções de suas peles não foram utilizadas com finalidade estritamente maléfica. Na Ásia, utiliza-se há séculos a toxina de sapos do gênero *Bufo* em preparados galênicos empregados no tratamento de sinusites, resfriados, inflamações locais e dor de dente (LYTTLE *et al.*, 1996). É possível que este seja o primeiro e mais antigo uso de uma toxina de origem animal em farmacoterapia. A composição e a concentração das substâncias ativas presentes na pele dos anuros podem variar segundo a espécie, o estágio de desenvolvimento e a distribuição geográfica (TERRENI *et al.*, 2003).

Há relatos de que os índios Tucana, que vivem na região noroeste da Amazônia, usam a secreção da pele da perereca *Phyllomedusa bicolor* para tratar a indisposição gástrica provocada por bebidas alcoólicas e alimentação pesada (LUTZ, 1966). A secreção da pele dessas pererecas tem diversas substâncias capazes de induzir vômito. As primeiras tentativas de isolar e caracterizar química

e farmacologicamente os princípios ativos das secreções cutâneas dos anuros datam de meados do século passado. Os resultados obtidos foram surpreendentes em casos de isquemia cerebral, problemas circulatórios e câncer (GESISKY, 2004). Muitos estudiosos desses animais relatam casos, inclusive experiências pessoais, de intoxicação produzida pelo simples manuseio de determinadas espécies de rãs ou pererecas. Tais observações constituem importante fonte de orientação primária para o desenvolvimento de pesquisas com determinadas espécies (SEBBEN, 1993).

Devido ao fato da pele dos anfíbios estar em contato direto com ambientes favoráveis à presença de microrganismos, muitos deles patogênicos, pode-se imaginar uma participação ativa das secreções cutâneas no controle do crescimento de bactérias sobre a pele (PRATES e JUNIOR, 2000). Em 1987 isolou-se e identificou-se, a partir de extratos de pele de *X. laevis*, dois potentes peptídeos com atividade cicatrizante e antimicrobiana. Estes peptídeos, chamados magaininas, possuem 23 resíduos de aminoácidos e diferem entre si por apenas duas substituições. A descoberta das magaininas pode contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que tais compostos apresentam atividade em concentrações muito baixas contra uma série de microrganismos, inclusive protozoários (ZASLOFF, 1987).

A pele dos anuros apresenta um verdadeiro arsenal de produtos químicos naturais, com diversas atividades biológicas. A partir da pele desses animais já foram isolados mais de 300 compostos bioativos, pertencentes a cinco grupos químicos: aminas biogênicas, peptídeos, proteínas hemolíticas, alcalóides e esteróides. Farmacologicamente, esses compostos são capazes de agir como

irritantes locais, cardio, mio e neurotoxinas, agentes colinomiméticos, simpatomiméticos, alucinogênicos, agentes citotóxicos e inibidores do crescimento de microrganismos. Sabe-se que alguns desses compostos protegem a pele dos anfíbios contra o crescimento de bactérias, fungos e protozoários e participam de um eficiente sistema de defesa contra o ataque de predadores. Os anuros podem ser considerados o maior depósito natural de compostos alcaloídicos do reino animal (DALY *et al.*, 2004).

O exato papel dessas substâncias na vida desses animais ainda não está suficientemente esclarecido. Há atualmente duas hipóteses para explicar a produção e a variedade de substâncias bioativas encontradas na pele dos anuros durante o desenvolvimento evolutivo desses animais. Primeiro, tem sido proposto que essas substâncias teriam a função primária de proteger esses animais do ataque de microrganismos (HABERMEHL e KREBS, 1986). No entanto, argumenta-se que, embora alguns dos compostos presentes na secreção cutânea dos anfíbios possuam atividade antibiótica, a maioria deles não tem essa propriedade. Segundo, é possível que esses compostos atuem na defesa contra predadores em duas modalidades: compostos ativos de ocorrência geral e altamente difundidos, tais como peptídeos e aminas biogênicas, seriam produzidos e estocados em grande quantidade nas glândulas da pele e teriam uma função secundária de defesa; novos compostos biologicamente ativos, freqüentemente com estruturas complexas, seriam elaborados para uma função primária de defesa, como por exemplo os alcalóides dos dendrobatídeos (DALY *et al.*, 1987). Esta hipótese é fundamentada no fato de muitos peptídeos e aminas biogênicas serem neurotransmissores comuns aos vertebrados; esses compostos

seriam concentrados em glândulas da pele dos anfíbios, onde passariam a desempenhar uma função secundária de proteção.

A determinação da estrutura de substâncias isoladas a partir de secreções de peles de anuros vem permitindo sua utilização como “ferramentas farmacológicas”, devido à ação altamente específica de algumas delas. Apesar de sua composição química, a maioria das secreções da pele dos anuros, em maior ou menor grau, irrita as mucosas. Após o manuseio de determinadas espécies, alguns indivíduos podem apresentar reações alérgicas nas mãos, mesmo que não tenham lesões na pele (SEBBEN, 1993).

Dentre os compostos bioativos encontrados na pele dos anuros, as aminas biogênicas destacam-se por sua ampla distribuição entre representantes de diversas famílias desses animais. Muitas dessas substâncias são mediadores químicos bastante comuns entre os animais. Além disso, esses compostos são produzidos e estocados em grande quantidade. Em alguns casos, a concentração pode atingir níveis da ordem de dezenas de miligramas de princípio ativo por grama de tecido fresco (SALMON *et al.*, 2001). As catecolaminas, como adrenalina, noradrenalina e dopamina ocorrem em diversas espécies de sapos do gênero *Bufo*. Além de aminas biogênicas, as secreções de pele de sapos do gênero *Bufo* contém uma série de esteróides, os bufadienóides. Essas substâncias têm atividade cardiotônica e cardiotóxica. Em humanos, o contato da toxina com os olhos pode causar irritação intensa e persistente (HEATWOLE, 1995). Diversas imidazolalquilaminas, compostos do grupo da histamina, estão presentes em grandes concentrações na pele da rã-pimenta, como são

conhecidas as rãs das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *L. pentadactylus* (ROSEGHINI *et al.*, 1986).

Da pele de anfíbios também foram isolados peptídeos com características opióides. Em 1981 foram isolados os primeiros peptídeos opióides de anfíbios nomeados dermofinas que atuam como potentes e seletivos agonistas de receptores μ -opióides. Em 1990 foram descobertas as deltorfinas na pele de anfíbios, as quais até o momento são os mais potentes agonistas de receptores δ -opióides já identificados (NEGRI *et al.*, 2000).

Erspamer (1959) purificou pela primeira vez um polipeptídeo obtido a partir da pele de anuros. Desde então, muitas substâncias de natureza peptídica têm sido isoladas da pele de várias espécies de anuros, particularmente em membros da família Hylidae, Ranidae e Leptodactylidae. Destaca-se não só a diversidade de compostos, mas também a elevada concentração em que alguns deles ocorrem em determinadas espécies, especialmente em *Phyllomedusa*. Na Amazônia brasileira há um anuro reconhecidamente capaz de provocar intoxicação em humanos pelo simples manuseio. Trata-se de *Phyllobates terribilis*, que produz uma toxina chamada batracotoxina. Esses animais são conhecidos como rãs de veneno de flecha, por serem utilizados pelos índios para envenenar flechas e dardos (SEBBEN, 1993).

Dentre todos os tipos de moléculas mencionados anteriormente, os peptídeos têm despertado bastante interesse devido às suas atividades como mediadores farmacológicos. Tendo em vista o rápido processo de extinção de

algumas espécies de anuros, há o risco desses animais desaparecerem antes de terem sido estudados.

1.4 As doenças mediadas pelo sistema imune

Essas doenças são um grande problema de saúde no mundo, estão crescendo em proporções epidêmicas e requerem abordagens agressivas e inovadoras para o desenvolvimento de novos tratamentos (KRENSKY *et al.*, 2001). Essas doenças incluem as doenças autoimunes, tais como artrite reumatóide, diabetes mellitus, lupus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, que podem ser causadas por um defeito na indução da tolerância central ou periférica; ou resultar de uma resposta imune contra moléculas próprias para as quais a tolerância não é estabelecida (THEOFILOPOULOS, 1995); e as doenças alérgicas, como a asma, caracterizada por hiper-reatividade das vias aéreas, resultando em broncoconstrição episódica reversível, devido a um aumento da responsividade da árvore traqueobronquial a vários estímulos (CORRIGAN e KAY, 1992). Além disso, uma das grandes oportunidades terapêuticas para o tratamento de muitas doenças é o transplante de órgãos. Entretanto, a rejeição mediada pelo sistema imune permanece como a principal dificuldade para o uso desta tecnologia.

Atualmente drogas imunossupressoras são utilizadas para suprimir a resposta imune em transplantes de órgãos e em doenças autoimunes. Em transplantes, as principais classes de drogas usadas são os glicocorticóides, os inibidores de calcineurina e agentes antiproliferativos/antimetabólicos. Essas drogas têm alto grau de sucesso clínico na rejeição aguda a transplante de órgãos e doença autoimune severa. No entanto, tais terapias requerem uso ao longo da vida do paciente e causam supressão do sistema imune como um todo, expondo o

paciente a altos riscos de infecção. Em adição, essas terapias estão associadas a um risco potencial de morte e lesão irreversível de órgãos (SIMON, 2004)

Um droga imunossupressora muito utilizada na rotina clínica é a ciclosporina (SCHREIBER e CRABTREE, 1992). No entanto, essa droga ocasiona diversos efeitos adversos, tais como tremores, hipertensão, hiperlipidemia nefrotoxicidade, dentre outros (BURKE *et al.*, 1994). Modelos animais têm demonstrado que a administração de ciclosporina em camundongos no período de gestação aumenta o risco de desenvolvimento de doença autoimune nos recém-nascidos (CLASSEN, 1998).

Diante destas considerações, é de extrema relevância a identificação de novas drogas, que apresentem atividade contra doenças autoimunes, reações alérgicas e rejeição a transplantes, uma vez que tratamentos existentes para essas patologias dependem de drogas com uma grande variedade de efeitos colaterais e alto custo.

2. JUSTIFICATIVA

Estima-se que existam pelo menos 80 doenças humanas nas quais a resposta autoimune participa significativamente como causa inicial ou como colaboradora. Embora a maioria das doenças autoimunes atinja preferencialmente mulheres, pessoas de ambos os sexos e todas as idades, raças, etnias e grupos sócio-econômicos são afetadas. Devido à sua natureza crônica e seus efeitos debilitantes, as doenças autoimunes têm altos custos econômicos, estimados em 100 bilhões de dólares ao ano (ROSE, 2004).

As atuais abordagens terapêuticas não são inteiramente satisfatórias e portanto novas drogas com menos efeitos colaterais e menor custo são necessárias. Neste trabalho propõe-se a investigação da atividade imunomoduladora originada de extratos de peles e glândulas (EP e EG) de anuros do semi-árido brasileiro, utilizando ensaios *in vitro*, visando definir a existência de substâncias úteis na terapia de enfermidades conseqüentes de atividades inadequadas do sistema imune humano. Deve-se considerar também o elevado índice de degradação ambiental no semi-árido e a escassez de conhecimento a respeito da composição de tecidos de anuros, tornando-se ainda mais urgente o estudo dos produtos naturais da região, em especial os anuros, grupo de animais altamente ameaçados de extinção.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

- Avaliar possíveis atividades imunomoduladoras de extratos de peles e glândulas parotóides de anuros do semi-árido brasileiro.

3.2 Específicos:

- Avaliar capacidade de extratos de pele e glândula de anuros em interferir na proliferação de esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com concanavalina A (Con A).
- Avaliar capacidade de extratos de pele de anuros em interferir na proliferação esplenócitos de camundongos BALB/c, com infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi*, após estimulação específica com antígeno de *T. cruzi*.
- Avaliar a capacidade de extratos de pele e glândula de anuros em alterar a produção de óxido nítrico por células da linhagem J774 (monócito) estimuladas com LPS e IFN- γ .
- Isolar e caracterizar possíveis moléculas bioativas presentes em extrato previamente testado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e tecidos estudados

Peles e glândulas de oito espécies de anuros pertencentes a quatro gêneros diferentes, foram recebidas do Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia/Universidade Estadual de Feira de Santana (LAPH/UEFS). As peles foram coletadas (Licença 029/2003-CGFAU/LIC) e condicionadas imediatamente em gelo seco e posteriormente enviadas ao laboratório.

