DENIZAR MISSAWA CAMURÇA

ESTUDO SOBRE ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA, PRÓ-INFLAMATÓRIA, ANTIBACTERIANA E DO PERFIL ELETROFORÉTICO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE *Phyllomedusa bicolor* (Boddaert, 1772) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae).

Guarulhos
2006

DENIZAR MISSAWA CAMURÇA

ESTUDO SOBRE ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA, PRÓ-INFLAMATÓRIA, ANTIBACTERIANA E DO PERFIL ELETROFORÉTICO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE *Phyllomedusa bicolor* (Boddaert, 1772) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae).

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Guarulhos como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Marta Ferreira Bastos
Co-orientador: Prof. Carlos Leandro Firmo

Guarulhos
2006

Camurça, Denizar Missawa

Estudo sobre atividade edematogênica, pró-inflamatória, antibacteriana e perfil eletroforético da secreção cutânea de *Phyllomedusa bicolor* (Boddaert, 1772) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae) / Denizar Missawa Camurça – Guarulhos, 2006

xi, 67 p.

Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Guarulhos – Curso de Ciências Biológicas

Study about edematogenic, pro-inflamatory, antibacterial activity and eletrophoretic profile of cutaneous secretion of *Phyllomedusa bicolor* (Boddaert, 1772) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae)

1. *Phyllomedusa bicolor*; 2. Eletroforese; 3. Inflamação; 4. Antibacteriana; 5. Kaxinawá.

Ao povo Huni Kuin
à Karina Pachler Cardoso (*in memorian*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço José Osair Salles (Siã Huni Kuin), líder da Tribo Indígena Kaxinawá do Rio Jordão, quem nos cedeu a autorização e o material necessário para efetuar as pesquisas com o “kampô” (*Phyllomedusa bicolor*), compartilhando um conhecimento milenar da medicina tradicional Kaxinawá. Agradeço também seu filho Leopardo Sales (Yawa Bane Huni Kuin), representante da ASKARJ (Associação Kaxinawá do Rio Jordão), que nos cedeu diversos depoimentos sobre a coleta e a utilização tradicional do kampô.

Agradeço os orientadores deste trabalho Dra. Marta Ferreira Bastos e o Prof. Carlos Leandro Firmo pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência e pela amizade durante a execução do trabalho. Agradeço também o Prof. Silas Lobo pelas autorizações dos laboratórios, pela agilidade nos materiais e pelas idéias sugeridas.

Agradeço os pesquisadores Edilene Cofacci de Lima (UFPR), Beatriz Caiuby Labate (UNICAMP), Maura Vianna Prates (EMBRAPA), Rafael Guimarães dos Santos (UnB) pelas orientações, auxílios e materiais cedidos durante a pesquisa.

Agradecemos à equipe de professores do Laboratório de Biociências: Walcir José Fieri, Maria Ester Chaves, Denise Barcelos Yamakawa, Catarina Yamashita, Rui Bernardes pela assistência e motivação durante o trabalho.

Agradeço a equipe de professores do Laboratório de Geociências: Dra. Maria Judite Garcia, Dra. Mary Elizabeth Cerruti Bernardes de Oliveira, pelos equipamentos de fotomicrografia cedidos durante a pesquisa e um agradecimento especial ao biólogo Fábio Casado pelo auxílio e apoio durante todas as etapas do experimento.

Agradeço as professoras do Laboratório de Química: Antônia Cardoso da Silva, Elisete Cavalcante de Cerqueira Barros pelas metodologias, protocolos e materiais cedidos durante os estudos e pela gentileza e atenção prestada nas dependências do laboratório.

Agradeço o Prof. Dr. Franco Ferraro Calderaro, do Hospital Veterinário da UnG, pelas análises histopatológicas.

Agradeço Maurício Tenório dos Santos Junior pela doação dos animais utilizados no experimento e pela ajuda na realização da parte prática do trabalho principalmente nas madrugadas.

Agradeço a equipe de técnicos do Laboratório de Biociências: Thais Rodrigues Narcizo, Cristiano de Loura Santana, Samara Vezzaro, Valéria Vitei e um agradecimento especial para Tatiana da Silva Gomes, Lucas Mantovanelli, Rudney A. Santos e Paulo César Simões Silva, sem eles seria praticamente impossível a realização da parte prática do nosso experimento.

Agradeço Rosana Lucas Sérpico, pela ajuda nas pesquisas, apoio e sugestões, a Terezinha Missawa Camurça pela revisão e a Iládio Davanse pela tradução.

Agradeço Elpídio Ferreira da Silva, grande companheiro em trabalhos no Acre, Amazonas e São Paulo e os companheiros de jornada: Gabriela Piccolo, Gabriel Akira Kuroiwa, Thiago José Iche Carvalho e a todos que de alguma forma contribuíram com a realização do trabalho.

RESUMO

Phyllomedusa bicolor (Boddaert, 1772) é um anfíbio da região Amazônica que produz uma secreção cutânea rica em peptídeos bioativos que é utilizada por povos indígenas em rituais de caça, como revigorante e na medicina tradicional. Neste trabalho, foram realizadas análises do perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas constituintes da secreção da *Phyllomedusa bicolor* coletada em 2004 e 2006 e da atividade antibacteriana das amostras da secreção. Foram feitas análises *in vivo* para avaliar o efeito local da inoculação como: formação de edema e presença de infiltrado inflamatório; e alterações sistêmicas como: contagem total e diferencial de leucócitos sangüíneos. Doses de: 0,25; 0,5; 1 e 2 mg/mL foram utilizadas para avaliar a formação de edema no modelo do coxim plantar em camundongos nos períodos de 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 e 48 horas. Para análise histopatológica do infiltrado inflamatório, as patas foram cortadas, fixadas, seccionadas e coradas com HE. Amostras de sangue foram submetidas à contagem de leucócitos totais e diferenciais. A atividade antibacteriana foi analisada para as doses de 2,3 mg e 1,2 mg/mL da secreção antiga e 4,9; 2,4; 1,2; 0,6 e 0,3 mg/mL da secreção recente sobre *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. A atividade edematogênica foi observada para todas as doses testadas, sendo que a de 2 mg causou o maior aumento na espessura da pata (71%) e diferenças significativas foram determinadas para os períodos entre 1 e 6 horas ($p<0,05$). Um aumento significativo no número de leucócitos totais foi observado para os períodos de 30 e 60 minutos ($p<0,05$), retornando aos níveis normais após 2 horas. Aumentos signifcativos na contagem diferencial puderam ser observados para os períodos de 15 e 30 minutos ($p<0,05$) tanto para linfócitos como para polimorfonucleares. Os perfis eletroforéticos das secreções coletadas em períodos diferentes indicam uma possível degradação das proteínas constituintes ao decorrer do tempo. A secreção provoca uma reação inflamatória aguda no local da aplicação com presença de infliltrado inflamatório polimorfonuclear e a presença de mastócitos e eosinófilos em pouca quantidade que caracteriza uma discreta reação de hipersensibilidade. A atividade antibacteriana da secreção foi constatada, entretanto não superou a atividade dos antibióticos utilizados no experimento.

ABSTRACT

Phyllomedusa bicolor (Boddaert, 1772) is an amphibian of the Amazon rainforest that produces a cutaneous secretion with several bioactive peptides that are used by indigenous peoples in hunting rituals, as stimulant and in the traditional medicine. In this study, we realized analyses of the Electrophoretic profile (SDS-PAGE) of proteins collected from the secretion of *Phyllomedusa bicolor*, during 2004 and 2006, and its antibacterial activity. *In vivo* analyses were conducted in order to evaluate the effect of local inoculation such as edema formation and presence of inflammatory infiltrate; and also the systemic changes such as total and differential blood leukocyte count. Doses of 0,25; 0,5; 1 e 2 mg/mL were applied to evaluate the edema formation on the foot pad model in mice during the periods of 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 and 48 hours. For histological analysis of the inflammatory infiltrate, paws were cut off, fixed, sectioned and stained by HE. Blood samples were submitted to total and differential leukocytes count. The antibacterial activity was analyzed in doses of 2,3 mg and 1,2 mg/mL for former secretion, and 4,9; 2,4; 1,2; 0,6 and 0,3 mg/mL for recent secretion of *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. The edematogenic activity was observed on all doses applied, in which 0,1 mg caused larger paws thickness increase (71%) and meaningful differences were determined on periods between 1 and 6 hours ($p<0,05$). A meaningful increase of the leukocytes total number was observed during periods of 30 and 60 min ($p<0,05$), returning to normal levels after 2 hours. In differential count, a significant increase was observed on periods of 15 and 30 minutes ($p<0,05$) both for lymphocytes and for polymorphonuclears. The Electrophoretic profiles of secretions samples collected in different times indicate a possible degradation of proteins in two years. The secretion promote an acute inflammatory action in inoculation area with presence of polymorphonuclear inflammatory infiltrate and the presence of mast cells and eosinophils in little amount, characterizing a discrete hypersensitivity reaction. The antibacterial activity of secretion was evidenced, however, did not surpass the activity of antibiotics used in the experiment.

SUMÁRIO

• Agradecimentos..... iii

• Resumo..... iv

• Abstract..... v

• Lista de Figuras..... viii

• Lista de Tabelas..... x

1. Introdução..... 01

2. Objetivos..... 02

3. Revisão bibliográfica..... 03

3.1 Aspectos biológicos..... 03

3.1.1. A nova posição filogenética e taxonômica da família hylidae..... 04

3.1.2. Espécies de *Phyllomedusa* ocorrentes no Brasil..... 07

3. 1.3. Morfologia..... 08

3. 1.4. Glândulas secretoras de *P. bicolor*..... 10

3. 1.5. Hábitos..... 12

3.2. O uso tradicional da secreção..... 14

3.2.1. Aspectos relacionados à cultura indígena..... 14

3.2.2. Método de coleta da secreção..... 15

3.2.3. Método de aplicação da secreção..... 17

3.2.4. Os sintomas da intoxicação..... 18

3.3. Aspectos farmacológicos..... 19

3.3.1. Histórico farmacológico..... 19

3.3.2. Estudos com a secreção *in natura*..... 22

3.3.2.1. Aspectos periféricos da intoxicação..... 24

3.3.2.2. Aspectos centrais da intoxicação..... 25

4. Material e métodos..... 26

4.1. Animais..... 26

4.2. Preparo da secreção cutânea de *P. bicolor*..... 26

4.3. Dosagem de proteínas..... 27

4.4. Análise do perfil eletroforético das proteínas presentes na secreção de *P. bicolor* por SDS-PAGE..... 28

4.5. Avaliação da atividade edematogênica da secreção de *P. bicolor*..... 28

4.6. Avaliação da alteração no número de leucócitos totais..... 29

4.7. Avaliação no número de leucócitos por esfregaço sanguíneo..... 29

4.8. Análise histológica do infiltrado de células inflamatórias na região do coxim plantar induzida pela inoculação de secreção de *P. bicolor*..... 30

4.9. Análise da atividade antibacteriana..... 30

4.10. Análise estatística..... 32

5. Resultados..... 33

5.1. Preparo da secreção cutânea de *P. bicolor* e dosagem protéica..... 33

5.2. Análise do perfil eletroforético das proteínas presentes na secreção de *P. bicolor* por SDS-PAGE..... 34

5.3. Avaliação da atividade edematogênica da secreção de *P. bicolor*..... 35

5.4. Avaliação da alteração no número de leucócitos totais e diferenciais... 39

5.5. Análise histológica do infiltrado de células inflamatórias na região do coxim plantar induzida pela inoculação de secreção de *P. bicolor*..... 40

5.6. Análise da atividade antibacteriana..... 50

6. Discussão..... 52

7. Conclusão..... 58

8. Referências bibliográficas..... 59

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: (1) – O dorso e a lateral da cabeça são verdes e a parte ventral é cinza, possui uma faixa lateral marrom clara com manchas beges de fino contorno preto. (2) - As glândulas parotóideas são elevadas e arredondadas estendendo-se dorso-lateralmente. (3) - A íris é cinza com pupila verticalmente elíptica..... 09

Figura 02: Diagrama da pele de *P. bicolor* mostrando as relações topográficas entre a epiderme, xantóforos, iridóforos (A), melanóforos e das glândulas lipídica (B), mucosa (C) e granular (D). As letras no diagrama correspondem às imagens da microscopia eletrônica (100µm). (e) – Epitélio. (ct) – Tecido Conjuntivo. (xa) – Xantóforos. (ir) – Iridóforos. (ig) – Glândula lipídica. (sg) – Glândula serosa. (ec) – Célula epitelial. (me) – Célula mioepitelial…….. 11

Figura 03: (1) - Enquanto em amplexo com um macho, a fêmea seleciona um local para desova. (2) - A fêmea deposita de 100 a 150 ovos em um cone de folhas. (3) - Pela dissolução da cápsula gelatinosa e pelo próprio movimento das larvas as folhas se abrem. (4) - Os girinos caem na água, onde terminarão o desenvolvimento. (5) – Embrião dentro da cápsula gelatinosa. (6) – Girino de *Phyllomedusa bicolor* ... 13

Figura 04: (1) - Após a coleta o anfíbio é amarrado. (2) - O anfíbio é irritado e libera a secreção. (3) - A secreção é cuidadosamente retirada com uma espátula de madeira. (4) - A secreção é transferida para uma paleta de madeira. Extração feita por índios Matsés do tronco lingüístico Pano..... 16

Figura 05: (1) - A aplicação é feita queimando a epiderme com um cipó denominado titica. (2) - Retira-se a pele da queimadura. (3) - A secreção é previamente hidratada e coletada da paleta. (4) - A secreção é aplicada no ferimento. Aplicação feita por índios Matsés do tronco lingüístico Pano..... 17

Figura 06: Paletas de madeira utilizadas no experimento: A - secreção antiga, coletada em set/2004 (Rio Jordão - AC); B - secreção recente, coletada em out/2006 (Cruzeiro do Sul - AC)..... 27

Figura 07: Curva padrão de quantidade protéica obtida para a amostra de BSA . 33

Figura 08: Perfil eletroforético das amostras: A - secreção coletada em set/2004 (Rio Jordão - AC), B - secreção coletada em out/2006 (Cruzeiro do Sul - AC)..... 34

Figura 09: Aumento da espessura da pata dos camundongos inoculados com 0,25 mg/mL da secreção de *P.bicolor*. * $p<0,05$..... 35

Figura 10: Aumento da espessura da pata dos camundongos inoculados com 0,5 mg/mL da secreção de *P.bicolor*. * $p<0,05$..... 36

Figura 11: Aumento da espessura da pata dos camundongos inoculados com 1 mg/mL da secreção de *P.bicolor*. * $p<0,05$..... 36

Figura 12: Aumento da espessura da pata dos camundongos inoculados com 2 mg/mL da secreção de *P.bicolor*. * p<0,05..... 37

Figura 13: Aumento da espessura da pata dos camundongos inoculados com 2 mg/mL da secreção de *P.bicolor,* avaliadas nos períodos iniciais após a inoculaçao. * p<0,05..... 38

Figura 14: Contagem total e diferencial de leucócitos. (*) linfócitos, (#) polimorfonucleares, (•)contagem total (p<0,05)..... 39

Figura 15: (a) - Pele sem evidência de infiltrado inflamatório significante. Aumento 200X..... 42

Figura 16: (a) - Edema moderado da derme. (b) - Adesão de leucócitos. (c) - Espaçamento das fibras colágenas indicando edema. (a) - Aumento 200X. (b) - Aumento 1000X. (c) - Aumento 400X..... 43

Figura 17: (a) e (d) - Infiltrado inflamatório em derme. (b) - Predominâmcia de células polimorfonucleares (neutrófilos). (c) - Marginação leucocitária. (a) - Aumento 200X. (b) e (c) - Aumento 1000X . (d) - Aumento 400X. 44

Figura 18: (a) - Infiltrado inflamatório multifocal mais acentuado em derme e aprofundando-se para a hipoderme. (b) e (e) - Focos de hemorragia. (c) - Marginação leucocitária. (d) - Infiltrado predominantemente polimorfonuclear. (a) e (b) - Aumento 200X. (c), (d) e (e) - Aumento 1000X..... 45

Figura 19: (a) - Infiltrado inflamatório na derme e hipoderme. (b) - Infiltrado inflamatório em camadas musculares. (a) e (b) - Aumento 200X..... 46

Figura 20: (a) - Infiltrado inflamatório em derme. (b) - Infiltrado inflamatório em tecido muscular. (a) e (b) - Aumento 200X..... 47

Figura 21: (a) e (e) - Focos de hemorragia. (b) - Infiltrado inflamatório na derme e hipoderme. (c) - Fibras colágenas desorientadas indicando edema. (d) - Fibroblastos jovens. (a) e (b) - Aumento 200X. (c) e (d) - Aumento 1000X. (e) - Aumento 400X..... 48

Figura 22: (a) - Infiltrado inflamatório moderado.(a) - Aumento 200X..... 49

Figura 23: Atividade antibacteriana das secreções: *E. coli* (1 e 2) e *S. Aureus* (3 e 4). Discos antibiograma gram-negativo (1) e gram-positivo (3). Dosagens: secreção antiga - 2,3 mg/mL (A); secreção antiga - 1,2 mg/mL (B); secreção recente - 4,9 mg/mL (C); secreção recente - 2,4 mg/mL (D); secreção recente - 1,2 mg/mL (E); secreção recente - 0,6 mg/mL (F); secreção recente - 0,3 mg/mL (G) 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Quantificação de peptídeos encontrados em duas amostras da secreção coletadas por DALY (1992) e ESRPAMER (1993)..... 23

Tabela 02: Antibióticos e dosagens utilizadas no disco Sensifar (Cefar) para bactérias gram positivas e gram negativas..... 31

Tabela 03: Análise da atividade antibacteriana das duas amostras de secreção. Volume utilizado nas doses: 0,01 mL em discos de papel filtro com 9 mm de diâmetro..... 51

Tabela 04: Dermaseptinas presentes em diversas espécies de *Phyllomedusa sp.* e a atividade inibitória de bactérias, protozoários, fungos e leveduras..... 56

TABELA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Código (uma letra)	Código (três letras)
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido Aspártico	D	Asp
Ácido Glutâmico	E	Glp
Cisteína	C	Cys
Fenilalanina	F	Phe
Glicina	G	Gly
Glutamina	Q	Gln
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Tirosina	Y	Tyr
Treonina	T	Thr
Triptofano	W	Trp
Valina	V	Val

1. INTRODUÇÃO

Phyllomedusa bicolor (Boddaert, 1772) é a maior espécie de anfíbio pertencente à Subfamília Phyllomedusinae que pode ser encontrada na região da floresta amazônica. Essa Subfamília se diferencia de todos os outros hilídeos neotropicais por depositar seus ovos em uma massa gelatinosa sobre folhas ou em folhas enroladas acima da água e também nos polipeptídeos produzidos na pele (CARAMASCHI, 2002).

A secreção cutânea da *P. bicolor* é comumente utilizada pelas populações indígenas do tronco lingüístico Pano (Katukina, Kaxinawá Yawanawá, entre outras) na medicina tradicional e em rituais de caça (LIMA, 2005).

A secreção vem despertando o interesse científico desde a década de 70, estudos realizados por pesquisadores italianos e israelenses obtiveram a patente de diversos peptídeos sintetizados a partir do cDNA (DNA complementar) extraído da pele do anfíbio. Dentre estes peptídeos, pode ser ressaltada: a [Lys^7]dermorfina substância com atividade analgésica 40 vezes mais potente que a morfina (NEGRI *et al.* 1992). Foi observado também que a secreção *in natura* apresenta: um alto potencial vasodilatador; influência na atividade pancreática e na motilidade intestinal; um aumento dos níveis de corticosterona, glicose e catecolaminas; aumento da resistência física e diminuição da fome (ERSPAMER, 1993).

Nos últimos anos a secreção vem sendo utilizada nas grandes metrópoles pelos terapeutas holísticos como um remédio capaz de curar “todos os males” (LIMA & LABATE, 2006). O receio de um uso descontrolado da utilização da secreção cutânea da *P. bicolor* fez com que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibisse, a partir de abril de 2004, qualquer tipo de propaganda sobre os benefícios medicinais da secreção. Nesse mesmo ano, o Ministério do Meio Ambiente (MMA) instituiu o “Projeto kampo”, um projeto multidisciplinar que tem como objetivo realizar pesquisas em diversas áreas do conhecimento, tais como: antrolopogia, biologia molecular, herpetologia e medicina, visando o desenvolvimento de novos fármacos e ainda garantindo a preservação da biodiversidade, da cultura e do patrimônio indígena (MARTINS, 2006).

2. OBJETIVOS

- Realizar a dosagem protéica das amostras da secreção desidratada da *Phyllomedusa bicolor*;
- Avaliar o perfil eletroforético das proteínas constituintes das secreções em SDS-PAGE;
- Avaliar a possível atividade edematogênica da secreção no modelo do coxim plantar de camundongos;
- Avaliar a presença de infiltrado de células inflamatórias na região do coxim plantar por cortes histológicos;
- Avaliar as alterações no número de leucócitos totais induzidas pela secreção;
- Avaliar o efeito antibacteriano das secreções em diferentes concentrações.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos biológicos

Os anfíbios foram os primeiros vertebrados que iniciaram a colonização do ambiente terrestre no devoniano médio a 350 milhões de anos, desenvolvendo uma variedade de tipos morfológicos e ecológicos que totalizam mais de 3.900 espécies conhecidas atualmente, divididas em três ordens: a ordem Anura (sapos e rãs), a ordem Caudata ou Urodela (salamandras) e a ordem Gymnophiona ou Apoda (cobras-cegas) (DUELLMAN & TRUEB, 1986).

Os anfíbios são cosmopolitas e encontrados em todos os continentes com exceção da Antártida e se adaptam a uma variedade de nichos ecológicos e condições climáticas; entretanto, muitos têm preferência por ambientes úmidos (CLARKE, 1997).

A pele dos anfíbios é um órgão complexo tanto do ponto de vista morfológico como do fisiológico, compreendendo uma gama de funções. Possui uma alta permeabilidade à água e é responsável pela troca gasosa, excreção, controle da temperatura, reprodução e defesa contra predadores e microorganismos (CLARKE, 1997).

A infecção por microrganismos é a causa principal de doenças em anfíbios. Entre as bactérias, o gênero *Pseudomonas* pode causar vários tipos de infecções, entre elas a septicemia. Os principais fungos parasitas de anfíbios são: *Basidiobolus, Cladosporium, Hormicium e Phialophora*. Alguns protozoários também podem infestar o trato digestivo e o sangue, entre eles os gêneros *Pleistophora, Opalina, Entamoeba, Trypanossoma e Plasmodium* (DUELLMAN & TRUEB, 1986).

Os ambientes úmidos habitados pelos anfíbios como rios de baixa correnteza, lagos, represas, madeira em decomposição, buracos no solo e camadas de folhiço possuem uma grande quantidade de microrganismos patógenos. Decorrente disso, um sistema de defesa contra microorganismos, operando na superfície da pele é condição evidente para a sobrevivência dos anfíbios (CLARKE, 1997).

As glândulas granulares encontradas na pele dos anfíbios secretam diversas substâncias bioativas divididas em: aminas biogênicas; bufogeninas e bufotoxinas; alcalóides; proteínas e peptídeos que são responsáveis pela defesa química promovida contra microorganismos e predadores (CLARKE, 1997).

3.1.1. A nova posição filogenética e taxonômica da família Hylidae

A Família Hylidae é constituída por, aproximadamente, 870 espécies, agrupadas em quatro subfamílias e com distribuição nas Américas, Austrália (Papua-Nova Guiné), Europa e Ásia. Apesar de alguns grupos de Hylidae terem sido estudados separadamente, uma hipótese filogenética compreensiva para a família nunca foi proposta. Faivovich *et al.* (2005) propuseram a revisão do atual estado sistemático da Família Hylidae, com especial atenção à subfamília Hylinae (590 espécies), para a qual foi avaliado o monofiletismo dos taxa, atualmente, reconhecidos e examinamos as bases do arranjo taxonômico aceito no presente.

O mesmo autor em sua pesquisa teve como objetivo a realização de uma análise filogenética, usando caracteres obtidos, em sua maioria, a partir de seqüências de DNA, a fim de (1) testar o monofiletismo da família Hylidae; (2) determinar sua constituição taxonômica, dando ênfase aos gêneros e grupos de espécies incluídos na subfamília Hylinae; e (3) propor uma nova taxonomia baseada em grupos monofiléticos e consistentes com a hipótese filogenética apresentada no presente trabalho. Esse trabalho apresenta uma revisão sistemática dos Hylidae, uma análise filogenética baseada em 275 taxa terminais, sendo 227 de Hylidae, mais 48 taxa, representando grupos externos. Na análise filogenética estão representados 40 dos 41 gêneros de Hylidae das quatro subfamílias reconhecidas e 39 dos 41 grupos, atualmente, reconhecidos para o grande gênero *Hyla* (Faivovich *et al.* 2005).

Os táxons incluídos permitem testar a monofilia de 24 dos gêneros não monotípicos e 25 grupos de espécies de *Hyla*. A análise filogenética inclui aproximadamente 5.100 pares de bases de quatro genes mitocondriais (12S, tval, 16S, citocromo *b*) e cinco genes nucleares (rodopsina, tirosinase, RAG-1, seventh in absentia e 28s), além de um pequeno conjunto de dados sobre a musculatura do pé (Faivovich *et al.* 2005).

De forma similar ao que tem sido observada em outros estudos, a presente análise indica que os Hemiphractinae não são relacionados às outras três subfamílias de Hylidae, portanto, sendo removidos desta família e, tentativamente, considerados como uma subfamília das subfamílias parafiléticas Leptodactylidae. Hylidae e agora restrita a Hylinae, Pelodryadinae e Phyllomedusinae. Esses resultados corroboram uma relação de grupos irmãos entre essas duas últimas subfamílias, que juntas correspondem ao táxon irmão de Hylinae: *Phyllomedusa*,

Agalychnis, *Litoria*, *Hyla*, *Osteocephalus*, *Phrynohyas*, *Pseudis*, *Ptychohyla*, *Scinax*, *Smilisca* e *Trachycephalus e* não são monofiléticos. Dentro do gênero *Hyla*, os grupos de *H. albomarginata*, *H. albopunctata*, *H. arborea*, *H. boans*, *H. cinerea*, *H. eximia*, *H. geographica*, *H. granosa*, *H. microcephala*, *H. miotympanum*, *H. tuberculosa* e *H. versicolor* não são monofiléticos (Faivovich *et al.* 2005).

Nessa análise, Hylinae aparece composta por quatro grandes clados. O primeiro deles, incluindo todas as rãs-gladiadoras, as espécies andinas de *Hyla* que se reproduzem em riachos e um clado dos *Tepuis*. O segundo grande clado e´ composto por *Scinax*, *Sphaenorhynchus*, ‘‘pseudohilideos’’, *Scarthyla* e as espécies de *Hyla* com 30 cromossomos. O terceiro, é composto por *Phyllodytes*, *Phrynohyas*, *Nyctimantis* e todas as seguintes pererecas-de-capacete da América do Sul e Índias Ocidentais: *Argenteohyla*, *Aparasphenodon*, *Corythomantis*, *Osteocephalus*, *Osteopilus*, *Tepuihyla* e *Trachycephalus*. O quarto e último grande clado é composto pela maioria dos grupos de espécies de *Hyla* centro-americanos/holárticos e pelos gêneros *Acris*, *Anotheca*, *Duellmanohyla*, *Plectrohyla*, *Pseudacris*, *Ptychohyla*, *Pternohyla*, *Smilisca* e *Triprion*. É apresentada uma nova taxonomia monofilética, espelhando estes resultados, onde Hylinae é dividida em quatro tribos (Faivovich *et al.* 2005).

Das espécies, correntemente, incluídas em *Hyla*, 297 de 353 são alocadas em 15 gêneros, dos quais quatros são correntemente reconhecidos, quatros são nomes revalidados e seis são novas descrições. O gênero *Hyla* fica restrito aos grupos de *H. arborea*, *H. cinerea*, *H. eximia*, *H. femoralis* e *H. versicolor*, sendo o conteúdo de alguns desses grupos redefinido. *Phrynohyas* e sinonimizada a *Trachycephalus*, *Pternohyla* e sinonimizada a *Smilisca* e *Duellmanohyla* e sinonimizada a *Ptychohyla*. O gênero *Dendropsophus é* revalidado para as espécies de *Hyla* com, ou, presumivelmente, tendo, 30 cromossomos. *Exerodonta é* revalidado, passando a incluir os grupos de *Hyla sumichrasti* e *H. pinorum*. *Hyloscirtus é* revalidado para acomodar os grupos de *Hyla armata*, *H. bogotensis* e *H. larinopygion*. *Hypsiboas é* revalidada para acomodar diversos grupos de espécies (muitos deles aqui redefinidos) de rãs-gladiadoras. Os complexos de *Hyla albofrenata e H. albosignata*, do grupo de *H. albomarginata* são incluídos no gênero *Aplastodiscus*. Nomes genéricos novos são apresentados para (1) *Agalychnis calcarifer* e *A. craspedopus*, (2) *Osteocephalus langsdorffii* e para os grupos de espécies de (3) *Hyla aromatica*, (4) *H. bromeliacia*, (5) *H. godmani*,

(6) *H. mixomaculata*, (7) *H. taeniopus*, (8) *H. tuberculosa*, e para o clado composto pelos grupos de espécies de (9) *H. pictipes* e *H. pseudopuma* e para o clado composto pelos grupos de espécies de (10) *H. circumdata*, *H. claresignata*, *H. Martins* e *H. pseudopseudis* (FAIVOVICH *et al.* 2005).

Classificação do Gênero *Phyllomedusa* segundo FAIVOVICH *et al.* 2005

Família: HYLIDAE

Subfamília: PHYLLOMEDUSINAE GÜNTHER, 1858

Gênero: PHYLLOMEDUSA WAGLER, 1830

Espécie tipo: *Rana bicolor* BODDAERT, 1772 por monotipia.

Elenco: vinte e seis espécies, com quatro grupos de espécies:

- *P.* grupo *brumeisteri* (com quatro espécies), *P.* grupo *hypochondrialis* (com seis espécies), *P.* grupo *perinesos* (com quatro espécies) e *P. tarsius* (com quatro espécies).
- *P. atelopoides* DUELLMAN, CADLE & CANNATELLA, 1988
- *P. bicolor* (BODDAERT, 1772)
- *P. coelestis* (COPE, 1874)
- *P. Palliata* PETERS, “1872” [1873]
- *P. tomopterna* (COPE. 1868)
- *P. trinitatis* MERTENS, 1926
- *P. vaillantii* BOULENGER, 1882
- *P. venusta* DUELLMAN, 1966

3.1.2. Espécies de *Phyllomedusa* ocorrentes no Brasil (Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2006):

- *Phyllomedusa atelopoides* DUELLMAN, CADLE, & CANNATELLA, 1988
- *Phyllomedusa ayeaye* (B. LUTZ, 1966)
- *Phyllomedusa bicolor* BODDAERT, 1772
- *Phyllomedusa boliviana* BOULENGER, 1902
- *Phyllomedusa burmeisteri* BOULENGER, 1882
- *Phyllomedusa camba* DE LA RIVA, 2000 "1999"
- *Phyllomedusa centralis* BOKERMANN, 1965
- *Phyllomedusa distincta* A. LUTZ in B. LUTZ, 1950
- *Phyllomedusa hypochondrialis* (DAUDIN, 1800)
- *Phyllomedusa iheringii* BOULENGER, 1885
- *Phyllomedusa megacephala* (MIRANDA-RIBEIRO, 1926).
- *Phyllomedusa oreades* BRANDÃO, 2002
- *Phyllomedusa palliata* PETERS, 1873 "1872"
- *Phyllomedusa rohdei* MERTENS, 1926
- *Phyllomedusa sauvagei* BOULENGER, 1882
- *Phyllomedusa tarsius* (COPE, 1868)
- *Phyllomedusa tetraploidea* POMBAL & HADDAD, 1992
- *Phyllomedusa tomopterna* (COPE, 1868)
- *Phyllomedusa vaillantii* BOULENGER, 1882

3.1.3. Morfologia

Os membros da grande e diversificada Família Hylidae Rafinesque, 1815 (Amphibia; Anura) possuem cintura peitoral do tipo arcífero, com um esterno desenvolvido, oito vértebras pré-sacrais procélicas, diapófises sacrais pouco dilatadas, articulação da vértebra sacral com o uróstilo bicondilar, pré-maxilares e maxilares providos de odontóides, uma cartilagem intercalar entre a última e a penúltima falange dos dígitos e amplexo axilar (CARAMASCHI, 2002).

A Subfamília Phyllomedusinae (Günther, 1858) apresenta ossificação do crânio variável, geralmente, sem fusões ósseas extensivas: pele da cabeça não ossificada ao crânio, pupila vertical, músculos inter-hióideo se estendem, posteriormente, além do final da mandíbula, músculo intermandibular com ramos laterais acessórios, desova, geralmente, fora da água sobre a vegetação ou em folhas enroladas, girinos aquáticos, com espiráculo ventral, apenas levemente sinistro, pés agarradores ou tendência a essa capacidade, cartilagens intercalares, tamanho dos discos e extensão das membranas interdigitais, progressivamente, reduzidas, torsão do pé, com oposição dos dedos, gradualmente, desenvolvida (CARAMASCHI, 2002).

Essa subfamília constitui uma das linhagens filogenéticas mais distintas entre os Hylidae neotropicais, principalmente, pela sua pupila vertical (horizontal em todos os outros hilídeos, exceto em *Nyctimystes*.), colorido dorsal sempre verde e, geralmente, com cores vivas nas partes ocultas por depositarem seus ovos em uma massa gelatinosa sobre folhas ou em folhas enroladas acima da água e também diferem, notavelmente, de todos os outros hilídeos neotropicais com base nos polipeptídeos da pele (CARAMASCHI, 2002).

O gênero *Phyllomedusa* Wagler, 1830 possui dedos e atrelhos com membranas reduzidas ou ausentes; discos terminais pequenos, primeiro atrelho mais curto, igual ou mais longo que o segundo, oponível ou não aos outros, pele lisa ou rugosa com ou sem osteodermes; glândulas parotóides presentes na maioria das espécies; membrana palpebral não-reticulada, íris, uniformemente, de branco-prateada a bronze com reticulações pretas; crânio moderado a alto, com altura maior que 38% do comprimento, nasais, moderadamente, pequenos, fontanela fronto-parietal presente, variando no tamanho, quadratojugais reduzidos em algumas espécies e dentes pré-vomerianos presentes ou ausentes (CARAMASCHI, 2002).

A *Phyllomedusa bicolor* (Boddaert, 1772) é a maior espécie da subfamília Phyllomedusinae, os machos podem medir de 91 a 103 mm e as fêmeas de 111 a 119 mm de comprimento rostro-anal, o dorso e a lateral da cabeça são verdes e toda a parte ventral é cinza, possui uma faixa lateral marrom clara com manchas beges de fino contorno preto, as glândulas parotóideas são elevadas e arredondadas, estendendo-se dorso-lateralmente a íris é cinza com pupila verticalmente elíptica (Figura 01).

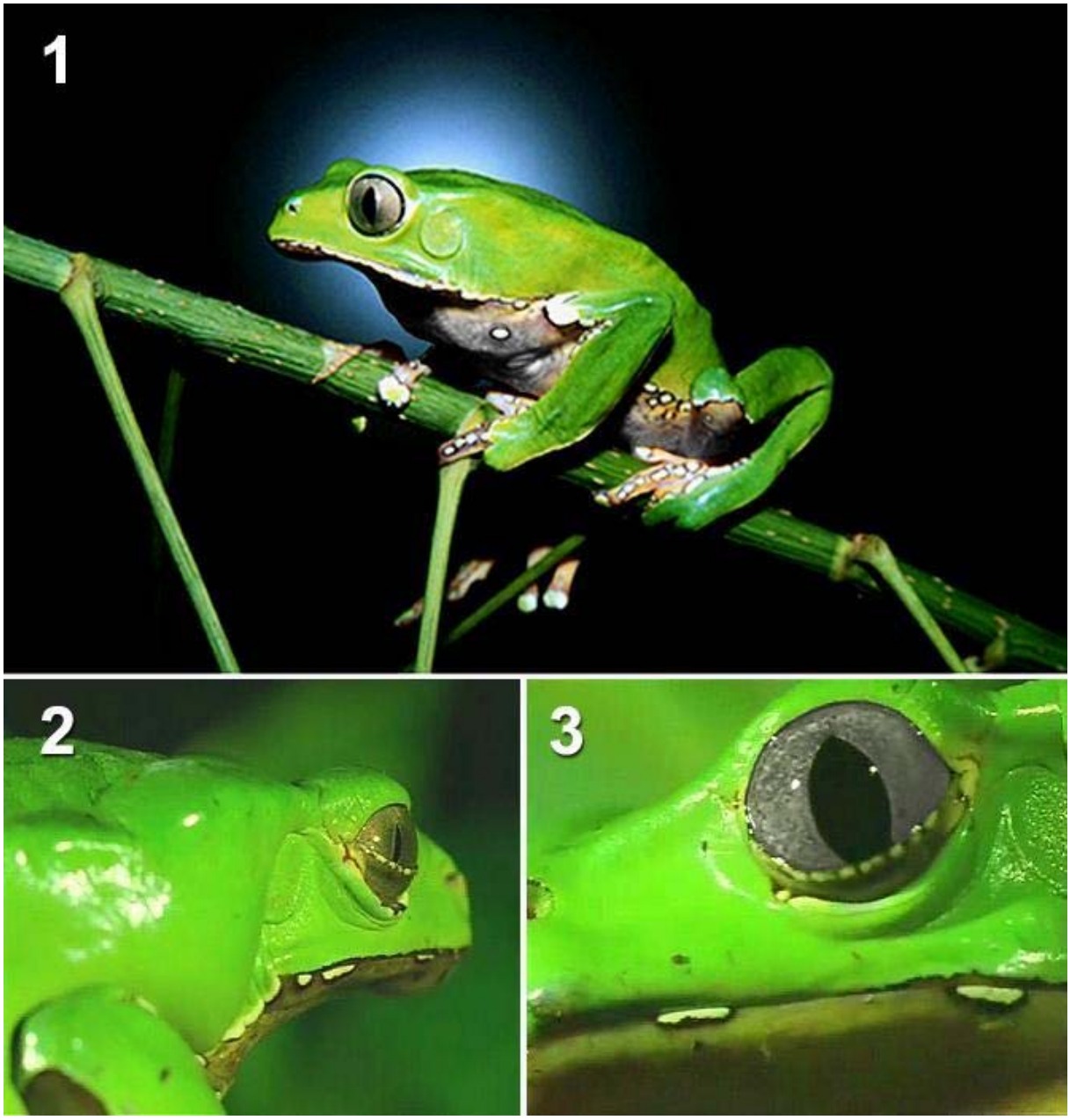

Figura 01: (1) – O dorso e a lateral da cabeça são verdes e a parte ventral é cinza, possui uma faixa lateral marrom clara com manchas beges de fino contorno preto. (2) - As glândulas parotóideas são elevadas e arredondadas estendendo-se dorso-lateralmente. (3) - A íris é cinza com pupila verticalmente elíptica (adaptado de : "Biologie de la rainette-singe *Phyllomedusa bicolor*", 1995).

3.1.4. Glândulas secretoras da *P. bicolor* segundo LACOMBE *et al.* 2000

Foram realizados estudos histológicos e imunoquímicos com fragmentos da pele da *Phyllomedusa bicolor* em diferentes estágios de desenvolvimento que evidenciaram três tipos de glândulas, que diferem no tamanho, na distribuição corporal e no tipo de secreção produzida.

A glândula lipídica (Figura 2B) mede aproximadamente 300 µm e encontra-se abaixo da epiderme e da camada de cromatóforos. Os grânulos encontrados na parte interna da glândula obteve uma reação positiva com Sudam IV, caracterizando conteúdo lipídico. Essa glândula não é encontrada na pele de girinos, sendo encontrada apenas após a metamorfose.

A glândula mucosa (Figura 2C) mede aproximadamente 150-200 µm de diâmetro, circulada por um único alvéolo e se conecta à outra camada da pele por um duto curto.

A glândula serosa ou granular (Figura 2D) mede aproximadamente 300-700 µm na pele de animais jovens (4 meses após a metamorfose) e acima de 3500 µm de diâmetro na região dorso-lateral de animais adultos (acima de 2 anos), em outras regiões do corpo medem cerca de 500 µm de diâmetro, aprofunda-se no tecido conjuntivo subcutâneo e é cercada por uma camada de células mioepiteilais. A morfologia interna da glândula serosa demonstra uma série de grânulos secretórios esféricos, que diferem de outros tipos de anfíbios. Testes de imunofluorescência revelaram a presença de peptídeos ativos, constituídos na maior parte por dermaseptinas e peptídeos contendo D-aminoácidos como a dermorfina e a deltorfina.

A distribuição das glândulas varia conforme a região do corpo do animal: a maioria das glândulas lipídicas podem ser encontradas em abundância na região dorsal e dorso-lateral, as glândulas mucosas são encontradas na região ventral do animal e as glândulas serosas podem ser encontradas por todo o corpo do animal. Entretanto, os diâmetros das glândulas granulares na região dorso-lateral são, consideravelmente, maiores do que as glândulas das outras regiões.