É relevante ressaltar o fato de ter-se obtido quantidade de material bastante reduzida para o estudo. Além disso, muitas espécies de anuros são bastante pequenas com algumas peles pesando menos de 1g. Com isso, alguns experimentos foram realizados apenas uma vez.

Os extratos preparados a partir de vários indivíduos foram testados em uma mistura com todos os fragmentos de pele, para se tentar atingir uma quantidade de extrato suficiente para a realização dos experimentos. Foram recebidas duas glândulas parotóides por animal.

TABELA 1: Relação de peles e glândulas de anuros.

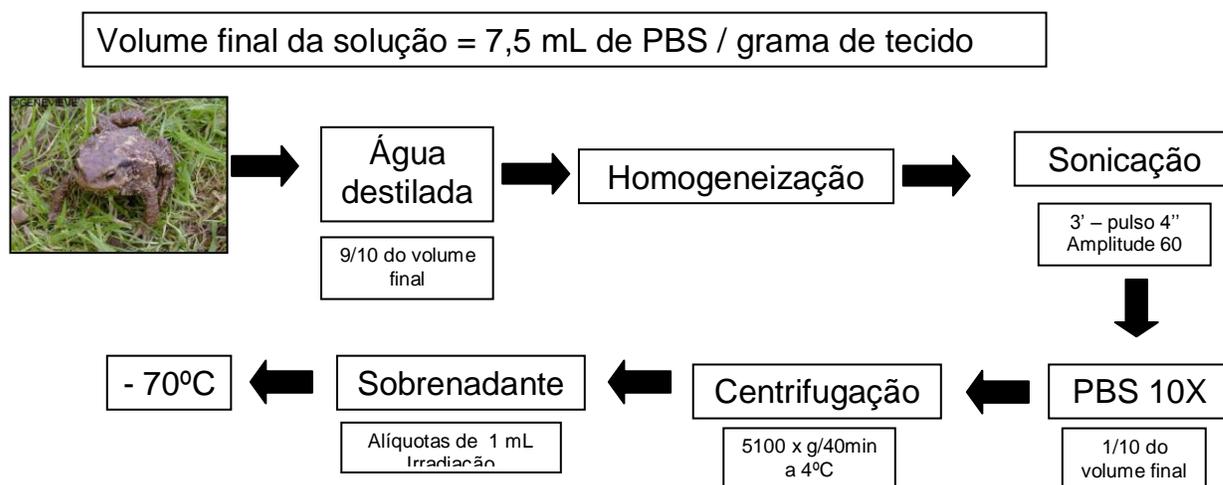
Espécie	Tipo de tecido	Peso total (g)	Lote	Concentração de proteínas (mg/mL)	Nº de indivíduos
<i>Bufo jimi</i> **	Pele	4,3	1	5,8	1
<i>Bufo rubescens</i> **	Pele	4,4	1	9,5	1
<i>Bufo rubescens</i> **	Pele	6,3	2	16	1
<i>Ceratophrys joazeirensis</i> **	Pele	2,4	1	6,6l	2
<i>Leptodactylus ocellatus</i> *	Pele	0,97	1	8	4
<i>Hyla albopunctata</i> *	Pele	1,48	1	15	4
<i>Hyla crepitans</i> *	Pele	1,2	1	12	2
<i>Hyla spn</i> *	Pele	0,68	1	13	1
<i>Hyla spn2</i> ***	Pele	1	1	4	3
<i>Bufo jimi</i> **	Glândula	3,1	1	4	2
<i>Bufo rubescens</i> **	Glândula	0,94	2	6	1

* Coletados em Rio de Contas

** Espécies apreendidas pelo IBAMA e cedidas ao LAPH/UEFS (Local: Joazeiro – Bahia)

*** Coletado em Mucugê - Ba

4.2 Preparo dos extratos



As peles e glândulas parotóides foram pesadas. Utilizando tesoura e pinça, cortou-se a pele em pedaços menores para facilitar a homogeneização. O volume final da solução [PBS 10X (1/10 do volume) + água destilada (9/10 do volume)] foi na seguinte proporção: Para cada grama de pele acrescentou-se 7,5 mL de solução. Antes de homogeneizar acrescentou-se o volume calculado de água (9/10 do volume final), triturou-se a pele, utilizando homogeneizador (PGS Scientifics, Maryland, MD, EUA) em banho de gelo. Processou-se a pele utilizando processador ultrassônico (CE, São Paulo, SP, BR) por 3 min, com amplitude de 60 e pulsos de 4 segundos, também em banho de gelo. Acrescentou-se imediatamente o volume de PBS 10X calculado (1/10 do volume final). Centrifugou-se a 5100 x g por 40 min a 4°C. Dividiu-se o sobrenadante em alíquotas de 1 mL e estas foram esterilizadas por irradiação gama (irradiadas em fonte de Césio ¹³⁷ com dose de 65.000 rads, por 4 horas e 30 minutos, em banho

de gelo). Os extratos foram testados quanto à esterilidade com incubação destes por 24 horas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Hyclone, Logan, UT, EUA) completo, suplementado com soro bovino fetal a 10% (Cultilab, Campinas, SP, BR) e gentamicina a 50 µg/mL (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Por fim, os extratos foram armazenados a -70 °C.

Composição da solução salina tamponada com fosfato (PBS 10X):

Cloreto de sódio – 80 g

Cloreto de potássio – 2 g

Fosfato de potássio – 2 g

Fosfato de sódio heptahidratado – 21,7 g

qsp – 1L

4.3 Dosagem de proteínas

Com o objetivo de se quantificar as proteínas dos extratos, alíquotas destes foram diluídas em solução tampão de bicarbonato de sódio 0,1 M pH 8 e detergente NP 40 1%. Foram feitas diluições de 1:5, 1:20, 1:50, 1:500. distribuiu-se as amostras e 10 µl de fluorescamina (SiGMA) numa concentração final de 160 µg/mL em placa de 96 poços. A leitura da fluorescência foi feita em aparelho fluoroskan II (Labsystems, Vantaa, Finlândia). A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pela interpolação da fluorescência das alíquotas com as amostras de albumina do soro bovino (Sigma, St. Louis, MO, EUA) utilizadas como padrão.

4.4 Obtenção de células esplênicas de camundongos

Camundongos da linhagem BALB/c foram sacrificados em fluxo laminar e foi feita a retirada do baço utilizando tesoura e pinça. O baço do animal foi colocado em meio DMEM (sem soro bovino fetal) e macerado em placa de petri, também em fluxo laminar, para obtenção da suspensão de células. A suspensão de células foi retirada da placa de petri e colocada em tubo de 15 mL para posterior centrifugação a 717 x g por 10 minutos a 4°C. As células foram então contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 96 poços.

4.5 Obtenção de células da linhagem J774 (monócitos, sarcoma – ATCC nº TIB 67)

As células da linhagem J774 foram cultivadas *in vitro* em meio DMEM completo em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂. Esta linhagem de células foi adaptada para cultura a partir de um tumor em fêmeas de camundongos BALB/c em 1968 (HAY *et al.*, 1994). Para os ensaios de avaliação da inibição de NO, as células foram incubadas com solução 2,5% de tripsina – EDTA (Gibco-BRL, Grand Island, NY, EUA) por 5 min, sendo interrompida a reação acrescentando-se meio contendo soro bovino fetal a 10%. As células foram centrifugadas a 717 x g por 10 minutos, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 96 poços.

4.6 Obtenção do antígeno de *Trypanosoma cruzi*

Para o ensaio de inibição da proliferação de esplenócitos de animal com infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi* Camundongos BALB/c foram infectados com 100 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa colombiana) com 6-8 meses de

infecção (AOKI *et al.*, 2004). Esta cepa foi isolada de um paciente na Colômbia, passadas para cobaias e transferidas para triatomíneos pertencentes à espécie *Rhodnius prolixus*, sendo posteriormente inoculados em camundongos por via intra-peritoneal (FEDERICI *et al.*, 1964). O antígeno de *T. cruzi* foi preparado a partir de formas tripomastigotas em água, com três ciclos de congelamento e descongelamento, centrifugando a 5100 x g e estocando a -70°C.

4.7 Avaliação da citotoxicidade

Para a determinação da concentração atóxica a células de mamíferos, os extratos foram avaliados em diferentes concentrações de proteína (1, 0,1 e 0,01 mg/mL). Para este ensaio foram utilizadas células de baço de camundongos BALB/c (6×10^5 células/poço), incubadas (a 37°C + 5% de CO₂) em presença dos extratos testados, em triplicatas, e de 10 µl de ³H-timidina (1 µCi/poço), durante 24 horas. A cultura de células de baço foi feita em meio DMEM completo. As drogas foram diluídas em meio de cultura no dia da realização do experimento.

Foram feitos dois controles para este experimento: um controle sem tratamento, no qual incubou-se somente células e ³H – timidina, e um controle de células tratadas com saponina (numa concentração final de 0,05%), substância com reconhecida atividade citotóxica.

Após o período de 24 horas, as células foram coletadas em filtro de fibra de vidro, utilizando coletor de células (Filtermate 196, Packard, Meriden, CT, EUA). Os filtros foram secos à temperatura ambiente durante 24 horas e, posteriormente, lidos em contador de radiação beta (Beta Counter, Packard, Meriden, CT, EUA). O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se os valores de

radiação incorporados pelas células incubadas na presença dos extratos com os valores do controle não tratado. Como os extratos continham uma grande quantidade de substâncias desconhecidas, as quais poderiam estar contribuindo para a toxicidade das soluções, a concentração dos extratos utilizada para os ensaios posteriores foi a mais elevada que apresentasse uma toxicidade de até 30%.

4.8 Avaliação da inibição da síntese de óxido nítrico (NO)

Com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos quanto à inibição da produção de NO, utilizou-se células da linhagem J774 (HABICH *et al.*, 2002). As células foram incubadas em placas de cultura de 96 poços (10^5 células/poço) e estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e IFN- γ (5 ng/mL) (PharMingem, San Diego, CA, EUA), na presença ou não dos extratos na concentração máxima atóxica, em triplicata, em meio DMEM completo por um período de 24 horas, em estufa úmida a 37 °C e 5 % de CO₂. Após este período, 50 μl do sobrenadante de cada poço foram coletados e transferidos para placas de 96 poços para a avaliação da quantidade de nitrito através do método de Griess (CHEN *et al.*, 2004). Resumidamente, a reação de Griess foi avaliada adicionando-se aos 50 μl do sobrenadante/poço igual volume do reagente de Griess (solução de sulfanilamida 1% e hidrócloro de naftiletileno diamina – NEED – 0,1% em H₃PO₄ – 0,3 M) (Sigma, St. Louis, MO, EUA). A leitura das placas foi feita imediatamente em espectrofotômetro (Spectra Max 190, SunnyVale, CA, EUA), no comprimento de onda de 570 nm. O percentual de inibição da produção

de NO de cada extrato avaliado foi determinado comparando-se os resultados obtidos com os resultados dos sobrenadantes de culturas de células não tratadas com extratos.

4.9 Avaliação da inibição da linfoproliferação

Para avaliar a atividade inibidora da linfoproliferação dos extratos de peles e glândulas de anuros, foram utilizadas suspensão de células totais de baço de camundongos BALB/c. As células (4×10^5 /poço) foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio DMEM completo, na presença ou não dos extratos e estimuladas com o mitógeno concanavalina A ($1 \mu\text{g/mL}$; Sigma, St. Louis, MO, EUA), lectina de origem vegetal (*Concanavalina ensiformis*) capaz de promover ativação policlonal de linfócitos. Cada extrato foi testado em triplicata.

As células foram incubadas em presença da Con A ($1 \mu\text{g/mL}$) e dos extratos testados na concentração máxima atóxica. Após 48 horas de incubação (a $37^\circ\text{C} + 5\%$ de CO_2), adicionou-se ^3H -timidina ($1 \mu\text{Ci/poço}$) e incubou-se novamente durante 12-18 horas. As células foram então coletadas para quantificação da radioatividade beta, conforme descrito anteriormente. A percentagem de inibição da linfoproliferação foi determinada através da comparação da incorporação da ^3H -timidina em culturas estimuladas com Con A na presença ou ausência dos extratos.

Para os ensaios de inibição da linfoproliferação antígeno-específica células de camundongos BALB/c com infecção crônica pelo *T. cruzi* (4×10^5 /poço) foram cultivadas também em placa de 96 poços, em meio DMEM completo, na presença ou não dos extratos e estimuladas com antígeno de *T. cruzi* (preparado como

descrito anteriormente), numa concentração de 50 µg/mL. As células foram incubadas na presença do antígeno e dos extratos testados por um período de 5 dias (a 37°C + 5% de CO₂). Após esse período adicionou-se ³H – timidina (1µCi/poço) e incubou-se novamente durante 12-18 horas. As células foram então coletadas para a quantificação da radioatividade beta e a medida da linfoproliferação foi determinada também através da incorporação de ³H-timidina em culturas estimuladas com antígeno de *T. cruzi* na presença ou ausência dos extratos.

4.10 Tratamento do extrato de pele *Bufo rubescens*

Para identificar a molécula ativa no extrato de pele de *Bufo rubescens*, este foi inicialmente filtrado utilizando microconcentradores (Centricon, Beverly, EUA) com membranas com poros por onde permeiam moléculas com peso molecular menor que 10, 30 e 100 mil daltons (kDa). Uma amostra do filtrado com peso molecular menor que 10 kDa foi aquecida a 100°C por 30 minutos. Após esse período o filtrado foi novamente testado em ensaio de linfoproliferação. Outra alíquota do filtrado também foi tratada com proteinase K (100 µg/mL). Incubou-se com a protease por 30 minutos a 37°C. Após esse período a amostra foi novamente filtrada em microconcentrador com poro de 10 kDa para que a proteinase K (PM = 28,93 kDa) fosse retirada da solução e o filtrado foi novamente testado em ensaio de linfoproliferação.

4.11 Purificação em coluna Mono Q por cromatografia líquida de alta resolução (FPLC)

O filtrado em filtro Centricon com poro de 10 kDa foi diluído em água destilada (proporção de 1:7,5). Acrescentou-se hidróxido de sódio (1M), de modo a ajustar o pH para 8, e um volume adicional de água destilada que manteve a concentração final da solução em 20 mM (compensando a adição de NaOH 1 M). A solução contendo a amostra foi fracionada em coluna Mono Q por FPLC (Pharmacia, Uqsalla, Suécia), equilibrada em solução tampão de TRIS-HCl a 20 mM pH 8, eluindo-se as proteínas por um gradiente linear de 0 a 1M de cloreto de sódio, em uma taxa de fluxo de 1 mL/min. Frações de 0,8 mL foram coletadas e condicionadas imediatamente em gelo e uma hora após a -70°C. A concentração de proteínas foi estimada por medida da absorbância a 280 nm.

4.12 Testes estatísticos utilizados

Foram elaborados cálculos para auxiliar na avaliação da atividade biológica dos extratos testados neste estudo.

4.12.1 Cálculo de inibição da produção de NO

A – Concentração de nitrito nos poços com células estimuladas com LPS + IFN γ na presença dos extratos

B – Concentração de nitrito nos poços com células estimuladas com LPS + IFN γ utilizadas como controle

% de inibição: $-\left[\frac{\text{Média dos valores de A} \times 100}{\text{B}}\right] - 100$

4.12.2 Cálculo de inibição da proliferação de esplenócitos

A – Valor em cpm nos poços com células estimuladas com Con A ou antígeno de *T. cruzi* na presença dos extratos

B – Valor em cpm nos poços com células estimuladas com Con A ou antígeno de *T. cruzi* utilizadas como controle

% de inibição: $-\left[\frac{\text{Média dos valores de A} \times 100}{\text{B}}\right] - 100$

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos de pele e glândula de anuros do semi-árido brasileiro

Com o objetivo de se determinar a toxicidade dos extratos de peles e glândula parotóides de anuros do semi-árido brasileiro a células de mamíferos, realizou-se ensaios com esses extratos nas seguintes concentrações: 1, 0,1 e 0,01mg/mL, como descrito em material e métodos. Os dados apresentados na tabela 1 são referentes às concentrações cujo percentual de citotoxicidade foi menor ou igual a 30%.

TABELA 2: Avaliação da toxicidade dos extratos de pele e glândula de anuros do semi-árido brasileiro.

Espécies	Tipo de extrato	Concentração (mg/mL)	% de citotoxicidade
<i>Hyla crepitans</i>	Pele	1	53
		0,1	0
		0,01	0
<i>Hyla albopunctata</i>	Pele	1	50
		0,1	19
		0,01	0
<i>Hyla spn</i>	Pele	1	0
		0,1	0
		0,01	0
<i>Hyla spn 2</i>	Pele	1	0
		0,1	0
		0,01	0
<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Pele	1	70
		0,1	30
		0,01	0
<i>Ceratophrys joazeirensis</i>	Pele	1	63
		0,1	0
		0,01	0
<i>Bufo rubescens</i>	Pele	1	0
		0,1	0
		0,01	0
<i>Bufo rubescens</i>	Glândula	1	0
		0,1	0
		0,01	0
<i>Bufo jimi</i>	Pele	1	34
		0,1	16
		0,01	0
<i>Bufo jimi</i>	Glândula	1	58
		0,1	47
		0,01	0

5.2 Avaliação da atividade inibitória da produção de Óxido Nítrico de extrato de pele e glândula de anuros do semi-árido brasileiro

Os macrófagos são ativados em resposta a um determinado antígeno. Uma vez ativados, fundem seus lisossomas aos fagossomas, expondo o antígeno a uma variedade de enzimas lisossômicas. Essas células ativadas produzem radicais de oxigênio e óxido nítrico, dentre outras moléculas. A ativação dos macrófagos *in vivo* usualmente está associada com destruição tissular localizada, o que pode resultar da liberação de mediadores, como o NO, que são tóxicos para as células hospedeiras (IZGUT-UYSAL *et al.*, 2005). Se essa ativação persistir ou se a resposta dos macrófagos for exacerbada, pode ser prejudicial ao hospedeiro.

Visando a avaliação da capacidade dos extratos de pele e glândula de anuros em modular a atividade de macrófagos na produção de óxido nítrico, realizou-se cultura de células da linhagem J774 estimuladas com LPS e IFN- γ , através da medida de seu produto oxidativo, o nitrito, pelo método de Griess. Pode-se observar que os extratos de pele de *Hyla crepitans*, *Hyla albopunctata*, *Hyla spn*, *Leptodactylus ocellatus*, *Ceratophrys joazeirensis* e *Bufo jimi* apresentaram atividade inibitória inferior a 50%. O extrato da pele de *Bufo rubescens* apresentou atividade inibitória da produção de NO acima de 90%. No entanto, o extrato de glândula de *Bufo rubescens* apresentou atividade inibitória inferior a 1% e o extrato de glândula de *Bufo jimi* não apresentou atividade inibitória. (Tabela 3 e figura 1).

TABELA 3: Avaliação da inibição da produção de NO por células da linhagem J774, estimuladas com LPS e IFN - γ e tratadas com extratos de pele e glândula de anuros do semi-árido brasileiro.

Espécies	Tipo de extrato	Concentração (mg/mL)	Concentração de nitrito (ng/mL)	% de inibição
<i>Hyla crepitans</i>	Pele	0,1	18,73	4,4
			17,72	
			-	
<i>Hyla albopunctata</i>	Pele	0,1	21,4	0
			21,98	
			21	
<i>Hyla spn</i>	Pele	1	10,4	44,5
			10,3	
			11,05	
<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Pele	0,1	14,34	24,9
			14,30	
			-	
<i>Ceratophrys joazeirensis</i>	Pele	0,1	20,4	0
			22,65	
			-	
<i>Bufo rubescens</i>	Pele	1	0,98	93,65
			1,3	
			1,35	
<i>Bufo rubescens</i>	Glândula	1	18,60	0,68
			19,24	
			-	
<i>Bufo jimi</i>	Pele	0,1	14,80	20,88
			14,70	
			15,70	
<i>Bufo jimi</i>	Glândula	0,01	30,66	0
			31,15	
			30,26	
Controle			19,7	-
			18,5	
			19,00	

FIGURA 1

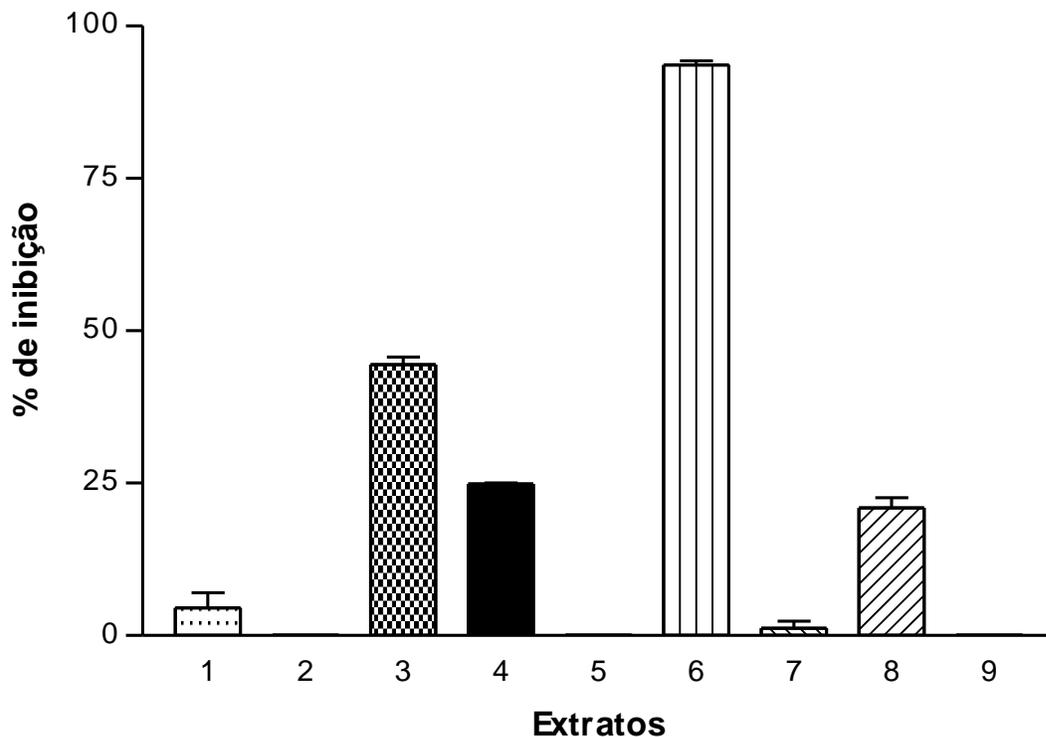


Fig. 1: Ensaio de inibição da produção de NO por células da linhagem J774, estimuladas com LPS e IFN- γ . As células J774 foram estimuladas com LPS (1 μ g/mL) e IFN - γ (5 ng/mL) e incubadas na presença ou ausência dos extratos (EP e EG), nas concentrações máximas atóxicas, por 24 horas. A produção de NO foi estimada através da dosagem de nitrito pelo método de Griess. Os percentuais de inibição foram calculados de acordo com a fórmula descrita em material e métodos utilizando os valores do controle estimulado e cultivado na ausência dos extratos. 1 - *Hyla crepitans*, 2 - *Hyla albopunctata*, 3 - *Hyla spn*, 4 - *Leptodactylus ocellatus*, 5 - *Ceratophrys joazeirensis*, 6 - *Bufo rubescens*, 7 - *Bufo rubescens*, 8 - *Bufo jimí*, 9 - *Bufo jimí*. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão das triplicatas ou duplicatas. $p < 0,05$.