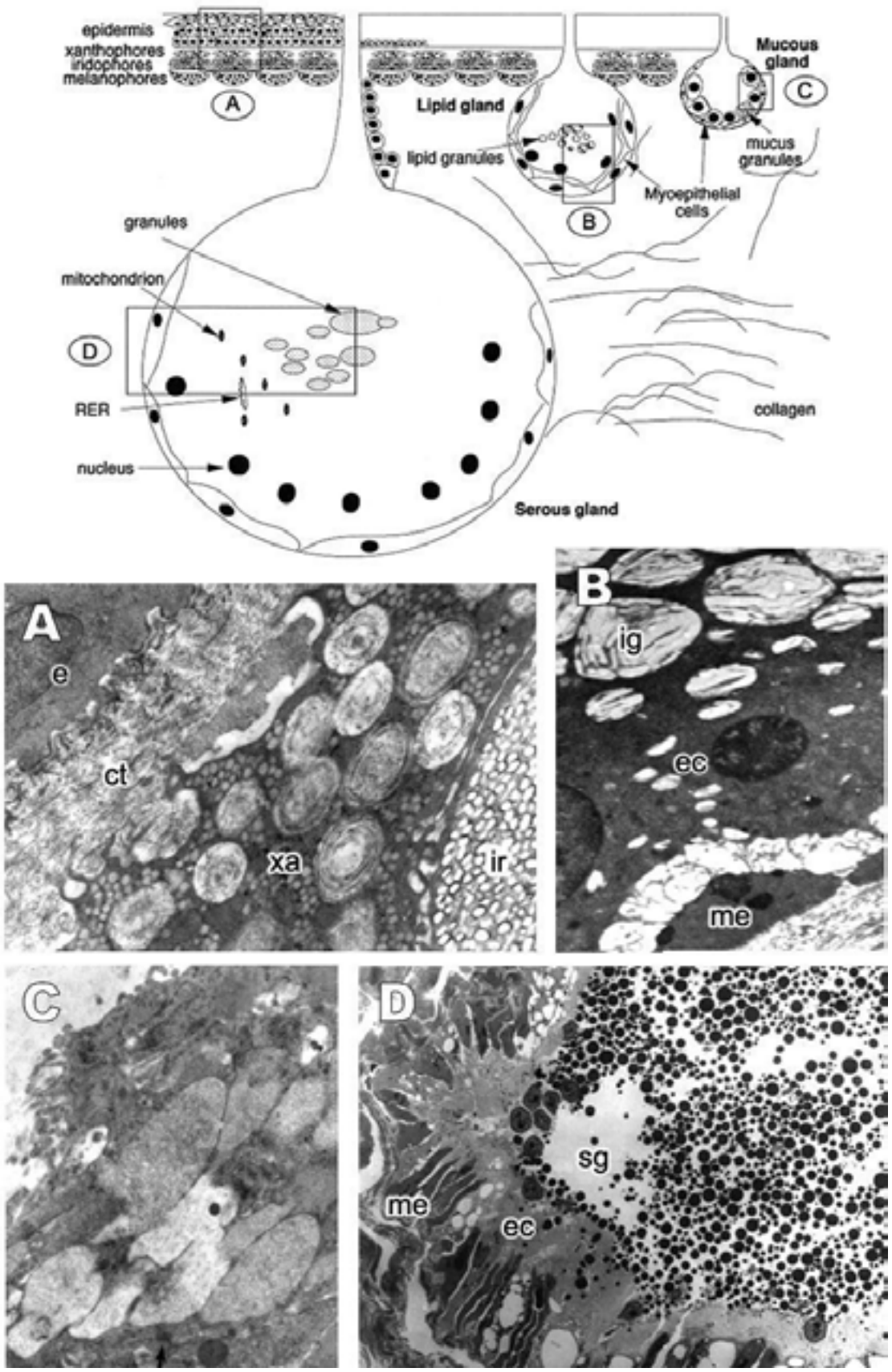

Figura 02: Diagrama da pele de *P. bicolor* mostrando as relações topográficas entre a epiderme, xantóforos, iridóforos (A), melanóforos e das glândulas: lipídica (B), mucosa (C) e granular (D). As letras no diagrama correspondem às imagens da microscopia eletrônica (100µm). (e) – Epitélio. (ct) – Tecido Conjuntivo. (xa) – Xantóforos. (ir) – Iridóforos. (ig) – Glândula lipídica. (sg) – Glândula serosa. (ec) – Célula epitelial. (me) – Célula mioepitelial (LACOMBE *et al*, 2000).

3.1.5. Hábitos

Todas as espécies de *Phyllomedusa sp.* são arborícolas e, embora tenham capacidade de saltar, em geral caminham lentamente sobre galhos e folhas em busca de alimentos ou de repouso (CARAMASCHI, 2002); Durante esses deslocamentos, as cores vivas das partes, normalmente, ocultas quando em repouso são exibidas, possivelmente atuando como um mecanismo de defesa aposemático, aparentemente associado à pele desses animais que é rica em polipeptídeos complexos, possivelmente tóxicos para seus predadores (DUELLMAN & TRUEB, 1986).

Algumas espécies de *Phyllomedusa sp*. são uricotélicas, excretando ácido úrico ao invés de uréia como mecanismo de regulação hídrica. Os anfíbios uricotélicos possuem uma alta capacidade de absorção de água pela região ventral. Um outro mecanismo de retenção de água é a secreção de uma substância lipídica através de glândulas tegumentares que evitam a perda de água através da evaporação pela pele (CARAMASCHI, 2002).

A desova de *Phyllomedusa sp.* (Figura 03) ocorre tipicamente sobre folhas e ramos pendentes sobre a água. Enquanto em amplexo com um macho, a fêmea seleciona um local para desova e deposita de 100 a 150 ovos, que são fertilizados pelo macho. A fêmea e o macho ainda em amplexo descem até a água para que a fêmea se hidrate para voltar até o local do ninho e fazer a postura de mais ovos, isso se repete várias vezes até que termine a desova. Após essa seqüência, o ninho é abandonado pelo casal e ali os girinos se desenvolverão fora da água até que os ovos eclodam. Quando acontece a eclosão, pela dissolução da cápsula gelatinosa e pelo próprio movimento das larvas, as folhas se abrem e os girinos caem na água, onde terminarão o desenvolvimento até a metamorfose. (CARAMACHI, 2002).

Figura 03: (1) - Enquanto em amplexo com um macho, a fêmea seleciona um local para desova. (2) - A fêmea deposita de 100 a 150 ovos em um cone de folhas. (3) - Pela dissolução da cápsula gelatinosa e pelo próprio movimento das larvas as folhas se abrem. (4) - Os girinos caem na água, onde terminarão o desenvolvimento. (5) – Embrião dentro da cápsula gelatinosa. (6) – Girino de *Phyllomedusa bicolor* (adaptado de: "Biologie de la rainette-singe *Phyllomedusa bicolo*r", 1995).

3.2. O uso tradicional da secreção

3.2.1. Aspectos relacionados à cultura indígena

Algumas tribos indígenas do Acre e Amazonas utilizam, tradicionalmente, a secreção para fins medicinais, como revigorante e, principalmente, para ajudar nas atividades de caça. Existem diversas denominações e grafias para as espécies *Phyllomedusa sp*., e também para a secreção propriamente dita, sendo "kampô", "kampu", "kapun" as formas mais comuns entre as etnias da família lingüística Pano (Katukina, Kaxinawá e Yawanawá, entre outras) e a denominação "kambô" entre os seringueiros e usuários das grandes metrópoles (LIMA, 2005).

Os Ashaninkas da família lingüística Aruak conhecem a *Phyllomedusa sp.* pelo nome de "Wapapatsi", nome proveniente da vocalização do anuro e utilizam a secreção como medicamento e em rituais de caça. Fatores como a altura em que o animal foi encontrado ou a vocalização perto da residência estão, respectivamente, relacionados com o tipo de animal desejado e o sucesso na caçada (SOUZA *et al. apud* CARNEIRO DA CUNHA & BARBOSA, 2002) .

Os Kaxinawás relacionam a espécie de *Phyllomedusa sp.* com o tipo de animal que pretendem caçar e citam três variedades de "kampu": o "awá-kampu" ou "kampu de anta", cuja vocalização é ouvida nas partes baixas das matas e sua principal utilização é na caça de antas; o "issu-kampu" ou "kampu de macaco-preto", que é ouvido nas partes altas das matas e utilizada na caça de macaco-preto; o "kanã-paspã" , "txaxu-kampu" ou "kampu de veado", ouvido, principalmente, nas beiras dos igarapés, em lagos e capoeiras bem baixas e é utilizado na caça de veado (SOUZA *et al. apud* CARNEIRO DA CUNHA & BARBOSA, 2002). Na área medicinal, a utilização do "kampu" tem sido descrita no tratamento da dor, em casos de febre, amarelão e cansaço (SOUZA *et al. apud* CARNEIRO DA CUNHA & BARBOSA, 2002) .

O padre francês Constantin Tastevin, em 1925, fez a primeira descrição da utilização medicinal da secreção entre os Kaxinawás:

> "*O exército de batráquios é incontável. O mais digno de ser notado é o campon dos Kachinaua. (...) Quando um indígena fica doente, se torna magro, pálido e inchado; quando ele tem azar na caça é porque ele tem no corpo um mau princípio que é preciso expulsar. De madrugada, antes da aurora, estando ainda de jejum, o doente e o azarado produzem-se pequenas cicatrizes no braço ou no ventre com a ponta de um tição vermelho, depois se vacinam com o "leite" de sapo, como dizem. Logo são tomados de náuseas violentas e de diarréia; o mau princípio deixa o seu corpo por todas as saídas: o doente volta a ser grande e gordo e recobra as suas cores, o azarado encontra mais caça do que pode trazer de volta; nenhum animal escapa da sua vista aguda, o seu ouvido percebe os menores barulhos, e a sua arma não erra o alvo."* (TASTEVIN, 1925 *apud* LIMA, 2005)

Os Katukinas reconhecem quatro espécies de *Phyllomedusa sp.*, porém fazem utilização da espécie mais comumente encontrada o "kampo ou awa-kampo", que foi identificada como a *Phyllomedusa bicolor* (LIMA, 2005). A principal utilização medicinal do "*kampo"* é contra a preguiça (*tikish*), um comportamento abominável pelos Katukinas. Isso explica a diferença entre homens e mulheres na escolha do local de aplicação da secreção. Os homens aplicam nos braços e no tronco, pois os serviços do dia-a-dia como cortar uma árvore para abrir o roçado exige braços fortes, enquanto as mulheres aplicam na panturrilha, pois a rotina da colheita e do transporte de alimentos requer força nas pernas (LIMA, 2005).

3.2.2. Método de coleta da secreção

Segundo LIMA (2005), na tradição Katukina o anfíbio é coletado durante a madrugada próximo ao amanhecer, onde é encontrado pela sua vocalização. Os Katukinas não pegam o animal com as mãos, quebram um galho ou um ramo qualquer e ficam aguardando que o anfíbio segure nele. Esse procedimento possivelmente é feito para não ocorrer a liberação da secreção, um mecanismo de defesa das espécies de *Phyllomedusa sp.*

Após a captura, o animal é amarrado e irritado para incentivar a liberação da secreção, que é, cuidadosamente, retirada com uma pequena espátula de madeira e transferida para uma paleta, também de madeira (Figura 04), onde separam a secreção mais forte, coletada da lateral do corpo e a mais fraca, coletada nos apêndices locomotores.

Figura 04: (1) - Após a coleta o anfíbio é amarrado . (2) - O anfíbio é irritado e libera a secreção. (3) - A secreção é cuidadosamente retirada com uma espátula de madeira. (4) - A secreção é transferida para uma paleta de madeira. Extração feita por índios Matsés do tronco lingüístico Pano (adaptado de "Jungle Trip",2001).

Após a coleta da secreção, o anfíbio é desamarrado e solto na floresta. Para os Katukinas o "kampo" demora de quatro a seis meses para produzir novamente uma quantidade de secreção necessária para as aplicações (LIMA, 2005). Os Katukinas acreditam que, se matarem o "kampo", serão picados por uma serpente, pois a surucucu ("shano") *Lachesis muta* e a jararaca ("epa psi") *Bothrops sp*., segundo a lenda, retiram a secreção da *Phyllomedusa sp.* para produzirem suas peçonhas, não matando os anfíbios, apenas o colocando-os na boca para sugar a secreção (SOUZA *et al. apud* CARNEIRO DA CUNHA & BARBOSA, 2002) .

Os métodos de coleta diferem entre as tribos; os Kaxinawás pegam a *Phyllomedusa sp.* com as mãos e batem levemente em seu dorso com um palito de madeira, a fim de incentivar a liberação da secreção, que então é coletada e armazenada em paletas de madeira.

Transcrevemos a seguir um relato de Carlito Cataiano Kaxinawá sobre a coleta da *Phyllomedusa*:

"Para pegar o kampu tem que chamar: - Cunhado, vem comer mais eu nambu cozida no mingau de banana verde! No outro dia, ele canta mais em baixo, você chama de novo: - Cunhado, vem tomar mingau de veado mais eu! No terceiro dia ele canta bem baixinho, aí você vai pegá-lo às nove horas da noite, quando ele começa a cantar. Fica bem mansinho. Você bota a mão, ele mesmo pula, ele mesmo vem para as mãos da gente. Você alumia e diz: - Vem cá cunhado, eu vim te buscar !" (SOUZA *et al. apud* CARNEIRO DA CUNHA & BARBOSA, 2002).

3.2.3. Método de aplicação da secreção

A aplicação da secreção é feita queimando a epiderme com um cipó em brasa, na maioria das vezes é utilizado o cipó titica *Heteropsis flexuosa*, retirando a pele e a sujeira da queimadura, coletando a secreção da espátula de madeira, previamente, hidratada com água ou saliva, aplicando-a sob o ferimento, conforme ilustrado na Figura 05 (LIMA, 2005).

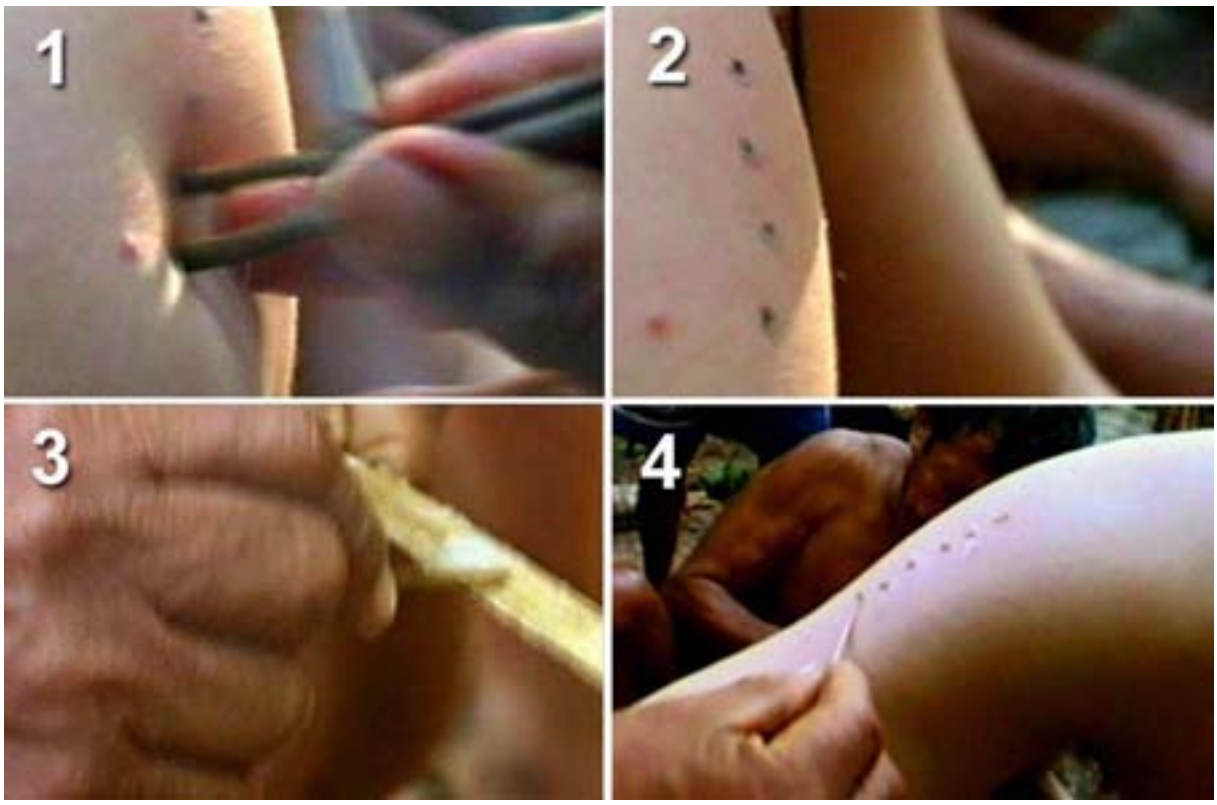

Figura 05: (1) - A aplicação é feita queimando a epiderme com um cipó denominado titica . (2) - Retira-se a pele da queimadura. (3) - A secreção é previamente hidratada e coletada da paleta. (4) - A secreção é aplicada no ferimento. Aplicação feita por índios Matsés do tronco lingüístico Pano (adaptado de "Jungle Trip", 2001).

O número de “pontos” (queimaduras na pele) pode variar muito; os Kaxinawás aplicam a secreção em menor quantidade de 2 a 10 pontos, já os Yawanawás podem aplicar de 50 a 60 pontos (LIMA & LABATE *apud* LABATE *et al*., no prelo) e os Katukinas podem exceder 100 pontos, no caso de um jovem que deseja se tornar um exímio caçador, enquanto uma mulher recebe de 2 a 5 pontos e as crianças entre o primeiro e o segundo ano de vida de 1 a 2 pontos (LIMA, 2005).

Tem sido descrita a existência de uma diferença na potência dos efeitos induzidos pela secreção fresca e armazenada, sendo que, no caso de secreções recém-coletadas, é comum diminuir o número de pontos com o objetivo de reduzir os efeitos desagradáveis. (LIMA, 2005).

Entre os Katukinas o uso da secreção é feito, principalmente, por jovens e homens mais velhos, que retiram a secreção da lateral do corpo do Hilídeo por considerarem-na mais forte e aplicam nos braços e no tronco. As mulheres e crianças fazem utilização da secreção mais fraca retirada das patas e aplicam na panturrilha. A aplicação é feita preferencialmente por um caçador hábil, sadio e inteligente, pois na tradição Katukina as qualidades do aplicador são transmitidas para os outros (LIMA, 2005).

3.2.4. Os sintomas da intoxicação

Podemos dividir a intoxicação em duas fases distintas. A primeira fase tem início, instantaneamente, após a aplicação e pode durar de 5 a 30 minutos, sendo que os sintomas mais comuns são: sensação de calor, rubor facial, taquicardia, alteração na pressão arterial, inchaço dos olhos e dos lábios, tonturas, náuseas e diarréia. Após esta fase inicial, ocorre um período de bem-estar e aumento da percepção e da disposição que permanecem por horas. A reação à secreção, o tempo de duração dos efeitos e a intensidade dos mesmos variam de acordo com o número de “pontos” e com o metabolismo de cada indivíduo.

Segundo o antropólogo Peter Gorman, podem ser observados os seguintes sintomas da intoxicação: aumento da temperatura; sudorese; taquicardia e sensação de alteração na circulação sangüínea; descontrole das funções gastrointestinais provocando vômito e diarréia; perda da consciência e sonolência. Após esta fase de aproximadamente 15 minutos, os sintomas descritos são: aumento da resistência

física; resistência contra a fome; aumento da visão noturna; aumento da percepção na observação dos animais e plantas. (GORMAN *apud* ERSPAMER *et al*., 1993).

Os violentos efeitos gastrointestinais, inchaço facial e taquicardia também são descritos por LABATE (2005), que recebeu a aplicação de um índio Kaxinawá e por NOGUEIRA (2005) que descreve que os sintomas de euforia, disposição, aumento no ânimo e bom humor que duraram 15 dias após a aplicação.

Para amenizar os efeitos desagradáveis, a aplicação é feita na maioria das vezes na parte da manhã e após o indivíduo ter ingerido uma grande quantidade de líquido (água ou caiçuma, uma bebida feita com mandioca), que rapidamente será expelido (LIMA, 2005). De acordo com a tradição de diversas etnias, o vômito, a diarréia e o suor são vistos como uma forma de expulsão do mal que afligia o enfermo, certificando a cura do mesmo. Para interromper os efeitos indesejáveis da secreção, basta banhar-se ou simplesmente lavar com água corrente o local da aplicação.

3.3. Aspectos farmacológicos

3.3.1. Histórico farmacológico

A primeira descrição das propriedades farmacológicas da secreção da *Phyllomedusa sp.* foi feita pelo Padre Constantin Tastevin em 1925, o qual descreve a utilização entre os índios Kaxinawás.

Os peptídeos produzidos pelas espécies de *Phyllomedusa sp.* vêm sendo estudados desde o final da década de 60, ANASTASI *et al*., em 1969 isolou um nonapeptídeo semelhante à ceruleína, denominado “filoceruleína”, obtido a partir de extratos da pele da *Phyllomedusa sauvagii*, uma espécie pertencente à região sul do Brasil (ANASTASI *et al*. ,1969).