5.3 Avaliação da atividade inibitória da linfoproliferação por extratos de pele e glândula de anuros do semi-árido brasileiro

Com o objetivo de avaliar a capacidade dos extratos de pele e glândula de anuros interferirem na proliferação de esplenócitos, realizou-se experimento cultivando células de camundongos BALB/c estimuladas com Con A na presença do extratos. Os extratos de pele de *Hyla spn*, *Leptodactylus ocellatus* e *Bufo rubescens* apresentaram atividade inibitória acima de 50%. Os extratos de pele de *Hyla crepitans*, *Hyla albopunctata*, *Ceratophrys joazeirensis*, *Bufo jimi* e *Hyla spn 2* apresentaram atividade inibitória da linfoproliferação inferior a 50% (Tabela 4 e figura 2).

TABELA 4: Avaliação da atividade inibitória da linfoproliferação por extratos de pele de anuros

Espécies	Concentração (mg/mL)	Controle	CPM	% de inibição
<i>Hyla crepitans</i>	0,1	23398	20819	11,82
			21095	
			19962	
<i>Hyla albopunctata</i>	0,1	23398	14962	36,56
			14723	
			-	
<i>Hyla spn</i>	1	23398	11153	54,48
			10147	
			-	
<i>Hyla spn 2</i>	1	23398	18084	24,2
			17127	
			16818	
<i>Ceratophrys joazeirensis</i>	0,1	13290	7298	42,58
			7169	
			8427	
<i>Bufo rubescens</i>	1	23398	27	99,87
			30	
			25,6	
<i>Bufo jimi</i>	0,1	1957	1753	18,61
			1548	
			1477	
<i>Leptodactylus ocellatus</i>	0,1	23398	10376	55,61
			10396	
			-	

FIGURA 2

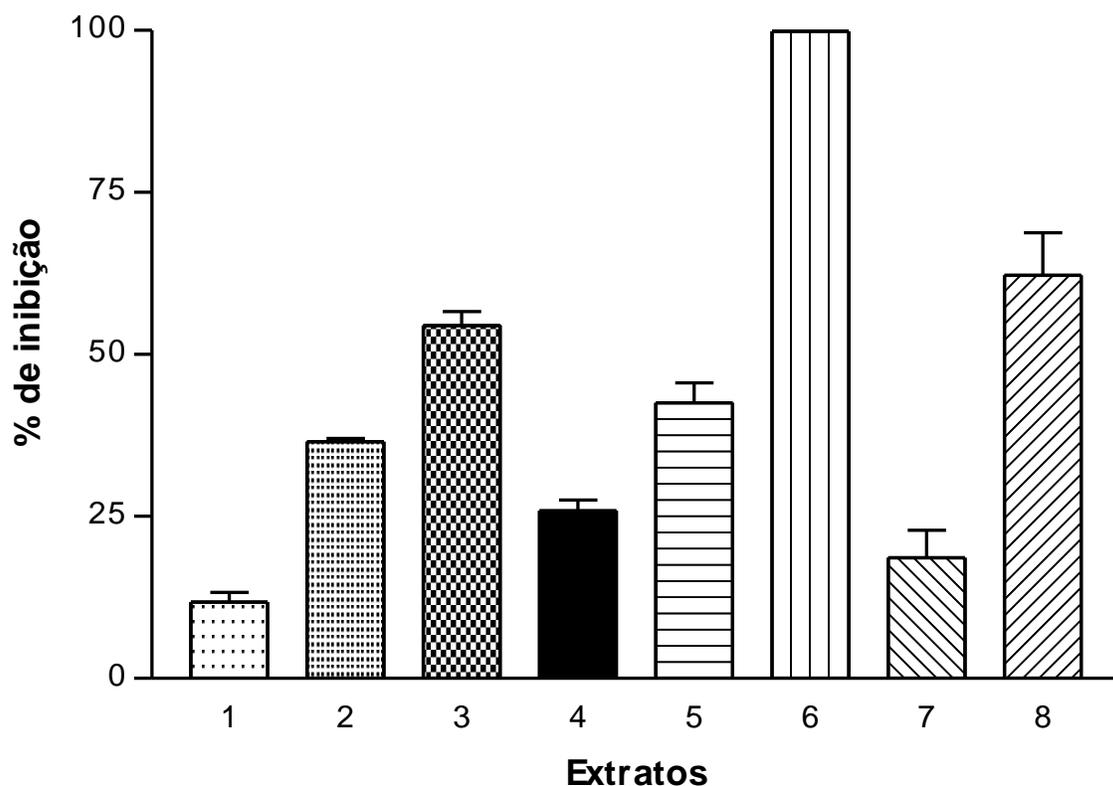


Fig. 2: Ensaio de inibição da linfoproliferação por extratos de pele de anuros do semi-árido brasileiro. Células de baço de camundongos BALB/c foram estimuladas com Con A na presença ou ausência dos extratos (EP), nas concentrações máximas atóxicas, durante 48 horas. A proliferação foi avaliada pela medida da incorporação de ^3H – timidina. Os percentuais de inibição foram calculados de acordo com a fórmula descrita em material e métodos utilizando os valores relacionados às células estimuladas somente com Con A. 1 - *Hyla crepitans*, 2 – *Hyla albopunctata*, 3 – *Hyla spn*, 4 – *Hyla spn 2*, 5 – *Ceratophrys joazeirensis*, 6 – *Bufo rubescens*, 7 - *Bufo jimi*, 8 – *Leptodactylus ocellatus*. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão das triplicatas ou duplicatas. $p < 0,05$.

O extrato de pele *Bufo jimi*, embora pertencente ao gênero de *Bufo rubescens*, apresentou atividade inibitória da proliferação de esplenócitos ativado inferior a 20% (Figura 2). O extrato de glândula de *Bufo rubescens* apresentou atividade inibitória superior a 90%, resultado semelhante ao do extrato de pele (Tabela 5 e figura 3). Como os extratos de pele e glândula de *Bufo rubescens* apresentaram 100% de atividade inibitória, estes foram avaliados mais aprofundadamente.

Realizou-se experimento para avaliação da capacidade destes extratos (EP e EG) em inibir, em diferentes concentrações, a proliferação de esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com Con A. Tanto o extrato de pele (Tabela 6 e figura 4) quanto o de glândula (Tabela 7 e figura 5) apresentaram atividade inibitória concentração-dependente, com 100% de inibição na concentração de 1 mg/mL.

TABELA 5: Avaliação de inibição da linfoproliferação por extratos de pele e glândula de anuros do gênero *Bufo*

Espécies	Tipo de extrato	Concentração (mg/mL)	Controle	CPM	% de inibição
<i>Bufo rubescens</i>	Pele	1	23398	27	99,87
				30	
				25,5	
<i>Bufo rubescens</i>	Glândula	1	20851	23,5	99,85
				35,5	
				28	
<i>Bufo jimi</i>	Pele	0,1	1957	1753	18,61
				1548	
				1477	
<i>Bufo jimi</i>	Glândula	0,01	28626	21637	22,08
				22516	
				22747	

FIGURA 3

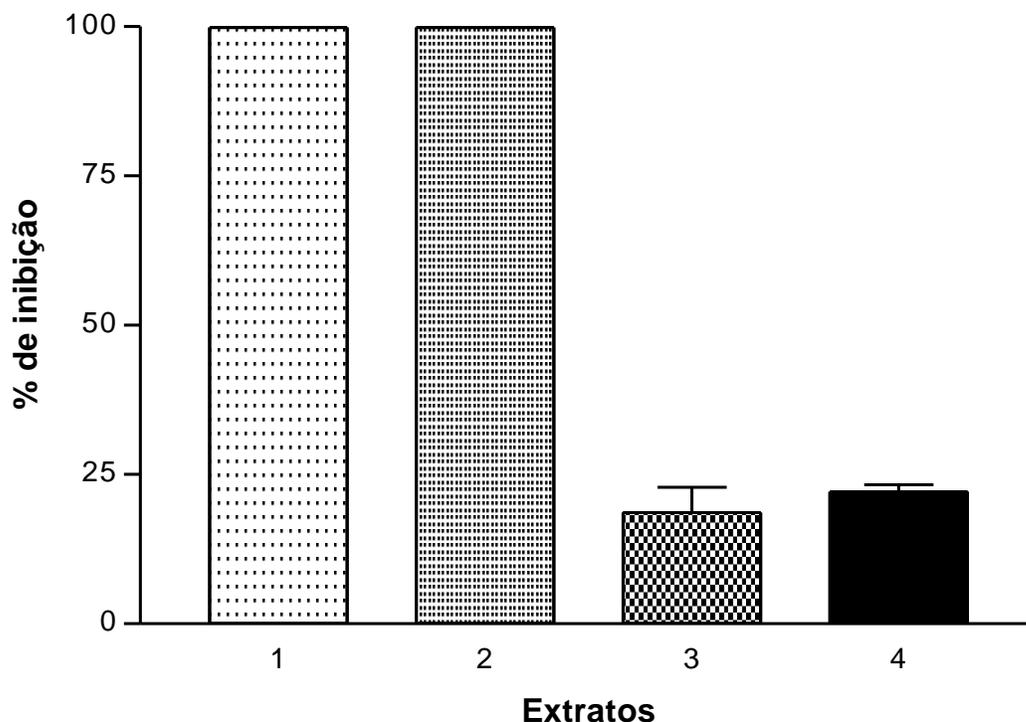


Fig. 3: Ensaio de inibição da linfoproliferação por extratos de pele e glândula de anuros do semi-árido brasileiro. Células de baço de camundongos BALB/c foram estimuladas com Con A na presença dos extratos (EP e EG), nas concentrações máximas atóxicas, durante 48 horas. A proliferação foi avaliada pela medida da incorporação de ^3H – timidina. O percentual de inibição foi calculado em relação às células estimuladas com Con A, na ausência de extratos. 1 – *Bufo rubescens* (pele), 2 - *Bufo rubescens* (glândula), 3 - *Bufo jimi* (pele), 4 - *Bufo jimi* (glândula). Os valores correspondem à média \pm desvio padrão das triplicatas. $p < 0,05$.

TABELA 6: Ensaio dose-resposta da inibição da linfoproliferação por extrato de pele de *Bufo rubescens*

Concentração (mg/mL)	Controle	CPM	% de inibição
0,001	9713	9196	2,81
		9528	
		9593	
0,01	9713	7008	28,5
		6957	
		6863	
0,1	9713	2475	73,1
		2582	
		2754	
1	9713	30	99,72
		24	
		25	

FIGURA 4

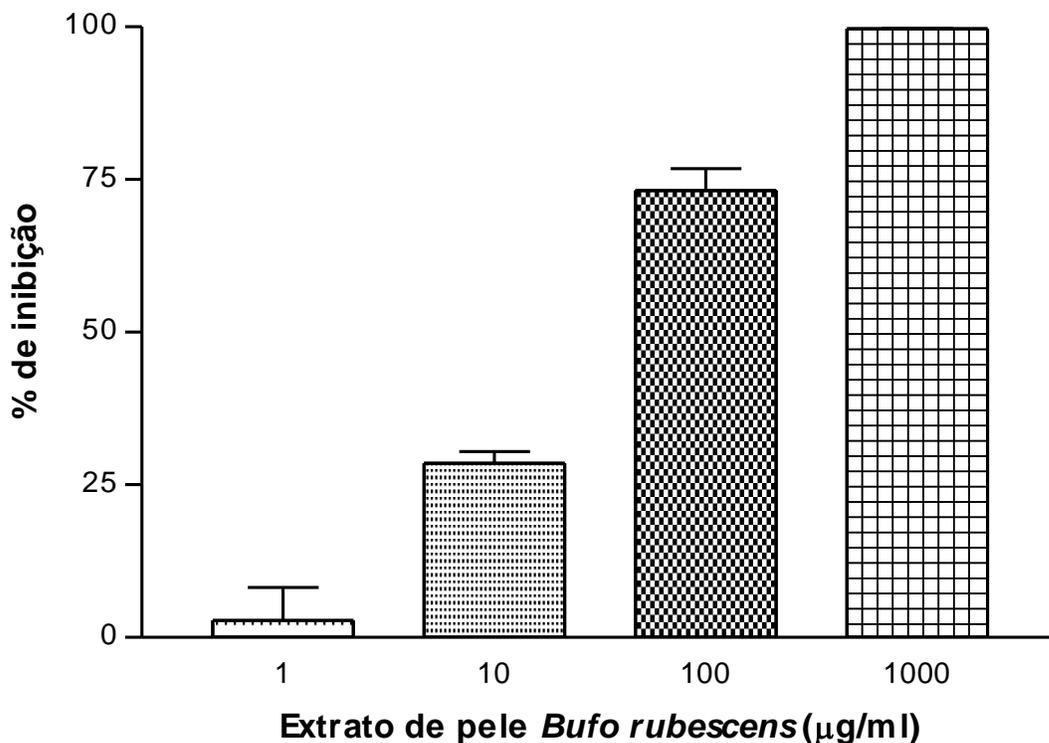


Fig. 4: Ensaio dose-resposta da inibição da linfoproliferação por extrato de pele de *B. rubescens*. Esplenócitos de camundongos BALB/c foram estimulados com Con A na presença do extrato de pele de *B. rubescens* em diferentes concentrações de proteínas. A proliferação foi avaliada pela medida da incorporação de ^3H – timidina. O percentual de inibição foi calculado em relação às culturas estimuladas com Con A, na ausência dos extratos. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão das triplicatas. $p < 0,05$.

TABELA 7: Ensaio dose-resposta da inibição da linfoproliferação por extrato de glândula de *B. rubescens*

Concentração (mg/mL)	Controle	CPM	% de inibição
0,001	20851	17419	18,83
		16427	
		-	
0,01	20851	14387	32,21
		14112	
		13900	
0,1	20851	10669	49,95
		10205	
		-	
1	20851	23,5	99,87
		25,5	
		28	

FIGURA 5

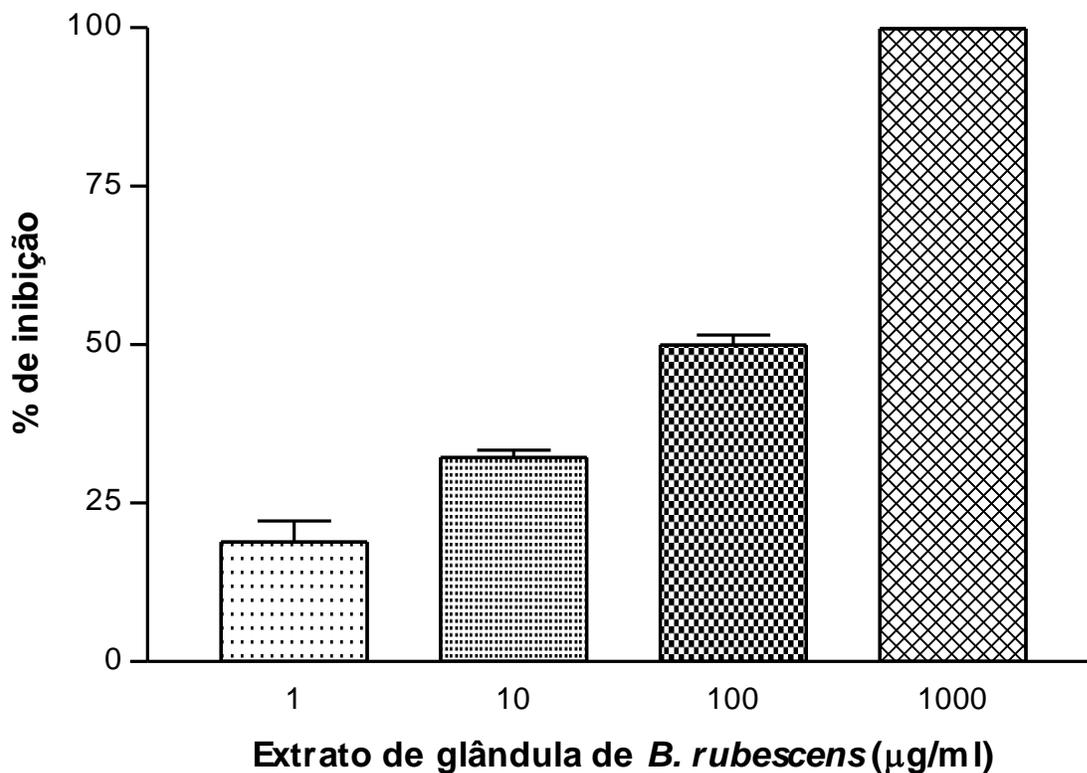


Fig. 5: Ensaio dose-resposta da inibição da linfoproliferação por extrato de glândula de *B. rubescens*. Esplenócitos de camundongos BALB/c foram estimulados com Con A na presença do extrato de glândula de *B. rubescens* em diferentes concentrações. A proliferação foi avaliada pela medida da incorporação de ^3H – timidina. O percentual de inibição foi calculado em relação às culturas estimuladas com Con A, na ausência dos extratos. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão das triplicatas ou duplicatas. $p < 0,05$.

5.4 Ensaio de linfoproliferação antígeno-específico utilizando antígeno de *T. cruzi*

Para aumentar uma resposta adaptativa a algum antígeno, linfócitos específicos a esses antígenos devem proliferar abundantemente antes de se diferenciarem em células efetoras funcionais para que se obtenha um número suficiente de células efetoras de determinada especificidade (CHAMBERS *et al.*, 1999). Entretanto, é difícil detectar a proliferação de linfócitos normais em resposta a um antígeno específico porque apenas uma porção mínima de células será estimulada a se dividir. Algumas substâncias induzem mitose em linfócitos de várias especificidades diferentes ou de diferentes origens clonais e por isso são denominadas mitógenos policlonais, como por exemplo a concanavalina A (JANEWAY *et al.*, 2001).

Realizou-se então experimento para avaliação da capacidade do extrato de pele de *Bufo rubescens* de inibir a proliferação antígeno-específica de esplenócitos de camundongo cronicamente infectado com *Trypanosoma cruzi* estimulados com antígeno do parasito, em diferentes concentrações. Nesse ensaio também foi observada uma inibição da resposta linfoproliferativa de maneira concentração-dependente (Tabela 8 e figura 6).

TABELA 8: Ensaio de linfoproliferação antígeno-específico utilizando antígeno de *T. cruzi* e extrato de pele de *Bufo rubescens*

Concentração (mg/mL)	Controle	CPM	% de inibição
0,001	1813	1801	0,28
		1863	
		1808	
0,01	1813	1391	23,73
		1375	
		1382	
0,1	1813	135	92
		180	
		150	
1	1813	3	99,74
		5	
		6	

FIGURA 6

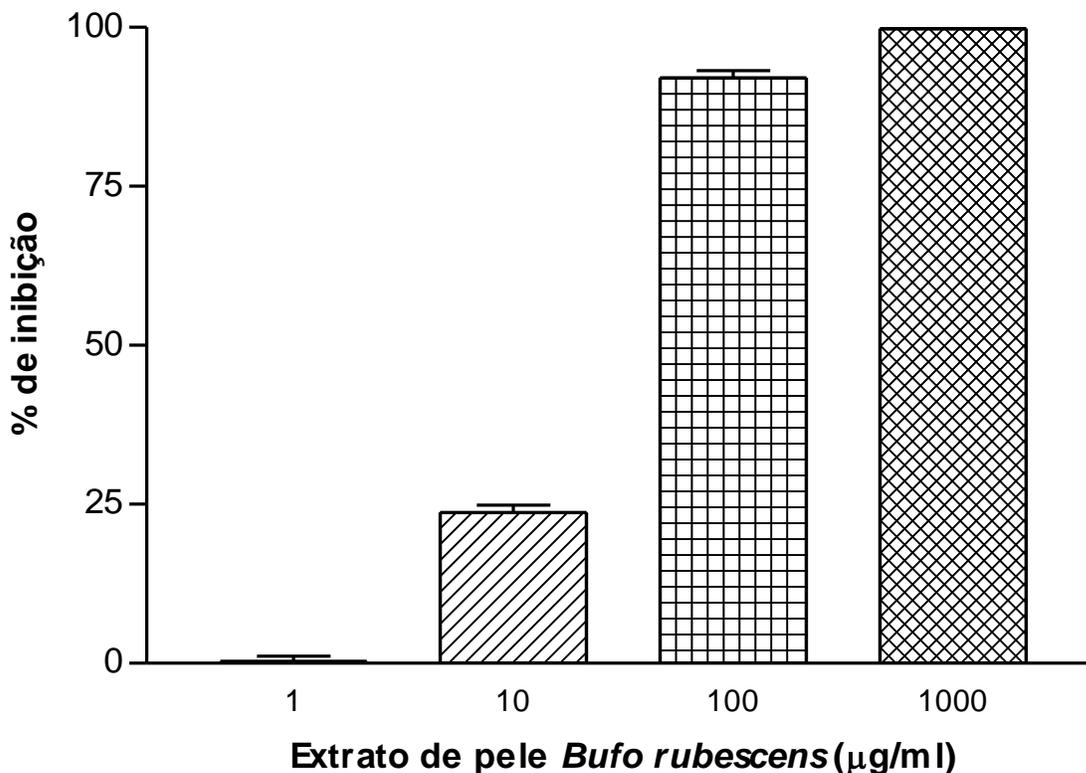


Fig. 6: Ensaio de linfoproliferação antígeno-específico. Esplenócitos de camundongos BALB/c cronicamente infectados por *Trypanosoma cruzi* foram estimulados *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* (50 µg/mL) na presença do extrato de pele de *Bufo rubescens*, em diferentes concentrações. A proliferação foi avaliada pela medida da incorporação de ³H – timidina. O percentual de inibição foi calculado em relação às culturas estimuladas com antígeno de *T. cruzi*, na ausência dos extratos (EP). Os valores correspondem à média ± desvio padrão das triplicatas. p<0,05.

5.5 Identificação da molécula ativa no extrato de pele *Bufo rubescens*

Como, dentre os extratos avaliados, o extrato de pele de *B. rubescens* apresentou a maior atividade inibitória tanto da produção de NO, quanto da proliferação de esplenócitos estimulados, procedeu-se ao fracionamento do extrato visando a caracterização das substâncias responsáveis pela atividade imunomoduladora no extrato de pele de *B. rubescens* (Tabela 9 e figura 7).

Uma amostra do extrato (EP) de *Bufo rubescens* (2 mL) foi inicialmente filtrada utilizando microconcentradores (filtro Centricon) com poro de 10 kDa e novamente testada em ensaio de linfoproliferação. Esse filtrado apresentou atividade inibitória. Visando avaliar a estabilidade térmica do extrato uma amostra desse filtrado (500 µl) foi aquecida a 100°C por 30' e novamente testada apresentando também atividade inibitória em ensaio de linfoproliferação. Outra amostra do filtrado em filtro Centricon de 10 kDa (500 µl) foi tratada com proteinase K (100 µg/mL) durante 30' e depois testada em ensaio de linfoproliferação não apresentou atividade inibitória.

TABELA 9: Análise da atividade inibitória do extrato de pele de *Bufo rubescens* em diferentes condições.

Condições	Controle	Tratado		Não tratado	
		CPM	% de inibição	CPM	% de inibição
Filtração em filtro Centricon de 10 kDa	21321	2078	90,03	4,5	99,97
		2187		3,5	
		2111		6	
30 ' de incubação a 100 ° C	1957	30,8	98,56	25,8	98,69
		22,6		26,8	
		30,8		24,2	
30 ' de incubação com proteinase K	470	814	0	28	93,54
		713		31	
		-		-	

5.6 Purificação do extrato de pele de *Bufo rubescens*

O filtrado resultante da primeira purificação utilizando microconcentradores/filtro Centricon com filtros contendo poro de 10kDa passou por um processo de purificação adicional. Essa amostra foi aplicada em coluna FPLC de troca iônica (Mono Q) em gradiente linear de NaCl. As frações foram coletadas e imediatamente colocadas em gelo. As frações resultantes dessa coluna foram dialisadas utilizando membrana de diálise com poro de 2kDa e testadas. Apenas uma amostra apresentou atividade inibitória significativa (Tabela 10 e figura 7).