Em 1970, ANASTASI & ERSPAMER descrevem a ocorrência de um decapeptídeo da família das taquicininas na pele da *Phyllomedusa bicolor*: denominada “filomedusina”.

MONTECUCCHI *et al*. em 1980, descreve a ocorrência de um novo polipeptídeo denominado “sauvagina”, encontrado na pele da *Phyllomedusa sauvagii* e em outras 10 espécies de *Phyllomedusa sp.* estudadas. A “sauvagina” administrada em ratos apresentou intensa atividade hipotensiva, acompanhada de

taquicardia e efeitos diuréticos. Testes com atropina e propanolol não alteraram o quadro de hipotensão, excluindo a participação do sistema nervoso autônomo (ERSPAMER *et al*., 1980).

Um grupo de peptídeos opióides foi encontrado na pele de diversas espécies *Phyllomedusa sp*. São heptapeptídeos com extremidade amino terminal comum, Tyr-*D-Xaa*-Phe, onde *D-Xaa* pode ser uma D-Alanina ou D-Metionina sempre tendo a presença de D-aminoácidos na segunda posição.

Em 1981, foi isolado da pele da *Phyllomedusa sauvagei* um outro heptapeptídeo denominado ”dermorfina” *(Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-*NH_2*),* que demonstrou uma grande diferença das encefalinas conhecidas pela presença de D-aminoácidos em sua seqüência (MONTECUCCHI *et al.*, 1981 a). No mesmo ano foi relatada a ocorrência da ”dermorfina” e seu análogo a [Hyp^6]dermorfina *(Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Hyp-Ser-* NH_2*)* na pele da *Phyllomedusa rhodei* (MONTECUCCHI *et al*., 1981 b).

Em 1984, foram descobertos na pele da *Phyllomedusa rhodei* um tetra e um pentapeptídeo denominados “triptofilinas” (TPH-4 e TPH-5) e em 1985, MONTECUCCHI isolou mais duas “triptofilinas”, denominadas THP-7 e a THP-13.

Os estudos com os peptídeos opióides reaparecem em 1986, quando STEVENS & YAKSH constatam uma atividade analgésica da “dermorfina” potencialmente maior que a da morfina, demonstrando uma alta afinidade e seletividade por receptores de opióides do tipo μ (Mu), onde o subtipo μ1 é responsável pelos sintomas de analgesia, exaltação e depressão respiratória e o subtipo μ2 é mediador dos efeitos gastrointestinais.

A partir do cDNA extraídos da pele da espécie *Phyllomedusa sauvagei*, a seqüência de aminoácidos de diversos precursores da dermorfina foram estabelecidos, sempre apresentando a D-Alanina como segundo aminoácido. Em um desses cDNA foi descoberto a existência de outro heptapeptídeo, contendo a D-Metionina como segundo aminoácido, posteriormente, isolado e denominado deltorfina *(Tyr-D-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp-*NH_2*)* por possuir uma alta afinidade e seletividade por receptores de opióides do tipo δ (Delta) (KREIL *et al.* 1989; MOR *et al.* 1989; LAZARUS *et al.* 1989; AMICHE *et al.* 1989), cujas funções estão relacionadas com alterações no comportamento afetivo e euforia. A deltorfina tem sido considerada a responsável pelos efeitos de analgesia, podendo também ter participação nas alterações de humor observadas após a intoxicação.

ESRPAMER *et al*. (1989) isolaram dois novos peptídeos da pele da *Phyllomedusa bicolor* e, assim como a dermorfina, também apresentaram a D-Alanina como segundo aminoácido. Foram então denominados [D-Ala^2]deltorfina I *(Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH$_2$)* e [D-Ala^2]deltorfina II *(Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH$_2$)* . Estes peptídeos possuem uma alta afinidade e seletividade por receptores de opióides do tipo δ (ESRPAMER *et al*.,1989).

Em 1990, mais três peptídeos foram sintetizados a partir de cDNA extraído da pele da *Phyllomedusa bicolor*. Dentre estes, dois heptapeptídeos a [Lys^7]dermorfina-OH(*Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Lys-OH*) e a [Trp^4,Asn^7]dermorfina-OH (*Tyr-D-Ala-Phe-Trp-Tyr-Pro-Asn-OH*), além de um pentapeptídeo (*Tyr-D-Ala-Phe-Trp-Asn-OH*), todos os três novos peptídeos possuíam um grupamento α-carboxila livre na extremidade C-terminal. (RICHTER *et al.* 1990).

Em 1992, foram sintetizados 10 peptídeos relacionados com a dermorfina, dentro deles a [Lys^7]dermorfina e a [Trp^4,Asn^7]dermorfina com uma amina na extremidade C-terminal. A [Lys^7]dermorfina-NH$_2$ (*Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Lys-NH$_2$*) demonstrou ter alta capacidade antinociceptiva . O efeito analgésico descrito foi superior ao da morfina, tanto no tempo de duração do efeito, quanto na dosagem, que foi cerca de 40 vezes menor. Já a [Trp^4,Asn^7]dermorfina-NH$_2$ (*Tyr-D-Ala-Phe-Trp-Tyr-Pro-Asn-NH$_2$*) apresenta um fraco efeito antinociceptivo e intensa catalepsia (NEGRI *et al.* 1992) .

Além dos peptídeos opióides, dos peptídeos com efeitos cardiovasculares, efeitos hormonais e efeitos gastrointestinais, as espécies da Subfamília Phyllomedusinae produzem peptídeos com ação antimicrobiana denominados dermaseptinas.

As dermaseptinas são polipeptídeos que podem conter de 24 a 34 aminoácidos (DALY *et al*, 1992; MOR & NICOLAS, 1994b; MOR, *et al.*, 1994a) e exercem atividade lítica sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, protozoários ciliados, leveduras e fungos (FLEURY, *et al.*, 1998; AMICHE *et al*., 2000). Entretanto, não foram observados efeitos citolíticos em células de mamíferos, devido à estrutura e composição da membrana celular.

A adenoregulina de *Phyllomedusa bicolor* é um polipeptídeo que contém 33 aminoácidos em sua composição: G-L-W-S-K-I-K-E-V-G-K-E-A-A-K-A-A-A-K-A-A-G-K-A-A-L-G-A-V-S-E-A-V, mas foi isolada primeiramente por sua ação neurológica relacionada aos receptores A1 de adenosina (DALY *et al*., 1992). Posteriormente, foi

relatada sua atividade antimicrobiana contra fungos, leveduras e bactérias semelhante à dermaseptina S, um polipeptídeo com 34 aminoácidos em sua composição (MOR *et al*. 1994 a).

Em 2000, MOHAMED AMICHE isolou um peptídeo contendo 32 resíduos de aminoácidos que foi denominado dermatoxina (S-L-G-S-F-L-K-G-V-G-T-T-L-A-S-V-G-K-V-V-S-D-Q-F-G-K-L-L-Q-A-G-Q) que demonstrou uma alta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Foi isolada uma dermaseptina presente na secreção cutânea de um anfíbio endêmico do Cerrado Brasileiro denominado *Phyllomedusa oreades* descrito pela primeira vez pelo biólogo Reuber Brandão, em 2002. A dermaseptina isolada apresenta grande atividade antimicrobiana, contra bactérias gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*) e gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), inclusive com ação antibactericida contra o *S. aureus* Oxacilina-Meticilina Resistente (MRSA), relacionado com a infecção hospitalar. Foram realizados vários ensaios *in vitro* contra a forma tripomastigota e epimastigota do *Trypanossoma cruzi* e em ambos os casos a dermaseptina demonstrou uma eficiente ação anti-tripanossômica, que em uma concentração de 6 µM durante 2 horas lisou todos os parasitas. (BRAND *et al.* 2002).

Atualmente estudos estão sendo feitos com peptídeos homólogos à dermaseptina, descobertos em diversas espécies de *Phyllomedusa sp.* ou sintetizados a partir de bibliotecas de cDNA e testados contra diversas formas de microorganismos demonstrados na tabela 4.

3.3.2. Estudos com a secreção *in natura*

Em 1992, DALY efetuou um estudo da secreção *in natura* coletada pelos índios Mayorunas em um afluente do Rio Javari, no oeste do Amazonas. A partir de 400 mg da secreção desidratada, encontrou as seguintes concentrações de peptídeos (para cada 100 mg de secreção): 50-65 µg de filoceruleína; 30-50 µg de filocinina; 50-140 µg de filomedusina; 5-10 µg de sauvagina e 0,5-0,8 µg de peptídeos opióides (representado pelas deltorfinas).

Em 1993, ERSPAMER realizou um estudo com a secreção *in natura* da *Phyllomedusa bicolor* coletada pelos índios Matsés (Pano) do Peru. Constatou diversos peptídeos ativos classificados em cinco famílias: ceruleínas (filoceruleína),

taquicininas (filomedusina), bradicininas (filocinina), sauvagina, e peptídeos opióides (deltorfina I e [Lys^7]dermorfina-OH) .

Na secreção desidratada foram encontrados: 32 µg de filoceruleína; 18 µg de filocinina; 22 µg de filomedusina; 3 µg de sauvagina; 5,2 µg de Ala-deltorfinas (mais representada pela deltorfina I e 0,25-0,33 µg de [Lys^7]dermorfina-OH por miligrama de secreção .

Tabela 01: Quantificação de peptídeos encontrados em duas amostras da secreção coletadas por DALY (1992) e ESRPAMER (1993).

	DALY (1992)	**ERSPAMER (1993)**
Procedência da amostra:	Rio Lobo, AM Brasil (73º00' W, 5°50' S)	Rio Galvez, Angamos Peru
Peso seco da secreção:	400mg	132mg
Peptídeos encontrados:	**peso/100mg**	**peso/mg**
filoceruleína	50-65 µg	32 µg
filocinina	30-50 µg	18 µg
filomedusina	50-140 µg	22 µg
sauvagina	5-10 µg	3 µg
[D-Ala^2] deltorfina I	0,5-0,8 µg	5,2 µg

ESRPAMER caracterizou os efeitos fisiológicos de cada peptídeo e dividiu os sintomas da intoxicação pela secreção (20-30mg) em duas fases distintas: os sintomas periféricos, dentre os quais podemos citar atividades gastrointestinais, hipotensivas e vasodilatadoras e os sintomas centrais da intoxicação, onde ocorre um aumento do vigor físico, resistência contra fome e aumento da capacidade de enfrentar situações de estresse. Descrevemos a seguir, os sintomas de cada peptídeo divididos em cada uma das fases da intoxicação:

3.3.2.1. Aspectos periféricos da intoxicação segundo ERSPAMER *et al.* 1993:

Filoceruleína (640-690µg): demonstra uma potente ação gastrointestinal e sobre as secreções pancreáticas. Doses intramusculares menores que 0,06 µg/Kg em humanos provocaram um relaxamento no esfíncter de Oddi, facilitando a saída da bile e doses entre 0,5-1µg/Kg provocaram uma contração da vesícula biliar, potente ação das secreções pancreáticas e grande motilidade intestinal. Efeitos colaterais como náuseas, vômitos, rubor facial, taquicarda moderada, mudanças na pressão arterial, sudorese, desconforto abdominal e estímulo intestinal foram observados com doses de 1 µg/Kg.

Sauvagina: (60-90µg) demonstrou em cachorros um efeito hipotensivo decorrente da intensa vasodilatação, e doses subcutâneas de 0,5 µg/Kg causaram queda na pressão arterial e taquicardia em ratos.

Filomedusina: (440-660µg) demonstrou uma intensa atividade cardiovascular e gastrointestinal. Doses subcutâneas de 1-2 µg/Kg causaram um efeito hipotensivo em cachorros e doses de 0,2-1 µg/Kg provocaram efeitos gastrointetinais.

Filocinina (360-540µg): demonstrou uma atividade hipotensiva. Experiências em cachorros demonstraram um efeito hipotensivo três vezes maior que a bradicinina. Doses de 0,1 µg/Kg administradas por via intravenosa foram suficientes para causar efeitos hipotensivos em cachorros e coelhos.

Peptídeos opióides: representados pela Ala-deltorfina (105-160 µg) e a [Lys^{7}]dermorfina-OH (6-9µg), nestas dosagens, não demonstraram efeitos periféricos.

3.3.2.2. Aspectos centrais da intoxicação segundo ERSPAMER *et al.* 1993:

Filoceruleína: doses subcutâneas de 2 µg/Kg demonstraram náuseas e efeitos analgésicos. Doses de 0,06-0,2 µg/Kg causaram efeitos analgésicos em pacientes sofrendo de cólica renal e dores relacionadas ao câncer. Infusões pela via intravenosa com doses de 2ng/Kg/min (total de 7 µg) causaram significante redução da fome em voluntários humanos.

Sauvagina: doses subcutâneas de 0,3 µg/Kg em ratos causaram a liberação de corticotropina, ativação do eixo pituitária adrenal, aumento no nível de corticosterona no sangue, liberação de β-endorfinas e elevação nos níveis de catecolaminas e glicose no plasma. Os efeitos duraram aproximadamente 2 - 4h.

Filocinina / filomedusina: não foram detectados efeitos para as quantidades presentes em 20-30 µg de secreção.

Peptídeos opióides: não foram detectados efeitos para as quantidades de Ala-deltorfinas (105-160 µg) presentes em 20-30 µg de secreção absorvida pela via subcutânea, entretanto doses intracerebroventriculares de 0,1-0,5 µg/Kg em ratos, demonstraram uma queda da atividade locomotora. A [Lys^7]dermorfina-OH (6-9 µg) causou efeitos analgésicos em ratos com doses subcutâneas de 1-2mg/kg, muito maiores do que as encontradas na secreção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos *Mus musculus* da linhagem suíça, machos, provenientes do Biotério do Instituto Adolf Lutz, com idade de dois meses e com peso, variando entre 22 e 35 g, foram utilizados durante todos experimentos. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Biociências da Universidade Guarulhos, em períodos alternados de luz e escuridão, com água e ração Labina (Purina®) *ad libitum.*

4.2. Preparo da secreção cutânea de *P. bicolor.*

Durante a realização deste trabalho foram utilizados dois tipos de secreção. A secreção denominada como antiga foi coletada no mês de setembro de 2004 na região do Rio Jordão, no Estado do Acre e foi cedida por José Osair Sales, Siã Huni Kuin, líder da tribo indígena Kaxinawá do Rio Jordão. A outra secreção denominada como recente, coletada no mês de outubro de 2006 na região de Cruzeiro do Sul, no Estado do Acre, foi cedida por Leopardo Sales, Yawa Bane Huni Kuin, representante da Associação Kaxinawá do Rio Jordão (ASKARJ).

As amostras das secreções, armazenadas na forma dessecada em espátulas de madeira (Figura 06), foram removidas por meio de raspagem, que foi feita com uma lâmina de bisturi.

O material raspado foi pesado em uma balança analítica (Ohaus modelo GA200) no Laboratório de Histologia da Universidade Guarulhos e em seguida solubilizado em 2 mL de solução fisiológica. A secreção solubilizada foi aliquotada e armazenada a -20ºC até o momento do uso.

Figura 06: Paletas de madeira utilizadas no experimento: A – secreção antiga, coletada em set/2004 (Rio Jordão – AC); B - secreção recente, coletada em out/2006 (Cruzeiro do Sul – AC)

4.3. Dosagem de proteínas

A estimativa da concentração protéica das diferentes secreções de *P. bicolor* foi realizada utilizando o BCA™ Protein Assay kit (Pierce), no laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan. Esse ensaio de detecção colorimétrica de proteínas é baseado no ácido bicinchoninico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina), combinando a redução de íons de cobre realizada pela proteína em meio alcalino. Para quantificação, foi elaborada uma curva padrão com Soro Albumina Bovina (BSA) que variou de 5 a 1500 µg/mL.

Uma alíquota de 0,010 mL de cada solução da curva e das amostras foi colocada em duplicata em uma microplaca de fundo chato. Em seguida foi adicionada 0,2 mL da solução determinada pelo kit. A placa foi incubada durante 30 minutos a 37ºC e em seguida a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Perkin Elmer, modelo Espectra Count™) a 562 nm de absorbância. Os resultados foram expressos em mg/mL.

4.4. Análise do perfil eletroforético das proteínas presentes na secreção de *P. bicolor* por SDS-PAGE

As amostras das secreções foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, segundo LAEMMLI (1970). O gel de separação de 15% de acrilamida foi preparado em tampão 0,4 M Tris-HCl pH 8,8, contendo 0,1% de SDS (Duodecil sulfato de sódio), 0,01 TEMED (N,N,N',N' – Tetrametilenodiamina) e 0,05 persulfato de amônio, para o volume final de 10mL. Após a polimerização desse gel, foi preparado o gel de empacotamento contendo acrilamina 3% em tampão 0,1 M Tris-HCl pH 6.8, 0,1% SDS, 0,01% TEMED e 0,05% persulfato de amônio, para o volume final de 5mL.

Uma alíquota de 0,01 mL de cada secreção foi misturada com o tampão desnaturante redutor, contendo 0,125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 0,002% azul de bromofenol e 4% de β-mercaptoetanol. As amostras foram desnaturadas a 95°C durante 10 minutos e aplicadas no gel. Como tampão de corrida foi utilizado uma solução de 0,025M Tris-HCl, contendo 0,18 M glicina pH 8.3 e 1% SDS. As corridas foram realizadas a 100V a temperatura ambiente por aproximadamente duas horas. Após a corrida, o gel foi corado com solução de nitrato de prata.

O padrão de massa molecular utilizado foi o BenchMark™ Pré-Stained Protein Ladder (Invitrogen).

4.5. Avaliação da atividade edematogênica da secreção de *P. bicolor.*

Os animais (n=5 / grupo) foram pesados e separados em 4 grupos que tiveram suas patas posteriores medidas no tempo inicial e posteriormente inoculadas com as seguintes doses: grupo1 – 0,25mg/mL; grupo2 – 0,5 mg/mL; grupo3 - 1 mg/mL; grupo 4 - 2 mg/mL.

Foi inoculado pela via subcutânea 0,05 mL de solução contendo as diferentes doses da secreção antiga na pata posterior esquerda de cada animal. A pata posterior direita foi utilizada como controle, de forma que foi inoculado o mesmo volume de solução salina.

As medidas para determinar a alteração na espessura das patas foram feitas na região do coxim plantar nos períodos de 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 e 48 horas após a inoculação usando um paquímetro (Manostat, modelo 6911).

A maior dose da secreção antiga (2 mg/mL) foi novamente avaliada em outro experimento utilizando um novo grupo de animais (n=5) e as análises de aumento na espessura da pata foram realizadas em períodos menores: 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos.

4.6. Avaliação da alteração no número de leucócitos totais.

Os animais inoculados por via subcutânea no coxim plantar com doses de 2 mg/mL da secreção antiga foram sangrados pelo plexo retroorbital nos períodos de 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480 minutos após inoculação. Uma amostra de sangue foi imediatamente colocada em um tubo contendo como anticoagulante o EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético), e em seguida foram homogeneizadas. Uma alíquota do sangue coletado foi diluída (1:10) em Líquido de Turk e colocada em um hematocitômetro (câmara de Neubauer) para realização da contagem de leucócitos totais. Os resultados foram expressos em número de células por mililitro de sangue.

4.7. Avaliação no número de leucócitos por esfregaço sanguíneo.

Os animais inoculados por via subcutânea no coxim plantar com doses de 2 mg/mL da secreção antiga foram sangrados pelo plexo retroorbital após 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480 minutos da inoculação. Foi confeccionado o esfregaço sanguíneo de cada amostra e após a secagem, os mesmos foram submetidos ao processo de coloração utilizando o kit Instant-Prov (Newprov) contendo Ciclohexadienos a 0,1%, Azobenzenosulfônicos a 0,1% e Fenotiazinas a 0,1%. Os reagentes e períodos de incubação foram realizados conforme determinação do fabricante. A análise foi feita utilizando um microscópio óptico (Nikon modelo YS2) com aumento final de 1000X e a contagem diferencial (n=100) foi feita para determinação da proporção de monócitos, linfócitos e polimorfonucleares para o grupo controle e os diferentes grupos experimentais. Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.8. Análise histológica do infiltrado de células inflamatórias na região do coxim plantar induzida pela inoculação de secreção de *P. bicolor.*

Os animais (n=3 / grupo) foram pesados e separados em 8 grupos. Foi inoculado no coxim plantar da pata posterior esquerda pela via subcutânea doses de 2 mg/mL da secreção antiga.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical nos períodos de 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360 e 480 minutos após a inoculação e tiveram suas as patas posteriores esquerdas removidas, separadas e fixadas em solução de formol à 10% durante 24 horas.

A região correspondente ao coxim plantar foi extraída e submetida a processo de desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina.

Os cortes histológicos de 5 micras foram realizados com o auxílio de um micrótomo (Reichert-Jung modelo 820 II), colocados em lâminas, desparafinados, hidratados, corados com hematoxilina e eosina (H/E). Em seguida foram desidratados e montados com Entellan® (Merck).

A análise histológica das lâminas foi efetuada pelo Prof. Dr. Franco Ferraro Calderaro responsável pelo setor de anatomia patológica do Hospital Veterinário da UnG (Universidade Guarulhos).

As fotografias das lâminas foram obtidas através do sistema de fotomicrografia digital Cannon Powershot G6 com adaptador Carl Zeiss 426126 em Microscópio Olimpus BX-40 do Laboratório de Palinologia e Paleobotânica da UnG.

4.9. Análise da atividade antibacteriana.

As cepas liofilizadas das bactérias *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) provenientes do Instituto Adolf Lutz foram diluídas em solução fisiológica e posteriormente cultivadas em agar TSA (Merck) e mantidas no laboratório de microbiologia da UnG (Universidade Guarulhos).

As culturas das bactérias *E. coli* (gram negativa) e *S. aureus* (gram positiva) foram diluídas em solução salina até a turbidez de 0,5 na escala de Macfarland e semeadas em placas de Petri contendo Agar Mueller Hinton (Himedia Labs).

Para análise da atividade antibacteriana as placas contendo as culturas de *E. coli* e *S. aureus* receberam quatro discos de papel de filtro com 9 mm de diâmetro.

Os discos foram previamente tratados com 0,005 mL da secreção antiga diluída nas concentrações de : 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2 mg/mL

Em um novo teste incluindo a secreção recente, foram introduzidos em ambas as placas com as culturas de *E. coli* e *S. aureus* sete discos contendo 0,010 mL de cada secreção divididos nas seguintes concentrações: 2,3 e 1,2 mg/mL da secreção antiga e 4,9; 2,4; 1,2; 0,6 e 0,3 mg/mL da secreção recente.

Como controle para os experimentos de atividade antibacteriana foram utilizados discos Sensifar® (Cefar) contendo os antibióticos e as dosagens utilizados para bactérias gram positivas e negativas, conforme mostrado na tabela 02.

Todas as placas foram acondicionadas em estufa bacteriológica com temperatura de 37°C por um período de 18 horas.

As medidas dos halos foram feitas com o auxílio de um paquímetro (Manostat modelo 6911) e os resultados foram expressos em milímetros.

Tabela 02: Antibióticos e dosagens utilizadas no disco Sensifar® (Cefar) para bactérias gram positivas e gram negativas.

Gram +			**Gram -**		
Antibiótico	**Sigla**	**Dose µg**	**Antibiótico**	**Sigla**	**Dose µg**
Amicacina	AMI	30	Amicacina	AMI	30
Ampicilina	AMP	10	Amoxicilina + Ac. Clavulânico	AMC	30
Cefalotina	CFL	30	Ampicilina	AMP	10
Ceftazidima	CAZ	30	Aztreonama	ATM	30
Ciprofloxacina	CIP	5	Cefepima	CPM	30
Clindamicina	CLI	2	Cefotaximna	CTX	30
Cloranfenicol	CLO	30	Cefoxitina	CFO	30
Cotrimoxazol	SUT	25	Ceftazidima	CAZ	30
Eritromicina	ERI	15	Ceftriaxona	CRO	30
Gentamicina	GEN	10	Ciprofloxacina	CIP	5
Oxacilina	OXA	1	Cloranfenicol	CLO	30
Penicilina G	PEN	10	Cotrimoxazol	SUT	25
Tetraciclina	TET	30	Gentamicina	GEN	10
Tobramicina	TOB	10	Tetraciclina	TET	30
Vancomicina	VAN	30	Tobramicina	TOB	10

4.10. Análise estatística

Para análise das alterações na espessura da pata e das alterações hematológicas foi, inicialmente, utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA), e as comparações múltiplas foram realizadas por meio de teste de Turkey-Kramer, sendo o nível de significância estabelecido para $p<0,05$. As análises foram efetuadas pelo programa Graph Pad Instat e as figuras dos resultados foram feitas com a utilização do programa Microsoft Excell.

5. RESULTADOS

5.1. Preparo da secreção cutânea de *P. bicolor* e dosagem protéica.

Após a raspagem a secreção antiga, obteve-se o peso de 35,4 mg. A secreção recente foi raspada até atingir o peso de 35,4 mg e ambas foram solubilizadas com o mesmo volume de solução fisiológica.

Uma parte da secreção não dissolveu na solução fisiológica, precipitando no fundo do tubo. A fase líquida foi aliquotada (0,04 mL) e armazenadas a –20ºC até o momento do uso.

Foi realizada a dosagem da quantidade protéica da secreção antiga e nova, por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro. Os valores de densidade óptica (DO), obtidos para as diferentes amostras de BSA, foram utilizados como referência para elaboração de uma equação que permitiu a determinação da quantidade protéica de presente na secreção (Figura 07).

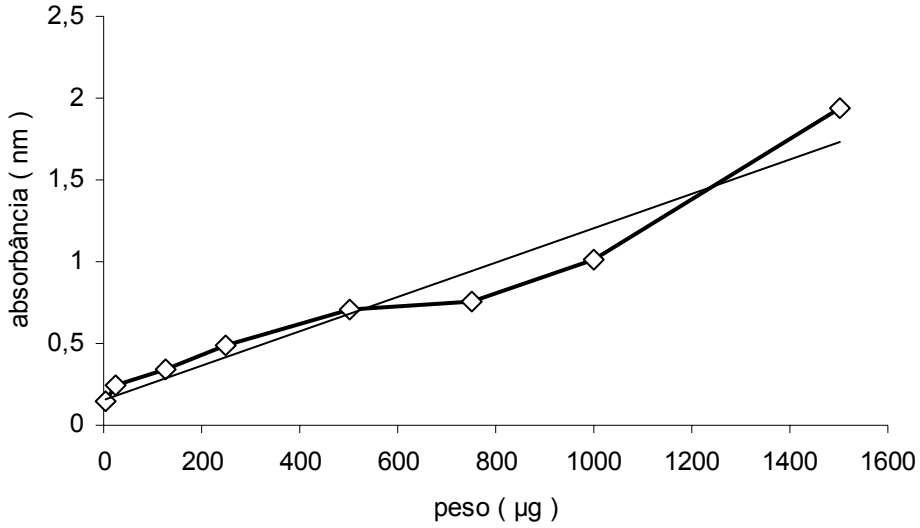

Figura 07: Curva padrão de quantidade protéica obtida para a amostra de BSA. R=0,9724

A leitura da DO_{562nm} foi de 0,420 para a secreção antiga e de 0,703 para a secreção nova. Esses dados foram colocados na curva padrão de BSA e a concentração protéica de cada secreção foi determinada em 2,381 mg/mL para a secreção antiga e 4,954 mg/mL para a secreção nova.

5.2. Análise do perfil eletroforético das proteínas presentes na secreção de *P. bicolor* por SDS-PAGE

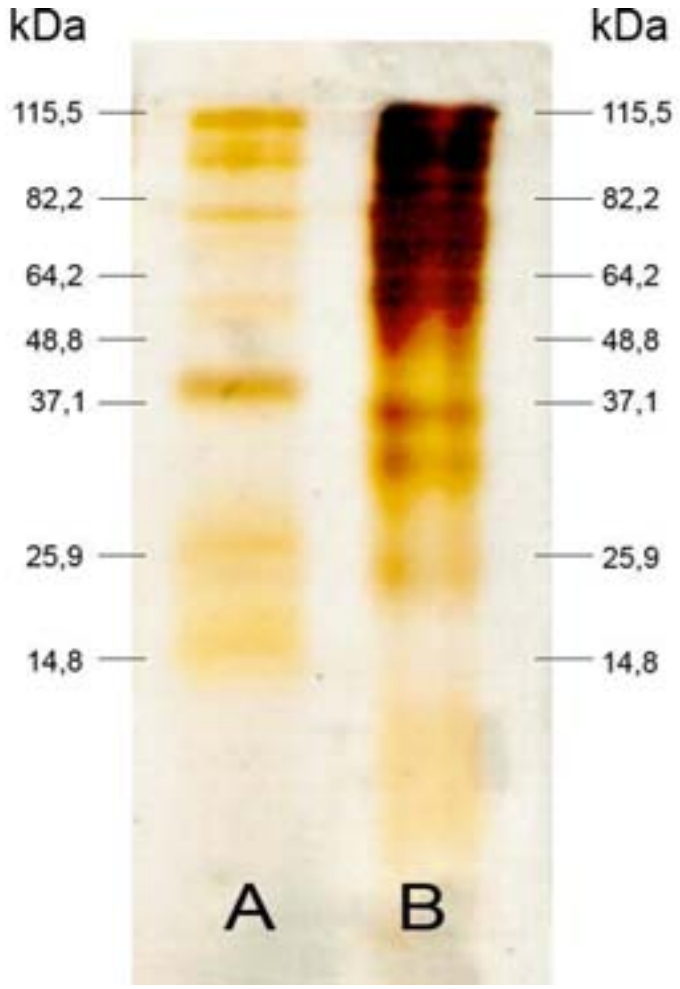

Figura 08: Perfil eletroforético das amostras: A - secreção coletada em set/2004 (Rio Jordão – AC), B – secreção coletada em out/2006 (Cruzeiro do Sul – AC)

O perfil eletroforético das secreções A e B demonstram bandas protéicas em número e intensidade variáveis. A secreção coletada em setembro de 2004 (Figura 08A) apresenta bandas evidentes nos intervalos de 115,5 - 40 kDa e 35 - 14,8 kDa, a maior concentração de proteínas foi evidenciada no intervalo de 115,5 – 82,2 kDa e em uma banda de, aproximadamente, 40 kDa. A secreção coletada em outubro de 2006 (Figura 08B) apresenta bandas evidentes nos intervalos de 115,5 - 25,9 kDa e proteínas com peso molecular inferior a 14,8 kDa. O intervalo de 115,5 – 64,2 kDa apresentou a maior intensidade e concentração de proteínas.

A análise da secreção antiga, em relação à secreção recente, demonstra a ausência de proteínas entre os intervalos de 37,1 e 27 kDa e com pesos moleculares abaixo de 14,8 kDa.

5.3. Avaliação da atividade edematogênica da secreção de *P. bicolor.*

Para avaliação da possível atividade causadora de edema da secreção de *P. bicolor* camundongos foram inoculados com diferentes doses da secreção na pata esquerda e com o mesmo volume se solução fisiológica na pata direita. Ambas foram mensuradas ao longo de 48 horas.

Conforme pode ser observado na figura 09, a dose de 0,25mg/mL causou um aumento na espessura da pata de 43%, com pico de atividade 1 hora após a inoculação. Diferenças significativas foram determinadas para os períodos entre 1 e 4 horas (p<0,05).

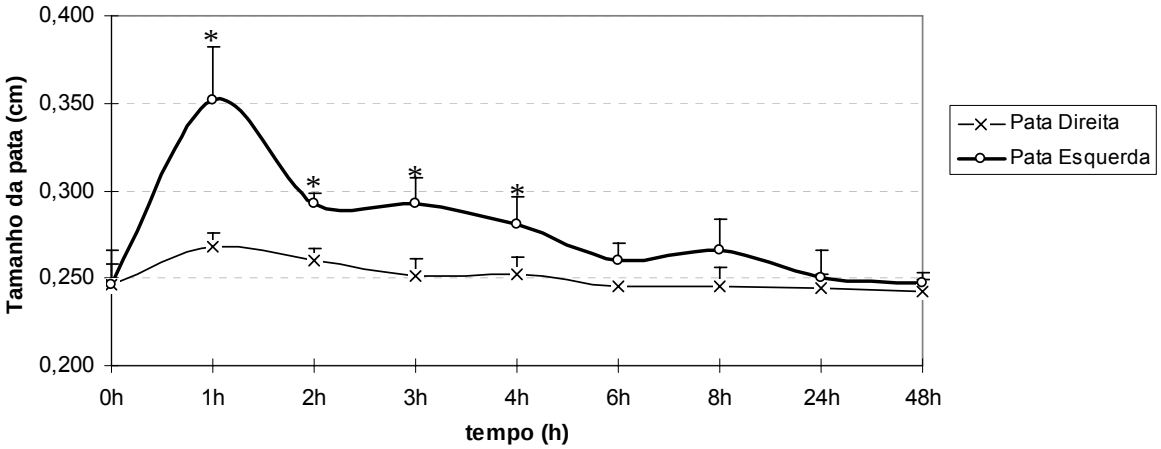

Figura 09: Aumento da espessura da pata dos camundongos inoculados com 0,25 mg/mL da secreção de *P.bicolor*. * p<0,05.

Para a dose de 0,5 mg/mL, foi observado um aumento na espessura da pata de 40%, com pico de atividade 1 hora após a inoculação e diferenças significativas foram determinadas para os períodos entre 1 e 4 horas (p<0,05). Embora, neste grupo experimental tenha sido utilizado o dobro da quantidade de secreção o aumento na espessura da pata apresentou um padrão parecido com o grupo que recebeu 0,25 mg/mL, conforme mostrado na figura 10.

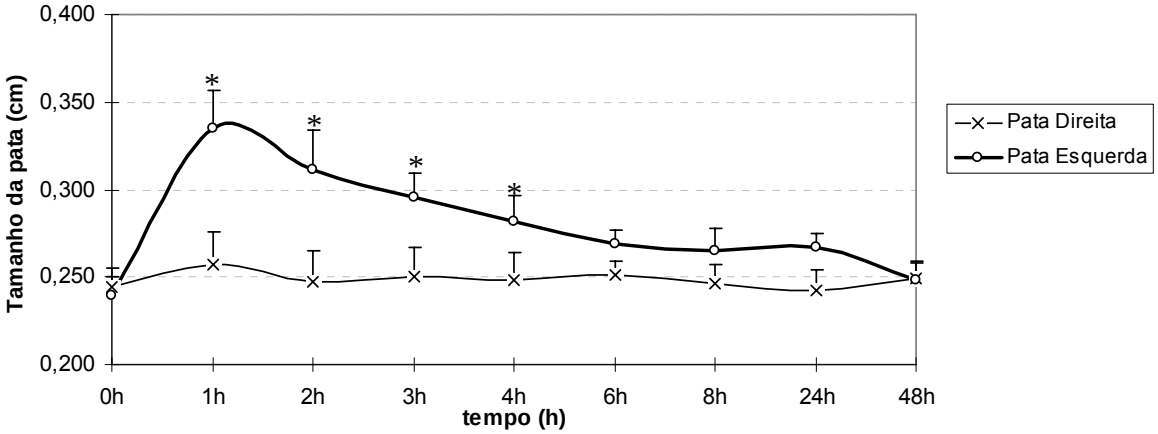

Figura 10: Aumento da espessura da pata dos camundongos inoculados com 0,5 mg/mL da secreção de *P.bicolor*. * p<0,05.

A dose de 1 mg/mL causou um aumento na espessura da pata de 56%, com pico de atividade 1 hora após a inoculação e diferenças significativas foram determinadas para os períodos entre 1 e 4 horas (p<0,05), conforme mostrado na figura11.

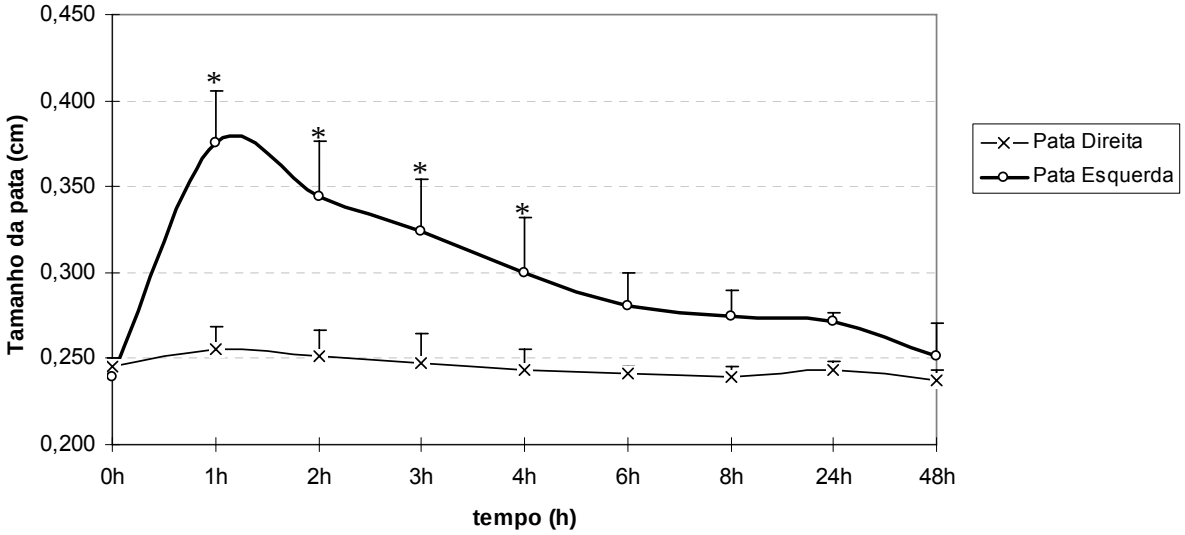

Figura 11: Aumento da espessura da pata dos camundongos inoculados com 1 mg/mL da secreção de *P.bicolor*. * p<0,05.

A maior dose testada, de 2 mg/mL, causou um aumento na espessura da pata de 71%, com pico de atividade 1 hora após a inoculação e diferenças significativas foram determinadas para os períodos entre 1 e 6 horas (p<0,05), conforme pode ser observado na figura 12.

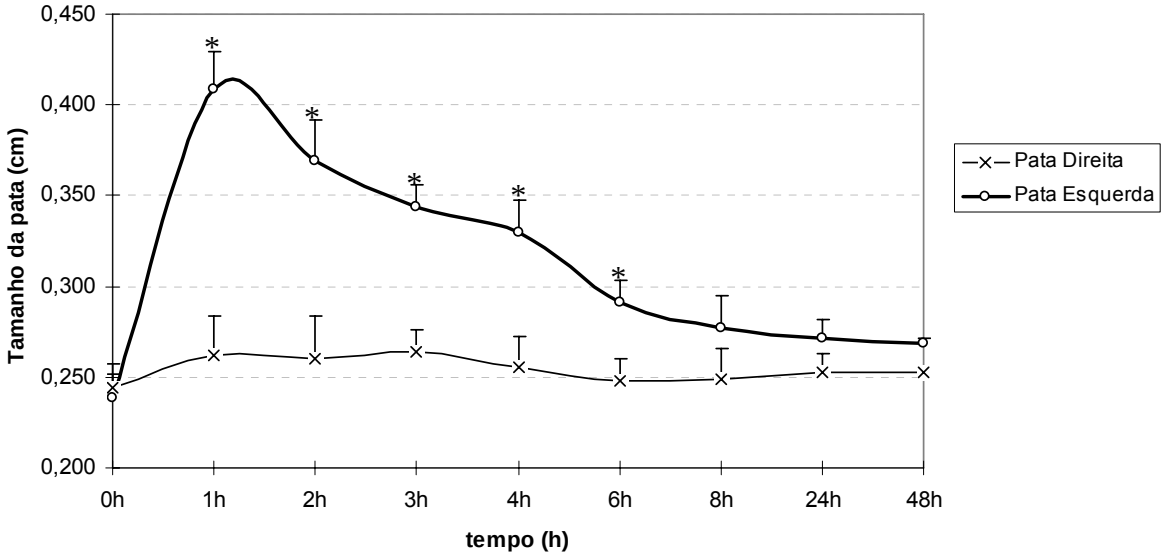

Figura 12: Aumento da espessura da pata dos camundongos inoculados com 2 mg/mL da secreção de *P.bicolor*. * p<0,05.

Foi possível determinar que a dose de 2 mg/mL foi a que causou um maior aumento na espessura das patas, para avaliar este efeito em períodos mais curtos, um novo grupo de animais foi inoculado com 2 mg/mL de secreção na pata esquerda e com o mesmo volume de solução fisiológica na pata direita e o aumento da espessura foi determinada em períodos.

Nesse novo experimento, foi possível observar que a dose de 2 mg causou um aumento na espessura da pata de 74%, com pico de atividade 5 minutos após a inoculação e diferenças significativas foram determinadas para todos os períodos entre 5 e 60 min (p<0,05), conforme mostrado na figura 13.