A fração ativa (nº 5) resultante do fracionamento da coluna Mono-Q foi tratada com proteinase K e novamente testada, com o objetivo de confirmar a natureza protéica desta fração como pode ser observado na figura 8, a fração nº 5 tratada com proteinase K não apresentou atividade inibitória em ensaio de linfoproliferação (Tabela 11 e figura 8).

TABELA 10: Fracionamento do extrato de pele de *Bufo rubescens*.

Amostra	Controle	CPM	% de inibição
Fração 5	14125	1924	81,23
		3380	
		2652	
Filtrado (nº14)	14125	2367	83,7
		2516	
		2204	

FIGURA 7

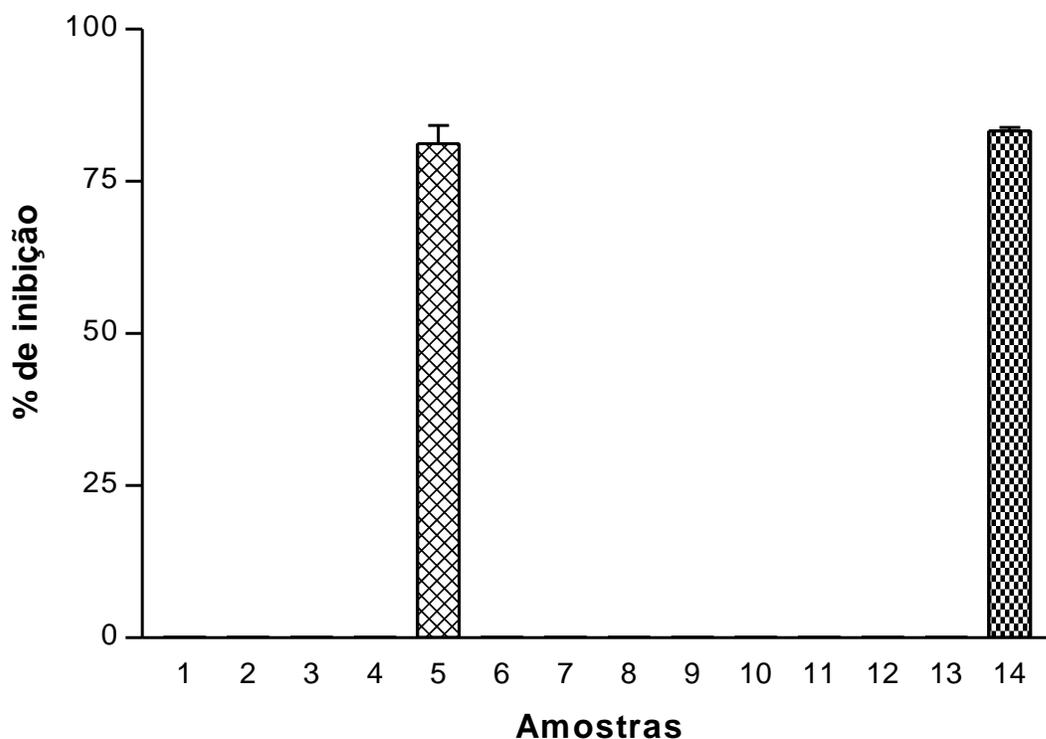


Fig. 7: Fracionamento do extrato de pele de *Bufo rubescens*. O extrato de pele foi filtrado em um filtro Centricon com poro de 10 kDa e fracionado em coluna Mono Q por FPLC. As frações coletadas foram dialisadas e testadas em ensaio utilizando esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com Con A. 1-13: frações coletadas na coluna Mono Q; 14: Controle (Filtrado em filtro Centricon de 10 kDa -1mg/mL). Os valores correspondem à média \pm desvio padrão das triplicatas. $p < 0,05$.

TABELA 11: Ensaio de inibição da proliferação com frações da coluna Mono Q.

Amostra	Controle	CPM	% de inibição
1	1339,5	2595	0
		2400	
		2334	
2	1339,5	644	51,93
		649	
		-	
3	1339,5	10,72	99,1
		13,39	
		-	

FIGURA 8

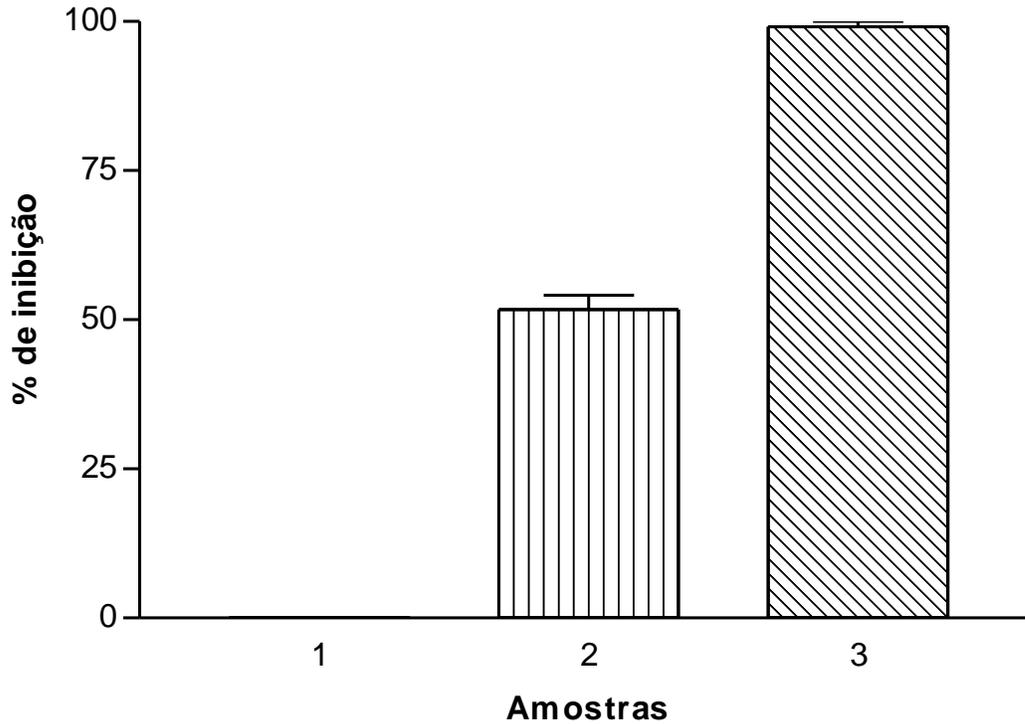


Fig. 8: Ensaio de inibição da linfoproliferação com frações da coluna Mono

Q. Esplenócitos de camundongos BALB/c foram estimulados com Con A na

presença da fração ativa resultante da coluna Mono Q e tratada com proteinase K.

O percentual de inibição foi calculado em relação às culturas estimuladas com

Con A, mas não-tratadas. A proliferação foi avaliada pela medida da incorporação

de ^3H – Timidina. 1 – Fração tratada com proteinase K (1 mg/mL); 2 – Fração não-

tratada (1 mg/mL); 3-Filtrado em filtro Centricon com poro de 10 kDa (1 mg/mL).

Os valores correspondem à média \pm desvio padrão das triplicatas. $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Este trabalho é um estudo imunofarmacológico de extratos de peles e glândulas de espécies de anuros nativas ou endêmicas do semi-árido brasileiro. Esse trabalho representa uma colaboração com profissionais das áreas de zoologia e imunofarmacologia, aspecto fundamental neste estudo farmacológico da pele e glândulas desses animais.

Visando identificar substâncias a serem desenvolvidas como fármacos apropriados para o tratamento de doenças alérgicas, doenças autoimunes e /ou transplantes de órgãos, foram obtidos extratos de pele e glândula parotóides de várias espécies de anuros oriundos do semi-árido brasileiro. Posteriormente esses extratos foram testados em sua capacidade de modular a atividade biológica de macrófagos na produção de óxido nítrico e de linfócitos, utilizando como modelos células da linhagem J774 e esplenócitos de camundongos BALB/c, respectivamente.

Para a avaliação da citotoxicidade, estabeleceu-se uma concentração onde a toxicidade apresentada pelos extratos de peles e glândulas parotóides atingisse um valor máximo (limite) de 30%. Dos oito extratos de pele analisados, cinco (extrato de *Hyla crepitans*, *H. albopunctata*, *Leptodactylus ocellatus*, *Ceratophrys joazeirensis* e *Bufo jimi*) apresentaram toxicidade máxima de 30% na concentração de 0,1 mg/mL e três (*H. spn*, *B. rubescens* e *H. spn 2*) na concentração de 1 mg/mL. Dos dois extratos de glândula analisados, o extrato de *B. jimi* apresentou toxicidade máxima de 30% na concentração de 0,01 mg/mL e o extrato de *B. rubescens* na concentração de 1 mg/mL.

Nos experimentos realizados para avaliação da inibição da síntese de NO, um extrato (da pele de *B. rubescens*) apresentou atividade inibitória elevada (acima de 90%). O extrato de glândula dessa mesma espécie não apresentou atividade. No ensaio de NO testamos também os extratos de pele e de glândula de *Bufo jimi*. Nestes, embora pertencentes ao mesmo gênero de *Bufo rubescens*, também não se observou atividade inibitória da produção de NO. Nos ensaios para os extratos de pele de *Hyla spn* observamos atividade inibitória discreta. Com relação aos extratos de pele de *Hyla crepitans*, *Hyla albopunctata*, *Leptodactylus ocellatus* e *Ceratophrys joazeirensis* não observamos atividade inibitória. Alguns desses extratos estimularam a produção de NO, como o extrato de *B. jimi* (EG), *C. joazeirensis* (EP) e *H. albopunctata* (EP). Na presença desses extratos, a produção de NO foi maior que o controle.

Nos ensaios para avaliação da proliferação de esplenócitos estimulados com Con A, os extratos de *Hyla spn* (EP), *Leptodactylus ocellatus* (EP) e *Bufo rubescens* (EP e EG) apresentaram atividade inibitória acima de 50%. Os extratos de *Hyla crepitans* (EP), *Hyla albopunctata* (EP), *Ceratophrys joazeirensis* (EP), *Bufo jimi* (EP e EG) e *Hyla spn 2* (EP) apresentaram atividade inibitória da linfoproliferação inferior a 50%. O extrato de pele de *Bufo rubescens* demonstrou atividade de modo concentração – dependente sendo 100 % inibitória na concentração de 1 mg/mL.

A concanavalina A é uma lectina (RUDIGER e GABIUS, 2001) que atua como um mitógeno policlonal devido à sua capacidade de induzir mitose em linfócitos de diferentes origens clonais (JANEWAY *et al.*, 2001). Assim, foi feita a avaliação do extrato (EP) de *B. rubescens* na proliferação de linfócitos estimulados

com mitógeno específico para estas células. Para investigar se a inibição da proliferação por este extrato não era devido a uma interferência na ligação da Con A com os esplenócitos, linfócitos de camundongos chagásicos crônicos foram estimulados com antígeno de *T. cruzi* (50 µg/mL) na presença do extrato de *B. rubescens* em diferentes concentrações. Observou-se, uma atividade inibitória semelhante à observada no experimento realizado com estimulação por Con A, de forma concentração-dependente, demonstrando que este extrato possui de fato uma atividade imunossupressora.

A pele dos anuros é uma rica fonte de moléculas biologicamente ativas, incluindo peptídeos (ERSPAMER, 1980). Um peptídeo isolado da pele de *Hyla punctata* com atividade antimicrobiana, antifúngica e hemolítica já foi caracterizado estrutural e funcionalmente (PRATES *et al.*, 2004). Peptídeos isolados da pele de *Xenopus laevis*, denominados magaininas, apresentam amplo espectro de atividade antimicrobiana (ZASLOFF, 1987). Tigerininas, nome dado aos peptídeos isolados da pele de *Rana tigerina* também apresentam atividade antimicrobiana (SAI *et al.*, 2001). Um peptídeo leucina-arginina com potente atividade imunomoduladora em mastócitos e células progenitoras granulopoiéticas foi isolado da pele de *Rana pipiens* (SALMON *et al.*, 2001). A análise da atividade antimicrobiana de secreções de pele de *Phyllomedusa bicolor* revelou seis peptídeos relacionados, com 24 a 33 resíduos de aminoácidos, denominados dermaseptinas B1 a B6 (CHARPENTIER *et al.*, 1998).