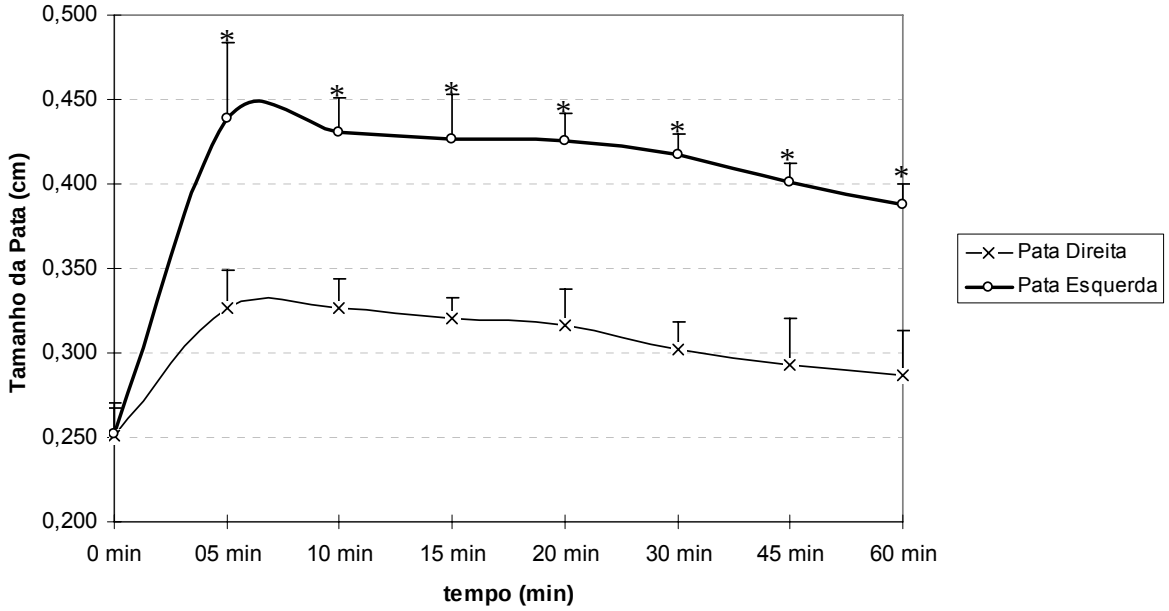

Figura 13: Aumento da espessura da pata dos camundongos inoculados com 2 mg/mL da secreção de *P.bicolor,* avaliadas nos períodos iniciais após a inoculação. * p<0,05.

5.4. Avaliação da alteração no número de leucócitos totais e diferenciais

A contagem do número total de leucócitos sangüíneos demonstrou um aumento que teve início no período de 15 minutos após a inoculação, atingindo número máximo no período de 60 minutos e retornando à normalidade em 2horas. Diferenças significativas (p<0,05) foram determinadas para os períodos de 30 e 60 minutos, conforme a figura 14.

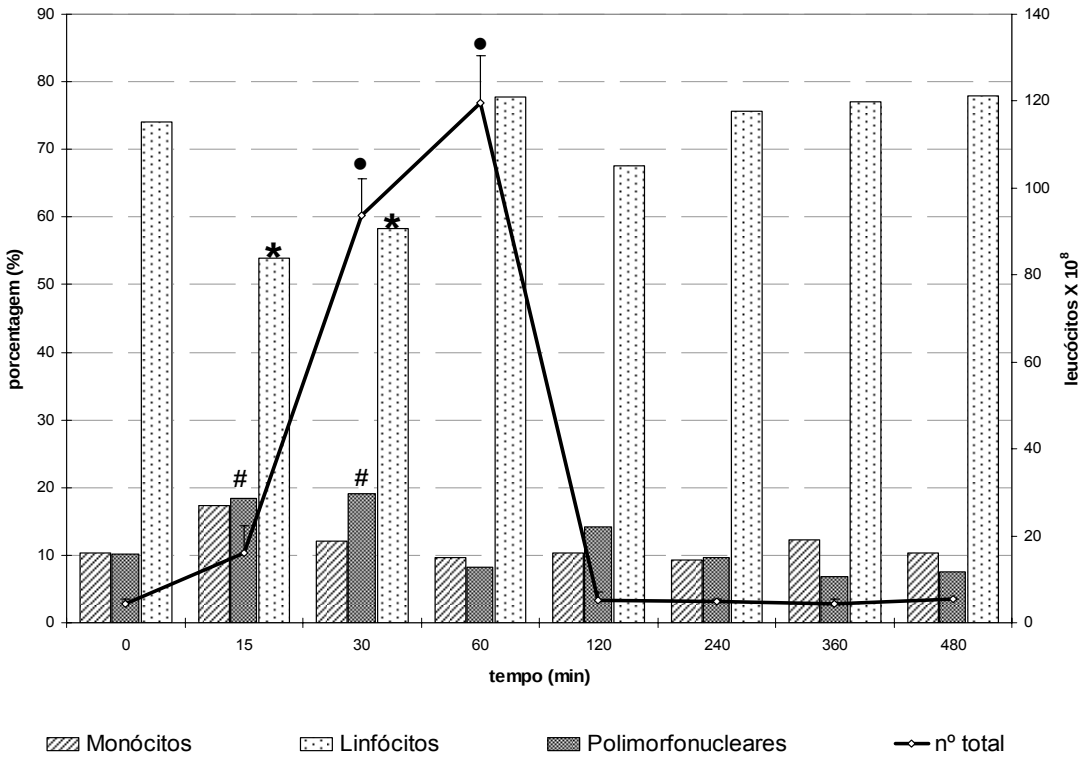

Figura 14: Contagem total e diferencial de leucócitos.
(*) linfócitos, (#) polimorfonucleares, (•) contagem total (p<0,05).

As alterações na contagem diferencial dos leucócitos sangüíneos puderam ser observadas a partir do período de 15 minutos após a inoculação, intervalo no qual ocorreu um aumento significativo na população de polimorfonucleares (p<0,05) e uma diminuição na população de linfócitos (p<0,05). Essas alterações permaneceram até o período de 30 minutos, retornando aos níveis do grupo controle nos períodos posteriores. Não foram determinadas diferenças significativas para os outros períodos. Não ocorreu alteração significativa na população de monócitos durante os períodos analisados neste experimento. Os resultados estão expressos em porcentagem na figura 14.

5.5. Análise histológica do infiltrado de células inflamatórias na região do coxim plantar induzida pela inoculação de secreção de *P. bicolor.*

A análise do grupo controle (0 minuto) revelou ausência de infiltrado inflamatório significativo na região de derme, conforme pode ser observado na figura 15a. Porém, a análise realizada no grupo 1, após 15 minutos da inoculação da secreção, demonstrou a presença de congestão e edema moderados da derme, podendo set observados espaçamento e desorientação das fibras colágenas. Há dilatação de capilares linfáticos e presença de infiltrado inflamatório multifocal discreto a moderado constituído por células mononucleares e poucos neutrófilos (Figura 16)

Na análise da pata após 30 minutos de inoculação (grupo 2), pode ser observada presença de edema e congestão em subcutâneo com dilatação de linfáticos. Há infiltrado inflamatório multifocal em derme com predomínio de células polimorfonucleares (neutrófilos). Há poucos eosinófilos e mastócitos (Figura 17).

Para o período de 60 minutos (grupo 3) ocorreu a manutenção do edema e de infiltrado inflamatório multifocal mais acentuado em derme, porém aprofundando-se para a hipoderme e camadas de musculatura estriada. O infiltrado é, predominantemente, polimorfonuclear neutrofílico com a presença de eosinófilos e mastócitos. Nota-se marginação leucocitária em diversos capilares na região do processo inflamatório. Foi possível observar também focos de hemorragia. (Figura 18).

A análise dos animais do Grupo 4, coletadas após 120 minutos demonstrou a presença de edema moderado. Aspecto semelhante ao animal do grupo 3, com infiltrado inflamatório multifocal predominantemente polimorfonuclear neutrofílico na derme, hipoderme e camadas musculares. Foram também observados eosinófilos e mastócitos nas áreas de inflamação (Figura 19).

Para os animais do grupo 5 (240 minutos), observou-se infiltrado inflamatório, predominantemente, polimorfonuclear neutrofílico multifocal acentuado em derme, hipoderme e camadas musculares. Há poucos eosinófilos e mastócitos (Figura 20).

No período de 360 minutos após a inoculação (grupo 6), foi observada a presença de infiltrado inflamatório acentuado multifocal em derme, estendendo-se para a hipoderme e camadas musculares. Também foi possível notar a presença de macrófagos em pouca quantidade fazendo parte desse infiltrado. Na derme, edema

foi acentuado com diversos fibroblastos jovens dispersos em várias direções. Edema e hemorragia foram bastante evidentes. Há poucos eosinófilos e mastócitos (Figura 21).

No último período avaliado, 480 minutos, foi possível demonstrar a presença de infiltrado inflamatório moderado e multifocal com predomínio de polimorfonucleares, mas com maior número de macrófagos do que no tempo anterior. Há menos edema e congestão que em outros tempos (Figura 22)

Nota-se que a secreção, em uma concentração de 2mg/mL, provoca uma resposta inflamatória aguda com presença de edema e congestão em derme e infiltrado polimorfonuclear neutrofílico predominante multifocal que inicia discreto a moderado nos casos 15 e 30 minutos e começa a aumentar no caso 120 minutos, tornando-se mais acentuado em 240 e 360 minutos, onde acometem, além da derme, a hipoderme e camadas musculares. Há também alguns eosinófilos e mastócitos com citoplasma granulado que podem indicar um discreto processo alérgico.

Figura 15: (a) - Pele sem evidência de infiltrado inflamatório significante.
Aumento 200X.

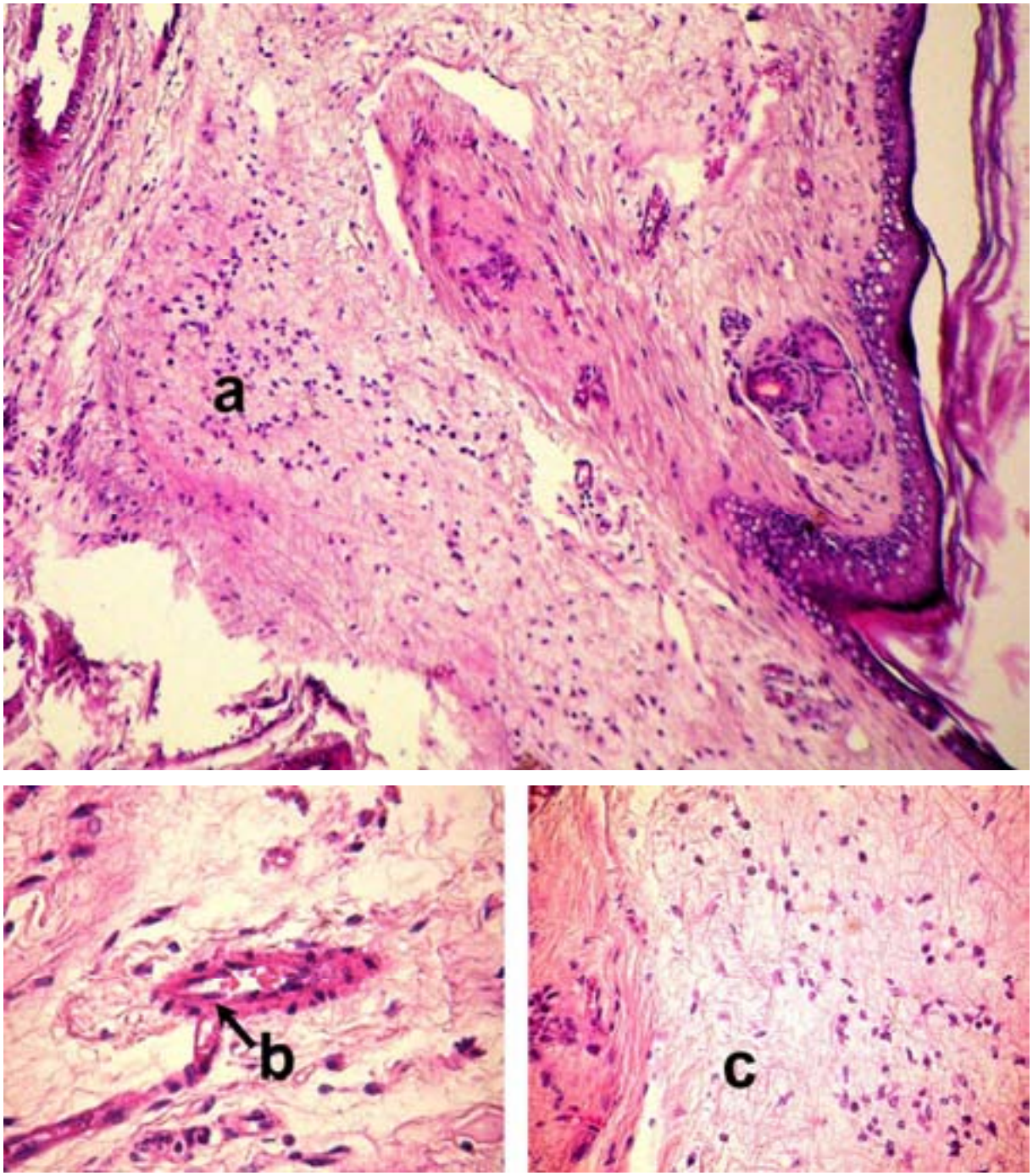

Figura 16: (a) - Edema moderado da derme. (b) – Adesão de leucócitos.
(c) - Espaçamento das fibras colágenas indicando edema.
(a) - Aumento 200X. (b) – Aumento 1000X. (c) – Aumento – 400X

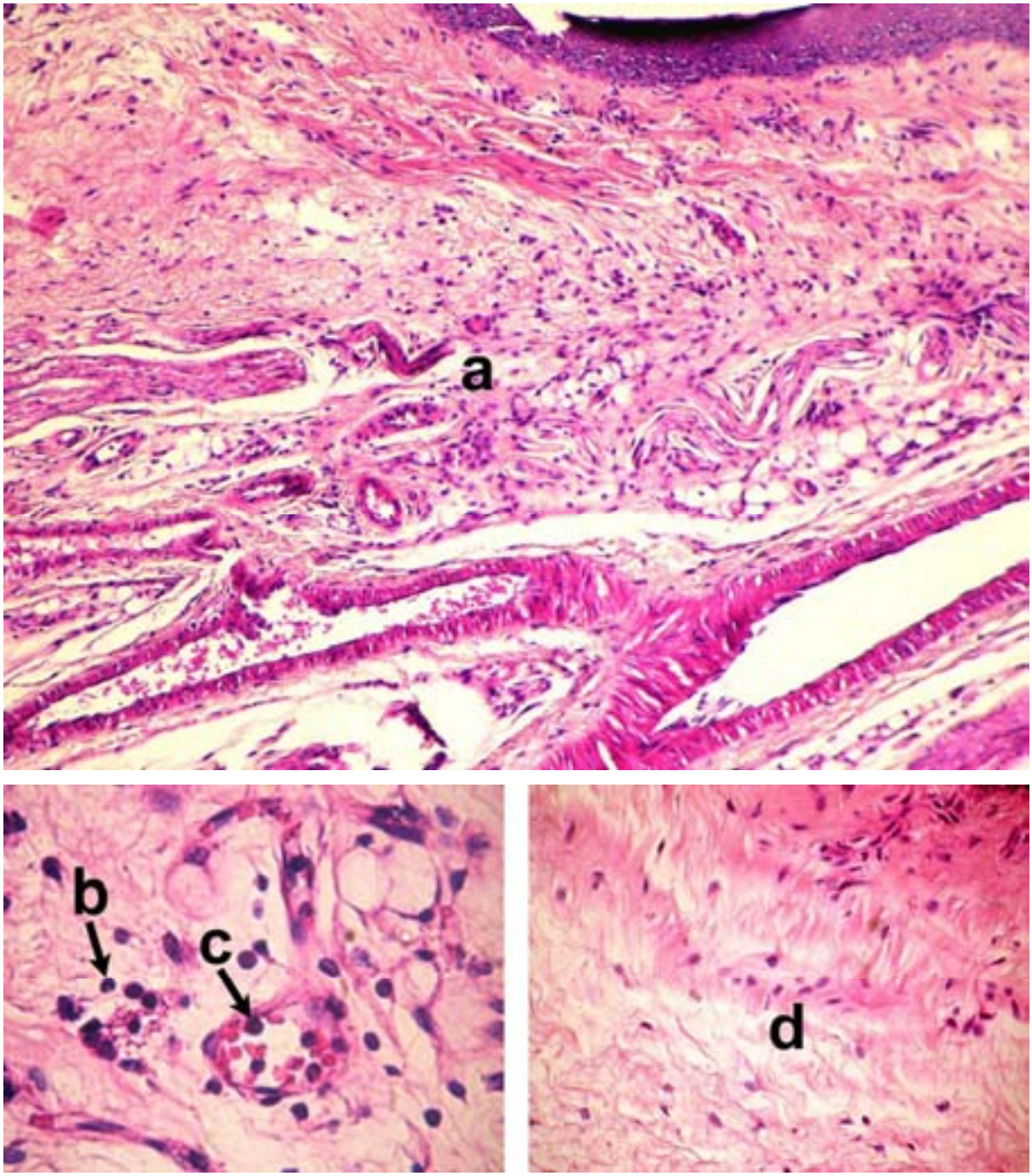

Figura 17: (a) e (d) – Infiltrado inflamatório em derme. (b) – Predominâmcia de células polimorfonucleares (neutrofilos). (c) – Marginação leucocitária.
(a) - Aumento 200X. (b) e (c) – Aumento 1000X . (d) – Aumento 400X

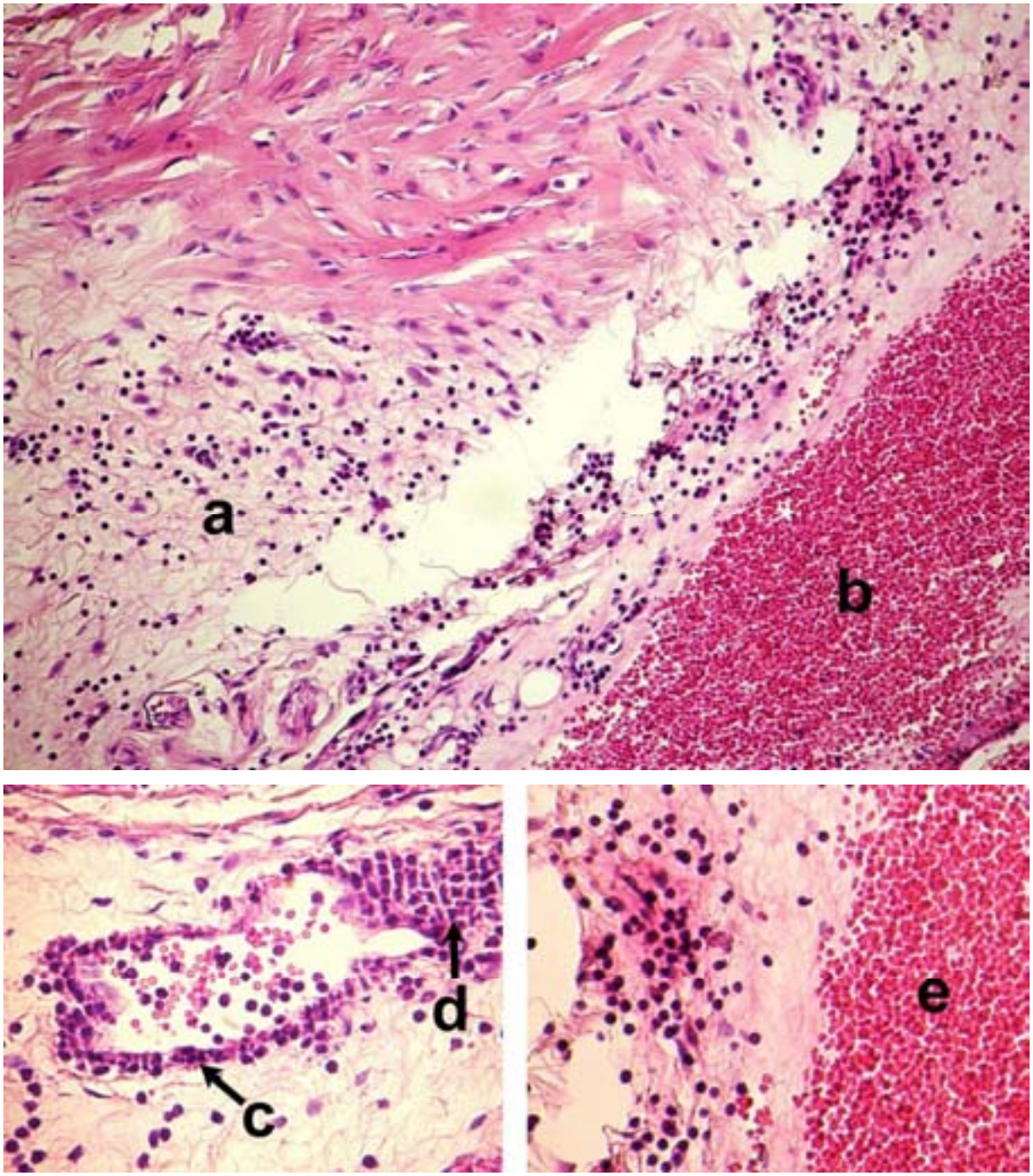

Figura 18: (a) - infiltrado inflamatório multifocal mais acentuado em derme e aprofundando-se para a hipoderme. (b) e (e) - Focos de hemorragia. (c) – Marginação leucocitária. (d) – Infiltrado predominantemente polimorfonuclear. (a) e (b) - Aumento 200X. (c), (d) e (e) – Aumento 1000X

Figura 19: (a) - Infiltrado inflamatório na derme e hipoderme. (b) - Infiltrado inflamatório em camadas musculares. (a) e (b) - Aumento 200X.