Todos os extratos testados para atividade imunomoduladora também foram testados quanto à atividade antibacteriana em outro estudo realizado por nossa equipe (dados não publicados). Embora haja diversas citações na literatura

relacionadas à atividade antimicrobiana de peptídeos isolados da pele de anuros não foram obtidos resultados semelhantes em relação a este aspecto nos extratos testados. Por outro lado, apesar de ter sido detectada atividade imunomodulatória nas amostras testadas, há poucos trabalhos para peptídeos isolados da pele de anuros relacionados a esta atividade. Naqueles trabalhos onde se observou atividade antibacteriana nas secreções de peles de anuros, a forma de extração da molécula ativa foi por estímulo elétrico (PRATES e JUNIOR, 2000) ou injeção de adrenalina no saco dorsal do animal (SAI *et al.*, 2001), induzindo desse modo a produção das moléculas de interesse em grandes concentrações. Nesse trabalho a forma de produção dos extratos foi por trituração da pele do animal em água. Com isso, os peptídeos antimicrobianos poderiam estar em concentrações insuficientes para a detecção de suas atividades.

Uma outra questão que deve ser levada em consideração é a poluição e degradação de espécies pertencentes à biodiversidade neste país. Os efeitos do aumento da radiação ultravioleta, resultante da redução da camada de ozônio causada pela poluição, pode estar afetando o sistema imunológico desses animais. Um exemplo disso é o fato de ter-se encontrado, em Santa Catarina, espécimes de *Phyllomedusa distincta* com a pele infectada por fungos. Os anuros daquela região correm risco de extinção devido aos desmatamentos, envenenamento das lagoas naturais por agrotóxicos e à proliferação de lagoas destinadas à criação de espécies exóticas de peixes predadores (WOEHL, 2000). Diante dessas considerações pode-se sugerir que, no semi-árido brasileiro, a poluição e degradação ambiental também estejam influenciando na composição de substâncias na pele dos anuros. Este seria um outro fator que poderia

influenciar na composição das substâncias presentes em nossos extratos (EP e EG). Deve-se considerar também a quantidade de material bastante reduzido disponível para o estudo. Esta foi uma limitação relevante no trabalho.

O extrato (EP) de *Bufo rubescens* foi o que apresentou maior atividade inibitória nos ensaios realizados neste estudo. Desse modo, direcionou-se os trabalhos para a identificação, purificação e isolamento da molécula ativa deste extrato. Incubou-se o extrato (EP) por trinta minutos a 100°C; após fervida, a amostra foi testada novamente no ensaio de linfoproliferação, no qual apresentou atividade semelhante à amostra (EP) tratada com calor, o que demonstra que a molécula ativa do extrato de *B. rubescens* é termo-estável. Esse mesmo extrato foi incubado por mais trinta minutos na presença da proteinase K, uma serina protease de 28,9 kDa (BURTON *et al.*, 1993). Com este tratamento, o extrato (EP) perdeu atividade quando avaliado no ensaio de linfoproliferação, demonstrando que a molécula ativa do extrato de *B. rubescens* é de natureza protéica.

Para se estimar o peso molecular da molécula responsável pela atividade do extrato (EP) de *B. rubescens*, este foi submetido a uma filtração utilizando microconcentradores/filtro Centricon com filtros contendo poro em Daltons de 10, 30 e 100 mil. O material filtrado no filtro Centricon de 10 kDa apresentou novamente atividade inibitória da linfoproliferação semelhante à do material não-filtrado. O filtrado em filtro Centricon de 10 kDa foi dialisado utilizando membrana de diálise com poro de 2 kDa. Ao final da diálise testou-se a amostra restante no tubo de diálise e esta não perdeu atividade. Diante dessas considerações, pode-se afirmar que a molécula responsável pela atividade imunomodulatória tem peso molecular entre 2 e 10 kDa.

Realizou-se também eletroforese em gel de poliacrilamida 7.5%, 12%, e 15% (SDS-PAGE) na tentativa de se caracterizar a proteína ativa (com peso molecular entre 2 e 10 kDa) do extrato (EP) de *B. rubescens*. Utilizou-se coloração com prata e com Comassie Blue. No entanto, não foi possível detectar a proteína deste extrato em nenhum dos corantes utilizados (dados não publicados). É provável que este fato seja devido à baixa concentração dessas moléculas no extrato (EP).

O filtrado em filtro Centricon de 10 kDa foi submetido a um fracionamento em coluna Mono Q por FPLC. Somente uma fração (nº 5) apresentou atividade. Esta foi tratada com proteinase K, como descrito anteriormente, confirmando-se a natureza protéica da mesma (Figura 8). A fração não tratada apresentou um percentual de inibição menor que o controle (filtrado em centricon de 10 kDa), o que pode ser explicado pela possível perda da estabilidade da molécula ativa após a purificação. Essa estabilidade poderia estar relacionada a uma associação da molécula ativa com outras moléculas do extrato antes da purificação. A fração ativa (nº 5) está sendo analisada por espectroscopia de massa (em colaboração com o Dr. Mario Palma, UNESP, Rio Claro) para posterior sequenciamento. Uma quantidade maior do extrato de pele de *Bufo rubescens* foi novamente filtrada em filtro Centricon de 10 kDa e este filtrado do extrato (EP) de *Bufo rubescens* está em fase de purificação, através de repetidas passagens em coluna Mono Q por FPLC com o objetivo de se obter quantidade suficiente de material para posterior análise por espectroscopia de massa, sequenciamento e síntese da molécula responsável pela atividade imunomoduladora.

Este trabalho é pioneiro no estudo de atividade imunomoduladora de extrato de pele de *Bufo rubescens*. Observamos uma diferença significativa de atividade imunomodulatória em duas espécies diferentes, mas pertencentes ao mesmo gênero: *Bufo rubescens* e *Bufo jimi*. Diferenças na atividade podem significar variações na concentração dessas substâncias ativas na pele dos animais das duas espécies.

Para os ensaios com a espécie *Bufo rubescens* utilizou-se dois espécimes coletados em épocas diferentes, com pesos e tamanhos diferentes. O primeiro lote de pele com peso de 4,4 g foi processado e obteve-se uma concentração de proteínas no extrato de 9,5 mg/mL; no segundo lote de pele, com 6,3 g de peso, obteve-se uma concentração de 16 mg/mL de proteínas. No entanto, embora tenhamos encontrado concentrações de proteínas diferentes nos dois espécimes testados (diretamente proporcional ao peso), a atividade imunomodulatória avaliada foi semelhante entre esses dois espécimes. Esses dados indicam que para essas substâncias imunomoduladoras, embora os dois animais não sejam isogênicos, a distribuição das mesmas na pele desses animais é bastante homogênea.

Os extratos de pele e glândula de *Bufo jimi* não apresentaram diferenças significativas na capacidade de inibir a proliferação de linfócitos estimulados com Con A e a produção de NO por células da linhagem J774 estimuladas com LPS e IFN- γ . Diferenças na composição de substâncias ativas entre secreções de pele e glândula de um mesmo espécime não têm sido previamente estudadas por pesquisadores que trabalham com secreções cutâneas de espécies do gênero

Bufo (MACIEL *et al.*, 2003). Entretanto, parece haver uma variação na atividade de enzimas envolvidas na síntese desses compostos na pele e glândula parotóide. A composição e a concentração desses compostos na pele dos anfíbios podem variar com a espécie, estágio de desenvolvimento e distribuição geográfica (SEBBEN, 1993). Indolalquilaminas, substâncias encontradas em secreções de peles de *Bufo*, podem estar em diferentes concentrações numa mesma espécie coletada em locais diferentes (CEI *et al.*, 1968). Por outro lado, extratos de pele e glândula de *Bufo rubescens* apresentaram percentuais semelhantes de atividade inibitória da proliferação de linfócitos ativado por Con A, de maneira concentração-dependente, sugerindo a ocorrência de duas substâncias ativas no mesmo extrato de pele, já que o extrato de glândula não apresentou atividade inibitória da produção de NO (figura 1).

Espécies pertencentes ao gênero *Bufo* têm sido extensivamente estudadas quanto à composição química da pele. Lectinas isoladas a partir da pele de *B. arenarum* apresentam atividade de hemaglutinação e antibacteriana (SANCHEZ RIERA *et al.*, 2003). Substâncias isoladas de espécies do gênero *Bufo* são conhecidas como bufogeninas. Essas substâncias compartilham um espectro de ação farmacológica com os glicosídeos digitálicos (FLIER *et al.*, 1979).

Nossos resultados sugerem que a molécula ativa presente no extrato de *Bufo rubescens* apresenta baixo peso molecular. Esse fato é importante no nosso estudo devido à facilidade de síntese (PRATES *et al.*, 2004). A clonagem também é uma alternativa para produzir, em grandes quantidades, esta substância o que permitirá a continuidade do estudo. É extremamente relevante o fato de sintetizar

a molécula ativa, devido à necessidade de preservação da biodiversidade do semi-árido brasileiro.

A substância que será purificada a partir do extrato de pele de *Bufo rubescens* poderá ser produzida em grandes quantidades por clonagem ou síntese para que seja reavaliada em modelos experimentais *in vitro* mais específicos e sensíveis. Serão realizados adicionalmente experimentos de linfoproliferação através de reação mista linfocitária. A partir deste ponto, a substância pura será submetida a avaliações em modelos experimentais para imunopatologias *in vivo* e também avaliações toxicológicas.

A ausência de uma metodologia sistematizada a ser adotada para pesquisa de atividade imunomoduladora de substâncias isoladas da pele de anuros têm dificultado o acúmulo de dados neste sentido. Numerosas espécies têm sido estudadas levando ao isolamento e caracterização de várias substâncias bioativas. No entanto, poucos estudos têm sido realizados para identificar atividade imunomoduladora nessas substâncias. Essas considerações ressaltam a relevância do presente estudo em relação à caracterização de substâncias isoladas de extratos de peles de anuros do semi-árido brasileiro, considerando o grande potencial dos extratos de pele de anuros em apresentarem atividade farmacológica e o desconhecimento das propriedades dos anuros nativos dessa região.

Drogas utilizadas atualmente para doenças do sistema imunológico têm custo relativamente elevado e alto índice de reações adversas. Os antiinflamatórios não esteroidais podem causar síndrome nefrótica nos pacientes

(HUANG *et al.*, 2004). De fato, este extrato pode inibir a proliferação de esplenócitos ativados. Serão realizados posteriormente testes mais refinados de toxicidade para avaliar a molécula ativa do extrato de pele de *Bufo rubescens*. É provável que uma molécula com baixa toxicidade apresente menor risco de reações adversas para os pacientes. Nossos dados sugerem que a partir do extrato de *B. rubescens* poderemos chegar à molécula ativa e esta é um potencial candidato a uma nova droga imunomoduladora.