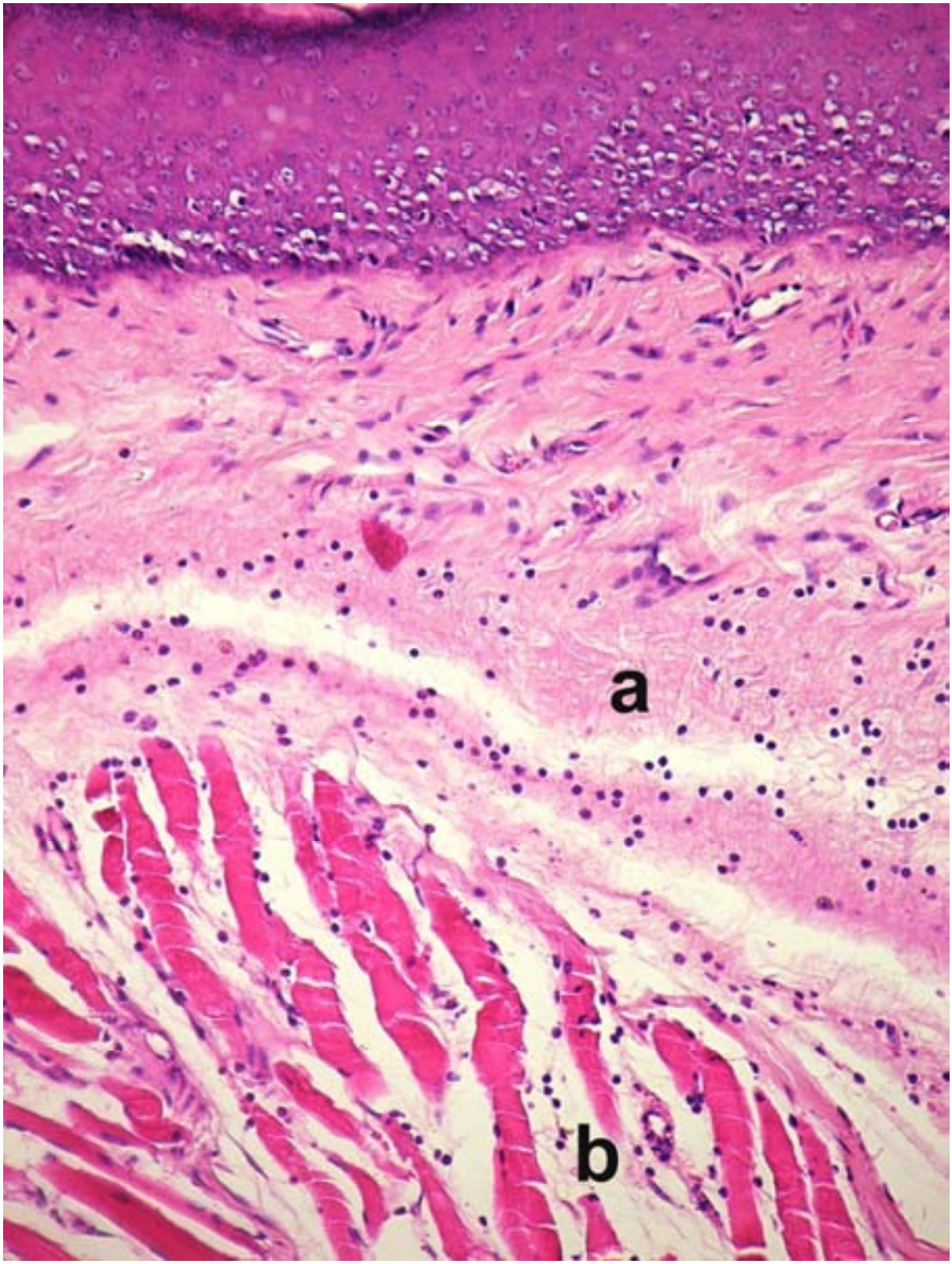

Figura 20: (a) – Infiltrado inflamatório em derme. (b) – Infiltrado inflamatório em tecido muscular. (a) e (b) - Aumento 200X.

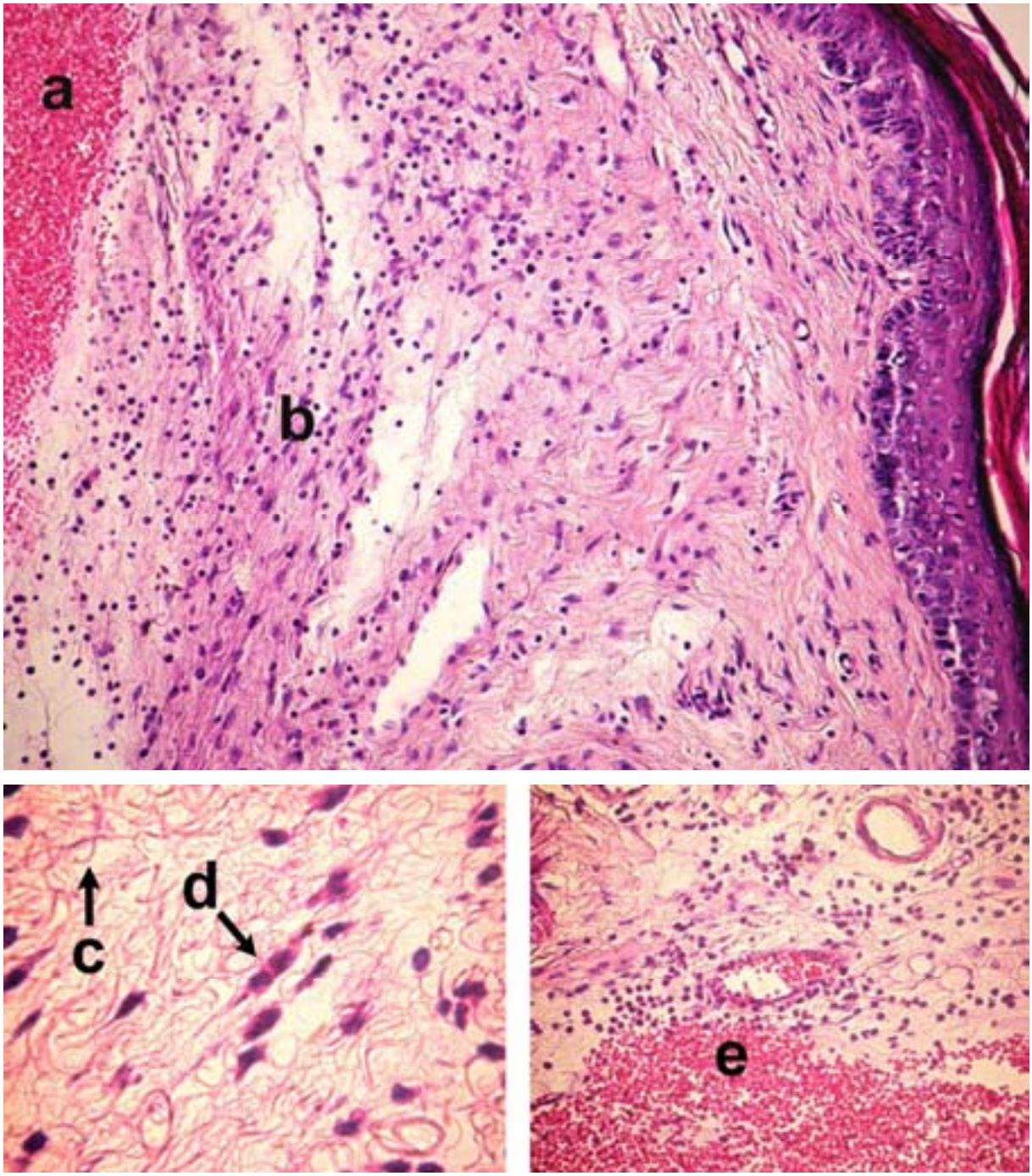

Figura 21: (a) e (e) – Focos de hemorragia. (b) – Infiltrado inflamatório na derme e hipoderme. (c) – Fibras colágenas desorientadas indicando edema. (d) – Fibroblastos jovens. (a) e (b) - Aumento 200X. (c) e (d) – Aumento 1000X. (e) – Aumento 400X

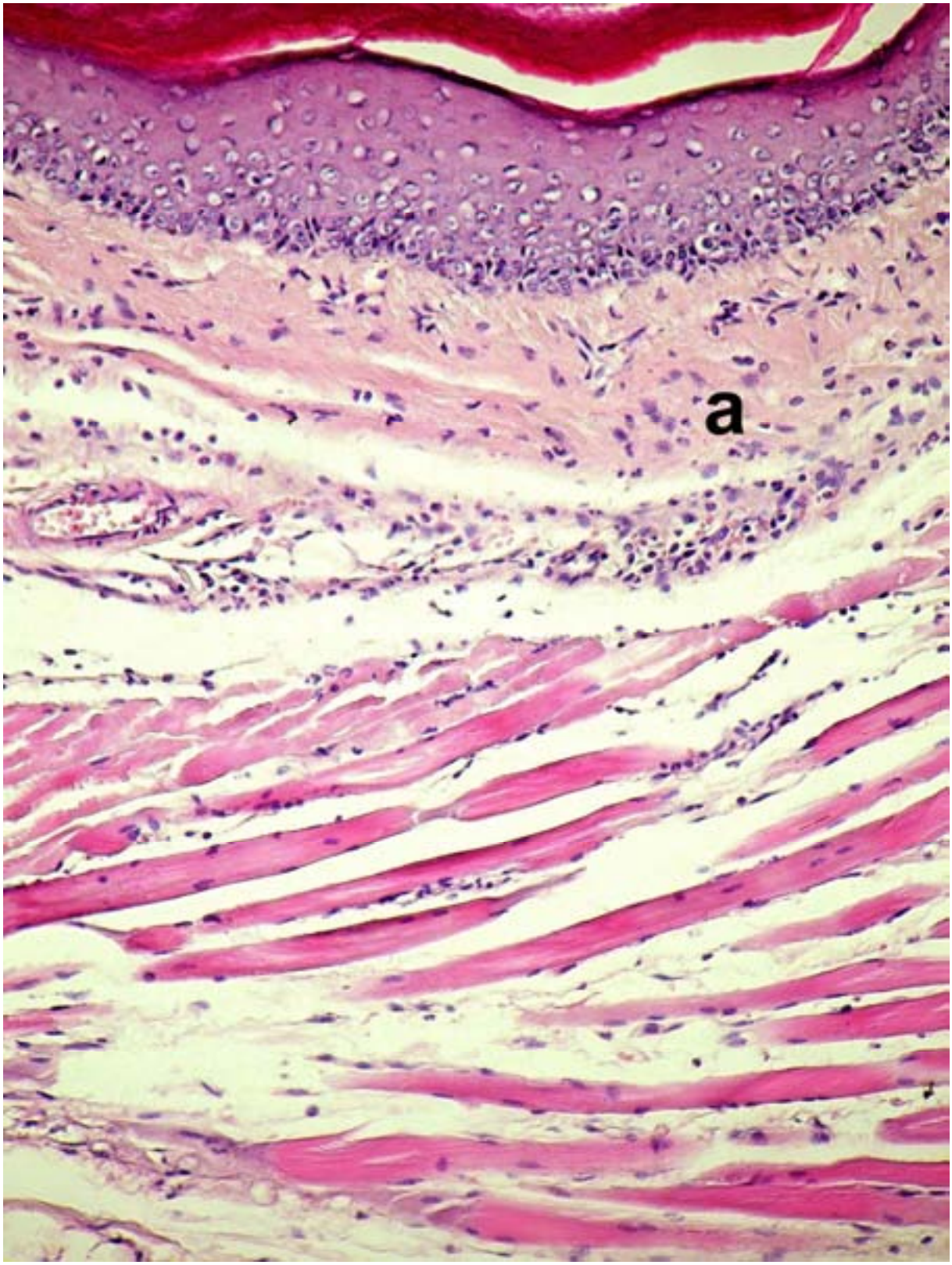

Figura 22: (a) – Infiltrado inflamatório moderado.
(a) - Aumento 200X.

5.6. Análise da atividade antibacteriana.

Testes realizados com a secreção antiga nas seguintes dosagens: 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2 mg/mL, correspondentes a 0,005 mL (1/10) das amostras utilizadas para inoculação durante o experimento, não apresentaram atividade antibacteriana tanto para *E. coli* como para *S. aureus.*

Um novo teste foi realizado, utilizando doses de 2,3 e 1,2 mg/mL da secreção antiga incluindo doses de 4,9; 2,4; 1,2; c e 0,3 mg/mL da secreção recentemente coletada. Os resultados indicam que na secreção antiga foi observada uma atividade antibacteriana para ambas as doses (2,3 e 1,2 mg/mL) tanto sobre *E. coli* quanto para *S.aureus*. Já a secreção recente apresentou atividade antibacteriana para *E. coli* nas doses de 4,9 e 2,4 mg/mL e para *S.aureus* nas doses de 4,9;; 2,4; 1,2 e 0,6 mg/mL (Figura 23).

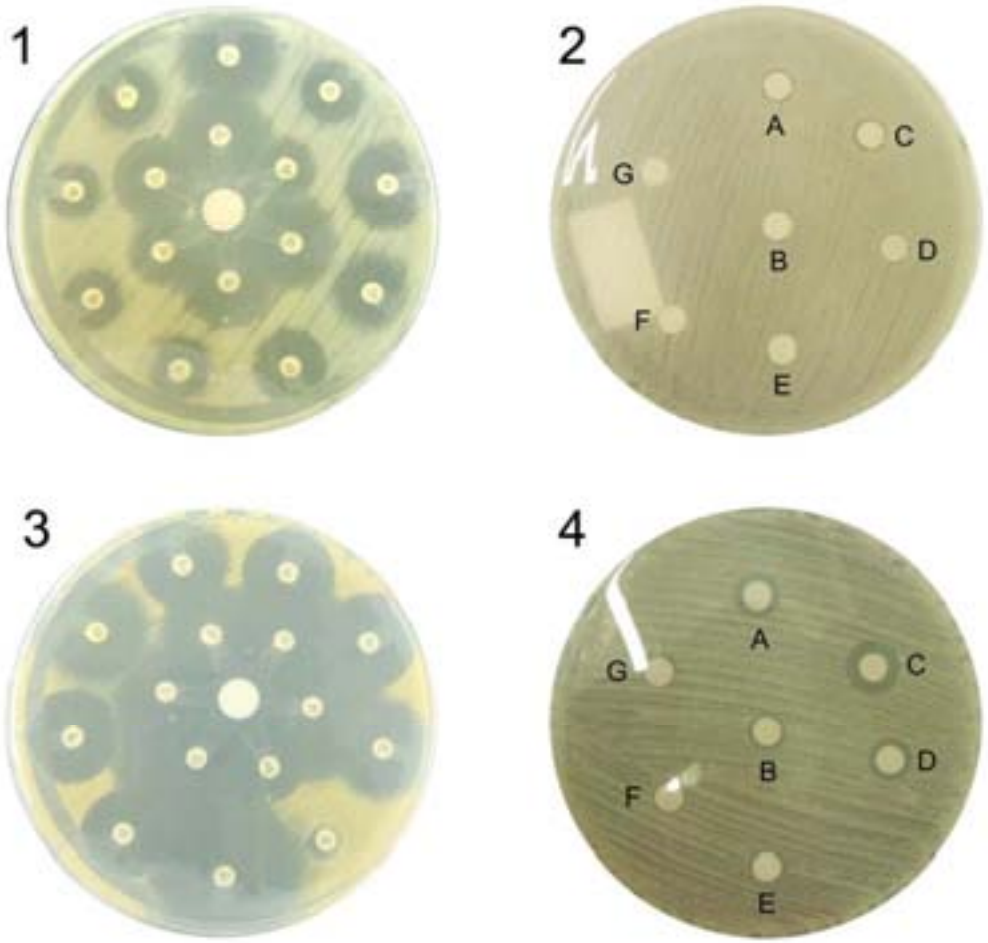

Figura 23: Atividade antibacteriana das secreções: *E. coli* (1 e 2) e *S. Aureus* (3 e 4). Discos antibiograma gram-negativo (1) e gram-positivo (3). Dosagens: secreção antiga – 2,3 mg/mL (A); secreção antiga – 1,2 mg/mL (B); secreção recente – 4,9 mg/mL (C); secreção recente – 2,4 mg/mL (D); secreção recente – 1,2 mg/mL (E); secreção recente – 0,6 mg/mL (F); secreção recente – 0,3 mg/mL (G).

Foi observada uma maior atividade inibitória no crescimento de colônias de *S. aureus* em relação às de *E. coli* para todas as doses que demonstraram atividade antibacteriana, conforme mostra a tabela 03. Essa maior sensibilidade da bactéria gram positiva testada foi observada para as duas secreções.

Todos os antibióticos testados (Tabela 02 pág. 31) causaram halos com diâmetros maiores (18,40 – 30,75 mm para *E. coli* e 27,1 – 49,1 mm para *S. aureus*) do que as doses das secreções com exceção da Ceftazidima, que causou a formação de um halo de 22,7 mm para *E. coli* e 10,3 mm para *S. aureus*.

Tabela 03: Análise da atividade antibacteriana das duas amostras de secreção.
Volume utilizado nas doses: 0,01 mL em discos de papel filtro com 9 mm de diâmetro.

Doses (mg/mL)	*E. coli* ATCC 8739 (-)	*S. aureus* ATCC 6538 (+)
Secreção antiga	diâmetro (mm)	diâmetro (mm)
A – 2,3	10,10	13,25
B – 1,2	9,20	10,90
Secreção recente		
C – 4,9	11,20	17,10
D – 2,4	9,65	12,90
E – 1,2	_____	11,15
F – 0,6	_____	10,10
G – 0,3	_____	_____

6. DISCUSSÃO

Alguns peptídeos, principalmente, da família das dermaseptinas apresentam estrutura formada por aminoácidos em uma cadeia linear com estrutura secundária aleatória em solvente aquoso e ordenada (α -hélice) em meio apolar (MOR *et al.*, 1994a; MOR & NICOLAS, 1994b). É possível que, devido à presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, algumas proteínas não tenham sido solubilizadas na solução fisiológica e, conseqüentemente, não foram incluídas neste estudo. Porém, a solubilização da amostra de secreção em soluções de metanol como realizada por alguns autores (DALY, 1992; ERSPAMER, 1993), seria inviável para realização do estudo utilizando um modelo animal.

A maior parte dos trabalhos científicos sobre a secreção das diversas espécies de *Phyllomedusa sp.* cita apenas os peptídeos constituintes da secreção. Alguns peptídeos com pesos moleculares entre 1,7-2,1 kDa (LEITE *et al*. , 2005); 3,1 kDa (SILVA *et al*. , 2000) e 5,4 kDa (BATISTA *et al.* , 2001) têm sido descritos pela sua capacidade antimicrobiana.

As diferenças observadas no perfil eletroforético das duas secreções sugerem a possibilidade de ocorrer uma degradação das proteínas constituintes da secreção coletada em 2004 e armazenada na espátula de madeira em temperatura ambiente, reproduzindo as condições de armazenamento tradicionais. Na literatura podemos encontrar estudos que descrevem diferenças entre a secreção armazenada e a coletada recentemente. LIMA (2005) cita as diferenças na utilização pelos Katukina em questão ao número de pontos de aplicação entre a secreção armazenada e a recém-coletada, que é aplicada em menor quantidade devido aos fortes efeitos fisiológicos.

Além disto, ERSPAMER (1993) descreve a ocorrência de degradação dos peptídeos na secreção desidratada, principalmente, da [Trp^4Asn^7]dermorfina-OH encontrada na pele do anfíbio.

Entretanto, somente estudos envolvendo espectrometria de massa poderiam qualificar e quantificar com precisão quais os peptídeos ou proteínas degradadas na secreção coletada em 2004.

Não foram encontrados trabalhos referentes à atividade edematogênica ou imunomodulatória relacionadas com as secreções de *Phyllomedusa sp*.

Diversos estudos demonstram que a formação do edema é decorrente do aumento do fluxo da microcirculação local, seguido de um aumento na

permeabilidade vascular com extravasamento de fluidos do plasma para o interstício (GARCIA-LEME *et al. apud:* BARBOSA, 2003). A bradicinina (*Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg*), descoberta por ROCHA E SILVA *et al.* (1949), possui uma atividade vasodilatadora e está envolvida em processos inflamatórios, promovendo o aumento da permeabilidade vascular (REGOLI & BARABÉ, 1980). É possível que a atividade edematogênica da secreção seja potencializada pela filocinina (*Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Ile-Tyr-HS0*$_3$), um peptídeo da família das bradicininas presente na secreção de *P. bicolor* (ERSPAMER, 1993). Entretanto, no presente estudo não foram purificados peptídeos ou proteínas, de forma que se torna necessário a realização de novos trabalhos mais específicos para a determinação precisa do agente edematogênico.