7. CONCLUSÕES

- Nossos dados demonstram o potencial farmacológico dos anuros do semi-árido brasileiro, em particular quanto á atividade imunomoduladora.
- Os extratos de pele e glândula de *B. rubescens* apresentaram atividade supressora da proliferação de linfócitos.
- A partir do extrato de pele de *Bufo rubescens*, está sendo isolada uma molécula protéica, com peso molecular entre 2 e 10 kDa, com atividade imunossupressora.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, M. P., GUINAZU, N. L., PELLEGRINI, A. V., GOTOH, T., MASIH, D. T. e GEA, S. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, **286**(2): C206-12. 2004

BRAND, G. D., LEITE, J. R., SILVA, L. P., ALBUQUERQUE, S., PRATES, M. V., AZEVEDO, R. B., CARREGARO, V., SILVA, J. S., SA, V. C., BRANDAO, R. A. e BLOCH, C., JR. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. **J Biol Chem**, **277**(51): 49332-40. 2002

BURKE, J. F., JR., PIRSCH, J. D., RAMOS, E. L., SALOMON, D. R., STABLEIN, D. M., VAN BUREN, D. H. e WEST, J. C. Long-term efficacy and safety of cyclosporine in renal-transplant recipients. **N Engl J Med**, **331**(6): 358-63. 1994

BURTON, K. S., WOOD, D. A., THURSTON, C. F. e BARKER, P. J. Purification and characterization of a serine proteinase from senescent sporophores of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. **J Gen Microbiol**, **139 Pt 6**: 1379-86. 1993

CALIXTO, J. B. Biopirataria. **Ciencia Hoje**, **28**(167): 36-43. 2000

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Revista Ciencia e Cultura**, **55**(3): 37-39. 2003

CEI, J. M., ERSPAMER, V. e ROSEGHINI, M. Taxonomic and evolutionary significance of biogenic amines and polypeptides occurring in amphibian skin. I. Neotropical leptodactylid frogs. **Syst Zool**, **16**(4): 328-42. 1968

CHAMBERS, C. A., KUHNS, M. S. e ALLISON, J. P. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) regulates primary and secondary peptide-specific CD4(+) T cell responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **96**(15): 8603-8. 1999

CHARPENTIER, S., AMICHE, M., MESTER, J., VOUILLE, V., LE CAER, J. P., NICOLAS, P. e DELFOUR, A. Structure, synthesis, and molecular cloning of dermaseptins B, a family of skin peptide antibiotics. **J Biol Chem**, **273**(24): 14690-7. 1998

CHEN, T., ZHAO, X., LIU, Y., SHI, Q., HUA, Z. e SHEN, P. Analysis of immunomodulating nitric oxide, iNOS and cytokines mRNA in mouse macrophages induced by microcystin-LR. **Toxicology**, **197**(1): 67-77. 2004

CLASSEN, J. B. Cyclosporine induced autoimmunity in newborns prevented by early immunization. **Autoimmunity**, **27**(3): 135-9. 1998

CORRIGAN, C. J. e KAY, A. B. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Immunol Today**, **13**(12): 501-7. 1992

DALY, J. W., MYERS, C. W. e WHITTAKER, N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. **Toxicon**, **25**(10): 1023-95. 1987

DALY, J. W., NOIMAI, N., KONGKATHIP, B., KONGKATHIP, N., WILHAM, J. M., GARRAFFO, H. M., KANEKO, T., SPANDE, T. F., NIMIT, Y., NABHITABHATA, J. e CHAN-ARD, T. Biologically active substances from amphibians: preliminary studies on anurans from twenty-one genera of Thailand. **Toxicon**, **44**(8): 805-15. 2004

DAVILA, A. M., STEINDEL, M. e GRISARD, E. C. Tropical diseases, pathogens, and vectors biodiversity in developing countries: need for development of genomics and bioinformatics approaches. **Ann N Y Acad Sci**, **1026**: 41-6. 2004

DOWNTON, C. e CLARK, I. Statins--the heart of the matter. **Nat Rev Drug Discov**, **2**(5): 343-4. 2003

ERSPAMER, V. M., P. Active polypeptides: from amphibian skin to gastrointestinal tract and brain of mammals. **Trends in Pharmacological Sciences**, **1**(2): 391-395. 1980

FEDERICI, E. E., ABELMANN, W. H. e NEVA, F. A. Chronic and progressive myocarditis and mitosis in C3H mice infected with *T. cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **13**. 272-280. 1964

FLIER, J. S., MARATOS-FLIER, E., PALLOTTA, J. A. e MCISAAC, D. Endogenous digitalis-like activity in the plasma of the toad *Bufo marinus*. **Nature**, **279**(5711): 341-3. 1979

GESISKY, J. Descoberta nova espécie de perereca. **Ciencia Hoje**, **34**(201): 40-41. 2004

GORDON, M., CRAGG, D. J. N. e SNADER, K. M. Natural Products in Drug Discovery and Development. **Journal of Natural Products**, **60**: 52-60. 1997

HABERMEHL, G. G. e KREBS, H. C. [Venomous animals and their venoms]. **Naturwissenschaften**, **73**(8): 459-70. 1986

HABICH, C., BAUMGART, K., KOLB, H. e BURKART, V. The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. **J Immunol**, **168**(2): 569-76. 2002

HAY, R., J., C., CHEN, T. R., MACY, M., MCCLINTOCK, P. e YVONNE, R. **ATCC cell lines and hybridomas**. 8 ed. Rockville, 1994

HEATWOLE, H. **Amphibian Biology**. Surrey Beatty and Sons Austrália, 1995

HOEGG, S., VENCES, M., BRINKMANN, H. e MEYER, A. Phylogeny and comparative substitution rates of frogs inferred from sequences of three nuclear genes. **Mol Biol Evol**, **21**(7): 1188-200. 2004

HUANG, J. B., YANG, W. C., YANG, A. H., LEE, P. C. e LIN, C. C. Arterial thrombosis due to minimal change glomerulopathy secondary to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Am J Med Sci**, **327**(6): 358-61. 2004

HUTCHINSON, D. A. e SAVITZKY, A. H. Vasculature of the parotoid glands of four species of toads (bufonidae: bufo). **J Morphol**, **260**(2): 247-54. 2004

IZGUT-UYSAL, V. N., KUCUKATAY, V., BULBUL, M., TAN, R., YARGICOGLU, P. e AGAR, A. Effect of sulfite on macrophage functions of normal and sulfite oxidase-deficient rats. **Food Chem Toxicol**, **43**(4): 599-605. 2005

JANEWAY, C. A. J., TRAVERS, P., WALPORT, M. e SHLOMCHIK, M. J. **Immunobiology. The immune system in health and disease**. 5 ed. Artmed, Porto Alegre, 2001

KRENSKY, A. M., STROM, T. B. e BLUESTONE, J. A. **The pharmacological basis of therapeutics**. Drugs used for immunomodulation. In: Goodman and Gilman's. 20 ed. New York: MacGraw Hill Companies. 2001

LEITE, J. R., SILVA, L. P., RODRIGUES, M. I., PRATES, M. V., BRAND, G. D., LACAVA, B. M., AZEVEDO, R. B., BOCCA, A. L., ALBUQUERQUE, S. e BLOCH, C., JR. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the Phyllomedusa genus. **Peptides**, **26**(4): 565-73. 2005

LUTZ, B. Phyllomedusa bicolor. **Memórias do Instituto Butantan**, **33**. 1966

LYTTLE, T., GOLDSTEIN, D. e GARTZ, J. Bufo toads and bufotenine: fact and fiction surrounding an alleged psychedelic. **J Psychoactive Drugs**, **28**(3): 267-90. 1996

MACIEL, N. M., SCHWARTZ, C. A., RODRIGUES PIRES JUNIOR, O., SEBEN, A., CASTRO, M. S., SOUSA, M. V., FONTES, W. e FERRONI SCHWARTZ, E. N. Composition of indolealkylamines of Bufo rubescens cutaneous secretions compared to six other Brazilian bufonids with phylogenetic implications. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, **134**(4): 641-9. 2003

NEGRI, L., MELCHIORRI, P. e LATTANZI, R. Pharmacology of amphibian opiate peptides. **Peptides**, **21**(11): 1639-47. 2000

PRATES, M. V., , SFORCA, M. L., REGIS, W. C., LEITE, J. R., SILVA, L. P., PERTINHEZ, T. A., ARAUJO, A. L., AZEVEDO, R. B., SPISNI, A. e BLOCH, C., JR. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran Hyla punctata. **J Biol Chem**, **279**(13): 13018-26. 2004

PRATES, M. V. e JUNIOR, C. B. Peptídeos Antimicrobianos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, **17**: 30-36. 2000

RADER, D. J. Effects of nonstatin lipid drug therapy on high-density lipoprotein metabolism. **Am J Cardiol**, **91**(7A): 18E-23E. 2003

ROSE, N. R. Autoimmune disease 2002: an overview. **J Investig Dermatol Symp Proc**, **9**(1): 1-4. 2004

ROSEGHINI, M., ERSPAMER, V., FALCONIERI ERSPAMER, G. e CEI, J. M. Indole-, imidazole- and phenyl-alkylamines in the skin of one hundred and forty American amphibian species other than bufonids. **Comp Biochem Physiol C**, **85**(1): 139-47. 1986

RUDIGER, H. e GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconj J**, **18**(8): 589-613. 2001

SAI, K. P., JAGANNADHAM, M. V., VAIRAMANI, M., RAJU, N. P., DEVI, A. S., NAGARAJ, R. e SITARAM, N. Tigerinins: novel antimicrobial peptides from the Indian frog *Rana tigerina*. **J Biol Chem**, **276**(4): 2701-7. 2001

SALMON, A. L., CROSS, L. J., IRVINE, A. E., LAPPIN, T. R., DATHE, M., KRAUSE, G., CANNING, P., THIM, L., BEYERMANN, M., ROTHEMUND, S., BIENERT, M. e SHAW, C. Peptide leucine arginine, a potent immunomodulatory peptide isolated and structurally characterized from the skin of the Northern Leopard frog, *Rana pipiens*. **J Biol Chem**, **276**(13): 10145-52. 2001

SAMPAIO, E. V. S. B., GIULIETTI, A. M., VIRGÍNIO, J. e GAMARRA-ROJAS, C. F. L. **Vegetação e Flora da Caatinga**. Associação Plantas do Nordeste, Centro Nordestino de Informação sobre Plantas Recife, 2002

SANCHEZ RIERA, A., DAUD, A., GALLO, A., GENTA, S., AYBAR, M. e SANCHEZ, S. Antibacterial activity of lactose-binding lectins from *Bufo arenarum* skin. **Biocell**, **27**(1): 37-46. 2003

SCHREIBER, S. L. e CRABTREE, G. R. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. **Immunol Today**, **13**(4): 136-42. 1992

SEBBEN, A., SCHWARTZ, C. A. A defesa química dos anfíbios. **Revista Ciencia Hoje**, **15**(87): 23-53. 1993

SIMÕES, C. M. O. E. A. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. UFRGS/UFSC Porto Alegre, 2003

SIMON, L. S. The treatment of rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, **18**(4): 507-38. 2004

SMA. **Coleção entendendo o meio ambiente**. Secretaria do Estado do Meio Ambiente do Estado de São Paulo São Paulo, 1997

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discov Today**, **5**(2): 39-41. 2000

SUFFREDINI, I. B., SADER, H. S., GONCALVES, A. G., REIS, A. O., GALES, A. C., VARELLA, A. D. e YOUNES, R. N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Braz J Med Biol Res**, **37**(3): 379-84. 2004

TERRENI, A., NOSI, D., GREVEN, H. e DELFINO, G. Development of serous cutaneous glands in *Scinax nasica* (Anura, Hylidae): patterns of poison biosynthesis and maturation in comparison with larval glands in specimens of other families. **Tissue Cell**, **35**(4): 274-87. 2003

THEOFILOPOULOS, A. N. The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. **Immunol Today**, **16**(2): 90-8. 1995

TSUKAGOSHI, S. [Antitumor candidate compounds under clinical trials in Japan]. **Gan To Kagaku Ryoho**, **17**(3 Pt 1): 342-51. 1990

WOEHL, G. J. W., E. N. Pererecas protetoras da mata atlântica sob ameaça. **Ciencia Hoje**, **28**(164): 72-74. 2000

YU, D. Q. [Prospect in the study of creating new drugs from Chinese herbal medicine]. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**, **24**(4): 335-8. 2002

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

Endereços eletrônicos

Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.mma.gov.br>. Acesso em: 15 nov. 2004

Instituto do Milênio do Semi-Árido. Disponível em: <http://www.imsear.org.br>. Acesso em: 08 nov. 2004

World Resources Institute. Disponível em: <http://www.wri.org>. Acesso em 12 dez. 2004

O Semi-Árido brasileiro: Disponível em: <http://www.asabrazil.org.br/semiarido.htm>. Acesso em 14 abr. 2005

Eco Agência: Disponível em: <http://www.agirazul.com.br/fsm4/fsm/00000135.htm>. Acesso em 14 abr. 2005