Os experimentos realizados neste estudo sugerem que a inoculação da secreção da *P. bicolor* em camundongos desencadeiam um processo inflamatório agudo local. Segundo SILVA & MOTA (2003), a morfologia da inflamação aguda consiste em alterações no calibre dos vasos e aumento do fluxo sangüíneo, alterações morfofuncionais na microcirculação resultando na saída de plasma e células sangüíneas da circulação, migração de leucócitos e seu acúmulo no tecido inflamado, hiperemia seguida de edema e hemorragia após alguns minutos.

ERSPAMER (1993) cita dois peptídeos constituintes da secreção: a filocinina e a filomedusina das famílias das bradicininas e taquicininas, respectivamente, como potentes agentes pró-inflamatórios.

A existência de mastócitos e eosinófilos granulados nos períodos de 30 a 360 minutos com ênfase no Grupo 4 (120 minutos), conforme demonstrado na análise histopatológica, sugerem também uma discreta reação de hipersensibilidade do tipo 1. A anafilaxia consiste em uma reação deflagrada por IgE ou por outra anafilotoxina capaz de mediar degranulação dos mastócitos, causando vasodilatação e contração da musculatura lisa (ROITT & DELVES, 2004). Os componentes do sistema complemento C3a, C4a e C5a atuam como anafilotoxinas e, uma vez que seus receptores são encontrados tanto na superfície de mastócitos como de neutrófilos, podem atuar tanto nas reações de hipersensibilidade quanto nas reações inflamatórias (SILVA & MOTA, 2003).

Desta forma, é possível que a secreção cutânea de *P. bicolor* atue também sobre sistema complemento, induzindo a formação dos componentes C3a, C4a e C5a.

No extrato da pele de alguns anfíbios do gênero *Rana,* foram encontrados peptídeos com funções quimiotáticas com ação na degranulação de mastócitos e, dentre estes peptídeos, podemos citar: a Granuliberina-R (*Rana rugosa*); Pipina I, II e III (*Rana pipens*) e o VSCP-1 e VSCP-5 (*Rana erythraea*) semelhantes à crabrolina extraída do veneno de vespas (ERSPAMER, 1987).

O fato das reações de hipersensibilidade do tipo I serem desencadeadas após a fase de sensibilização, na qual anticorpos do tipo IgE são produzidos contra o antígeno (ROITT & DELVES, 2004), experimentos que avaliem os níveis desses anticorpos na circulação dos animais inoculados ou mesmo os sintomas desencadeados após inoculações subseqüentes da secreção, são de fundamental importância. No presente estudo, não foi possível realizar uma segunda inoculação em animais, previamente, sensibilizados pela secreção, portanto, não foram realizados experimentos que avaliassem os efeitos da hipersensibilidade.

Diversos peptídeos encontrados na pele de anfíbios são análogos aos fatores liberadores de hormônio encontrados em mamíferos. A xenopsina encontrada na *Xenopis laevis* que tem semelhança com o hormônio liberador da tirotropina (TRH) (ERSPAMER, 1987), a bombesina encontrada nas espécies de *Bombina sp*. são semelhantes aos fatores de liberação de gastrina e neuromedina B e C (PRATES, 1999).

A sauvagina presente na secreção (ERSPAMER *et al*, 1993) tem estrutura muito semelhante ao fator liberador de corticotropina (CRF/CRH) (PALLI *et al*, 1983), que por sua vez induz a hipófise anterior a secretar o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), o qual flui através do sangue para o córtex da adrenal, induzindo a secreção de glicocorticóides, como a corticosterona.

ERSPAMER (1993) cita que a capacidade de enfrentar situações de estresse, descritas pelo antropólogo Peter Gorman, é decorrente das ceruleínas e sauvaginas presentes na secreção. Além disso, cita que a aplicação da secreção feita pelos índios Matsés por 10-15 dias consecutivos, pode provocar uma ativação persistente do eixo pituitária adrenal pela sauvagina e, ao mesmo tempo, causando os efeitos analgésicos decorrentes da ceruleína.

A Imunoneuroendocrinologia tem despertado a atenção dos pesquisadores quanto ao estudo da relação entre os sistemas imune, nervoso e endócrino, os quais compartilham receptores para citocinas, neurotransmissores e hormônios (MISSIMA, 2005).

BESEDOVSKY & DEL REY (1996) descrevem o efeito imunomodulatório do estresse, relacionando o efeito das interleucinas com a ativação da adrenal, sendo que a IL-1 e a IL-6 estão envolvidas no aumento de ACTH e consequentemente o aumento da corticosterona. A IL-1 e a IL-6 também estão relacionadas com processos pró-inflamatórios, onde a IL-1 é responsável por: estimular a produção de linfócitos T, aumentar a produção de outras citocinas, incluindo a IL-2 e seu receptor, proliferar os linfócitos B, e produzir quimiocinas e ICAM-1 e VCAM-1, responsáveis pela adesão dos leucócitos no endotélio (ROITT & DELVES, 2004).

DHABHAR (2002) postula que durante, os primeiros minutos após o estresse agudo, o número de leucócitos aumenta, porém persistindo o estímulo esse número começa a diminuir e assim permanece. Essa diminuição é devida à redistribuição de leucócitos e imunovigilância. Cessado o estresse, o número de leucócitos retorna ao nível basal pré-estresse, dentro de poucas horas.

É possível que a ação da sauvagina, pela sua grande semelhança com o CRF/CRH, simule uma situação de estresse no organismo e seja responsável pela alteração na quantidade de linfócitos e polimorfonucleares nos primeiros 100 minutos após a inoculação, atingindo a homeostase após 120 minutos. Entretanto, os mecanismos desencadeados pela secreção que levam à estimulação de uma atividade inflamatória, de hipersensibilidade e a atividade endócrina, precisam ser mais bem avaliados para elucidar questões como: a identificação de quais são os agentes inflamatórios da secreção e sua dinâmica, efetuar testes de hipersensibilidade para avaliar uma possível resposta anafilática e verificar a relação entre a imunomodulação dos peptídeos da secreção e o sistema neuro-endócrino.

As dermaseptinas são moléculas catiônicas contendo de 24-33 resíduos aminoácidos que exercem atividade lítica sobre bactérias, protozoários ciliados, leveduras e fungos filamentosos. Atualmente, existem 17 peptídeos da família das dermaseptinas: as DS I – DS V de *P. sauvagii*; as DB I – DB VI de *P. bicolor* e as DD K, DD L, DD M, DD Q1 e DD Q2 de *P. distincta* (PRATES, 1999)

Existem diversos estudos referentes à atividade antimicrobiana das dermaseptinas e seus homólogos sintetizados contra bactérias gram positivas e gram negativas, protozoários, fungos e leveduras (Tabela 4). Entretanto, as doses utilizadas dos peptídeos isolados nos diversos trabalhos são bem menores que as utilizadas neste estudo, possivelmente pelos resíduos aminoácidos hidrofóbicos e da estrutura secundária das dermaseptinas, insolúveis em solução fisiológica.

Tabela 04: Dermaseptinas presentes em diversas espécies de *Phyllomedusa sp.* e a atividade inibitória de bactérias, protozoários, fungos e leveduras.

Microorganismos inibidos	Espécie de *Phyllomedusa*	Autor
Bactérias:		
Acinetobacter calcoaceticus	*P. distincta,* *P. oreades*	BRAND *et al*, 2002
Acholeplasma laidlawii	*P. bicolor*	AMICHE *et al*, 2000
Aeromonas caviae	*P. sauvagii*	MOR *et al*, 1994c, MOR & NICOLAS, 1994d
Bacillus megaterium	*P. bicolor*	AMICHE *et al*, 2000
Corynebacterium glutamicum	*P. bicolor*	AMICHE *et al*, 2000
Enterococcus faecalis	*P. hypochondrialis,* *P. oreades* *P. sauvagii,*	MOR *et al*, 1994c, MOR & NICOLAS, 1994d, LEITE *et al*, 2005
Escherichia coli	*P. bicolor* *P. distincta,* *P. hypochondrialis,* *P. oreades,* *P. sauvagii,* *P. tarsius,*	MOR *et al*, 1994c, MOR & NICOLAS, 1994d, CHARPENTIER *et al*, 1998, PRATES, 1999, FEDER *et al*, 2000, BRAND *et al*, 2002, LEITE *et al*, 2005.
Nocardia brasiliensis	*P. sauvagii*	MOR *et al*, 1994c, MOR & NICOLAS, 1994d
Pseudomonas aeruginosa	*P. bicolor,* *P. distincta,* *P. hypochondrialis* *P. oreades,* *P. sauvagii,* *P. tarsius,*	MOR & NICOLAS, 1994d, CHARPENTIER *et al*, 1998, PRATES, 1999, BRAND *et al*, 2002, LEITE *et al*, 2005
Sinorhizobium meliloti	*P. bicolor*	AMICHE *et al*, 2000
Spiroplasma melliferum	*P. bicolor*	AMICHE *et al*, 2000
Staphylococcus aureus	*P. bicolor,* *P. distincta.* *P. hypochondrialis,* *P. oreades,* *P. sauvagii,* *P. tarsius,*	MOR *et al*, 1994c, MOR & NICOLAS, 1994d, CHARPENTIER *et al*, 1998, PRATES, 1999, BRAND *et al*, 2002, LEITE *et al*, 2005

Microorganismos inibidos	Espécie de *Phyllomedusa*	Autor
Protozoários:		
Leishmania mexicana	*P. sauvagii*	MOR & NICOLAS, 1994d
Trypanosoma cruzi	*P. distincta* *P. oreades,*	BRAND et al, 2002
Plasmodium faciparum	*P. sauvagii*	GHOSH, et al, 1997, KRUGLIAK et al, 2000, EFRON et al, 2002
Fungos:		
Arthroderma simii	*P. sauvagii*	MOR & NICOLAS, 1994d, MOR *et al*, 1994c
Aspergillus sp.	*P. sauvagii*	MOR *et al*, 1994c
Aspergillus fumigatus	*P. sauvagii*	MOR & NICOLAS, 1994d
Aspergillus niger	*P. sauvagii*	MOR & NICOLAS, 1994d, MOR *et al*, 1994c
Microsporum canis	*P. sauvagii*	MOR & NICOLAS, 1994d, MOR *et al*, 1994c
Tricophyton mentagrophytes	*P. sauvagii*	MOR & NICOLAS, 1994d, MOR *et al*, 1994c
Tricophyton rubrum	*P. sauvagii*	MOR & NICOLAS, 1994d, MOR *et al*, 1994c
Leveduras:		
Candida albicans	*P. sauvagii*	MOR & NICOLAS, 1994d, MOR *et al*, 1994c
Cryptococcus neoformans	*P. sauvagii*	MOR & NICOLAS, 1994d, MOR *et al*, 1994c
Saccaromyces cerevisiae	*P. sauvagii*	MOR *et al*, 1994c

7. CONCLUSÃO

→ A secreção cutânea da *Phyllomedusa bicolor*, quando solubilizada em solução fisiológica e administrada pela via subcutânea (2mg/mL), produz um efeito inflamatório agudo no local da inoculação com presença de edema e, posteriormente, um infiltrado de células polimorfonucleares.

→ Alguns mastócitos e eosinófilos encontrados em poucas quantidades sugerem uma discreta hipersensibilidade do tipo1, fazendo-se necessários novos experimentos com animais previamente sensibilizados pela secreção.

→ As diferenças nos perfis eletroforéticos das secreções coletadas em períodos diferentes indicam uma possível degradação das proteínas constituintes no decorrer do tempo.

→ A atividade antibacteriana das amostras da secreção foi constatada, entretanto não superou a atividade dos antibióticos utilizados no experimento. O fato de a secreção estar diluída em solução aquosa, possivelmente, contribuiu com a separação dos peptídeos com atividade antimicrobiana, devido à presença de resíduos aminoácidos hidrofóbicos e de sua estrutura secundária.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMICHE, M.; SAGAN, S.; MOR, A.; DELFOUR, A.; NICOLAS, P. Dermenkephalin (Tyr-D-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp-NH2): a potent and fully specific agonist for the delta opioid receptor - **Mol. Pharmacol**. 35: 774-779, 1989.

AMICHE, M.; SEON, A. A.; WROBLEWSKI, H.; NICOLAS, P. Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family. **Eur. J. Biochem**. 267: 4583 – 4592, 2000.

ANASTASI, A.; BERTACCINI, G.; CEI, J.M.; DE CARO, G.; ERSPAMER, V.; IMPICCIATORE, M. Structure and pharmacological actions of phyllocaerulein, a caerulein-like nonapeptide: its occurrence in extracts of the skin of *Phyllomedusa sauvagei* and related *Phyllomedusa* species. **Br. J. Pharmacol.** 37(1):198-206, 1969.

ANASTASI, A. & ERSPAMER, G.F. Occurrence of phyllomedusin, a physalaemin-like decapeptide, in the skin of *Phyllomedusa bicolor*. **Experientia**. 26 (8): 866-867, 1970.

BARBOSA A. M. **Mecanismo de ação do edema induzido pelo veneno da serpente *Bothrops insulares* (jararaca ilhôa) em camundongos.** São José dos Campos, 2003. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Paraíba, 2003.

BATISTA, C.V.F.; SCALONI, A.; RIGDEN, D.J.; SILVA, R.; ROMERO, A.R.; DUKOR, R.; SEBBEN, A.; TALAMO, F.; BLOCH, C. A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*. **FEBS Letters**. 494: 85-89, 2001.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-endocrine interactions: Facts and hypotheses. **Endocr. Rev.** 17: 64-102, 1996.

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.; BLOCH, C.JR. Dermaseptins from "*Phyllomedusa oreades*" and "*Phyllomedusa distincta*". Anti-"*Trypanosoma cruzi*" activity without cytotoxicity to mammalian cells. **J. Biol. Chem**. 277 (51): 49332-49340, 2002.

CARAMASCHI, U. & C.A.G. da CRUZ. *Phyllomedusa*: posição taxonômica, hábitos e biologia (Amphibia, Anura, Hylidae). **Phyllomedusa**. 1 (1): 5-10, 2002.

CHARPENTIER, S.; AMICHE, M.; MESTER, J.; VOUILLE, V.; CAER, J.P.L.; NICOLAS, P.; DELFOUR, A. Structure, synthesis, and molecular cloning of Dermaseptins B, a family of skin peptide antibiotics **The Journal of Biological Chemistry**. 273 (24): 14690–14697, 1998.

CLARKE, B.T. The natural history of the amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biological Reviews**, 72: 365-379, 1997.

DALY, J.W.; CACERES, J.; MONI, R.W.; GUSOVSKY, F.; MOOS, M.; SEAMON, K., B.; MILTON, K.; MYERS, C. Frog secretions and hunting magic in the upper Amazon: Identification of a peptide that interacts with an adenosine receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci**. USA. 89: 10960 -10963, 1992.

DHABHAR, F.S. Stress-induced augmentation of immune function – the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. **Brain, Behavior, and Immunity.** 16: 785-98, 2002.

DUELLMAN, W.E. & TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1986. 670 p.

EFRON, L.; DAGAN, A.; GAIDUKOV, L.; GINSBURG, H.; MOR, A. Direct interaction of Dermaseptin S4 aminoheptanoyl derivative with intraerythrocytic malaria parasite leading to increased specific antiparasitic activity in culture. **The Journal of Biological Chemistry**. 277 (27): 24067–24072, 2002.

ERSPAMER, V.; ERSPAMER, G.F.; IMPROTA, G.; NEGRI, L.; DE CASTIGLIONE, R. Sauvagine, a new polypeptide *from Phyllomedusa sauvagei* skin. Occurrence in various *Phyllomedusa* species and pharmacological actions on rat blood pressure and diuresis. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol**. 312 (3):265-270, 1980.

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P.; FALCONIERI-ERSPAMER, G.; NEGRI, L.; CORSI, R.; SEVERINI, C.; BARRA, D.; SIMMACO, M.; KREIL, G. Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for delta opioid binding sites. **Proc. Natl. Acad. Sci**. USA. 86: 5188-5192, 1989.

ERSPAMER, V.; ERSPAMER, G.F.; SEVERINI, C.; POTENZA, R.L.; BARRA, D.; MIGNOGNA, G.; BIANCHI, A. Pharmacological studies of 'sapo' from the frog *Phyllomedusa bicolor* skin: a drug used by the Peruvian Matses Indians in shamanic hunting practices. **Toxicon**. 31 (9):1099-1111, 1993.

FAIVOVICH, J.; HADDAD, C.F.B.; GARCIA, P.C.A.; FROST, D.R.; CAMPBELL, J.A.; WHELLER, W.C. Sistematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist**. 294: 1-240, 2005.

FEDER, R.; DAGAN, A.; MOR, A. structure-activity relationship study of antimicrobial Dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**. 275 (6): 4230–4238, 2000.

FLEURY, Y.; VOUILLE, V.; BEVEN, L.; AMICHE, M.; WROBLEWSKI; DELFOUR, A.; NICOLAS, P. Synthesis, antimicrobial activity and gene structure of a novel member of the dermaseptin B family. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1396: 228-236, 1998.

GHOSH, J.K.; SHAOOL, D.; GUILLAUD, P.; CICERON, L.; MAZIER, D.; KUSTANOVICH, I.; SHAI, Y.; MOR, A. Selective cytotoxicity of Dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis. **The Journal of Biological Chemistry.** 272 (50): 31609–31616, 1997.

HADDAD, C.F.B.; POMBAL, J.P.JR.; BATISTIC, R.F. Natural hybridization between diploid and tetraploid species of leaf-frogs, genus *Phyllomedusa* (Amphibia). **J. Herpetol**. 28 (4): 425-430, 1992.

KREIL, G.; BARRA, D.; SIMMACO, M.; ERSPAMER, V.; ERSPAMER, G.F.; NEGRI, L.; SEVERINI, C.; CORSI, R.E.; MELCHIORRI, P. Deltorphin, a novel amphibian skin peptide with high selectivity and affinity for delta opioid receptors. **Eur. J. Pharmacol**. 162: 123-128, 1989.

KRUGLIAK, M.; FEDER, R.; ZOLOTAREV, V.Y.; GAIDUKOV, L.; DAGAN, A.; GINSBURG, H.; MOR, A. Antimalarial activities of Dermaseptin S4 derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 44 (9): 2442–2451, 2000.

LACOMBE, C. CIFUENTES-DIAS, C., DUNIA, I., AUBER-THOMAY, M., NICOLAS, P., AMICHE, M. Peptide secretion in the cutaneous glands of South American tree frog *Phyllomedusa bicolor* : an ultrastructural study. **European Journal of Cell Biology** 79 : 631-641, 2000

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. London: **Nature**. 227: 680-685, 1970.

LAZARUS, L.H.; WILSON, W.E.; DE CASTIGLIONE, R.; GUGLIETTA, A. Dermorphin gene sequence peptide with high affinity and selectivity for delta-opioid receptors. **J. Biol. Chem**. 264 (6): 3047-3050, 1989.

LEITE, J.R.S.A.; SILVA, L.P.; RODRIGUES, M.I.S.; PRATES, M.V.; BRAND, G.D.; LACAVA, B.M.; AZEVEDO, R.B.; BOCCA, A.L.; ALBUQUERQUE, S.; BLOCH JR, C. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides**. 26: 565–573, 2005.

LIMA, E.C.DE. Kampu, kampo, kambô. O uso do sapo-verde entre os Katukina. **Revista do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional.** Rio de Janeiro. 32: 254-267, 2005.

LIMA, E.C.DE & LABATE, B.C. "Remédio da ciência" e "Remédio da Alma": os usos da secreção do kambô (*Phyllomedusa bicolor*) nas cidades. Texto apresentado na **25ª Reunião Brasileira de Antropologia**, Goiânia, UCG e UFG, 11 a 14 de jun. 2006.

LIMA, E.C.DE & LABATE, B.C. A expansão urbana do kampo (*Phyllomedusa bicolor*): notas etnográficas. In: LABATE, B.C.; FIORE, M.; GOULART, S. (orgs). **Drogas: perspectivas em Ciências Humanas**. Campinas: Mercado de Letras, no prelo.

MARTINS, H.M. Os Katukina e o Kampô: **Aspectos etnográficos da construção de um projeto de acesso a conhecimentos tradicionais**. Brasília, 2006. 169p. Dissertação (Mestrado em Antropologia Social) – Programa de Pós-Graduação em Antropologia Social, Universidade de Brasília, 2006.

MISSIMA, F. **Efeito da própolis sobre parâmetros imunológicos de camundongos BALB/c submetidos a estresse crônico**. Botucatu, 2005. 37 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2005.

MONTECUCCHI, P.C., ANASTASI, A.; DE CASTIGLIONE, R.; ERSPAMER, V. Isolation and amino acid composition of sauvagine. An active polypeptide from methanol extracts of the skin of the South American frog *Phyllomedusa sauvagei*. **Int. J. Pept. Protein. Res**. 16 (3):191-199, 1980.

MONTECUCCHI, P.C.; DE CASTIGLIONE, R.; PIANI, S.; GOZZINI, L.; ERSPAMER, V. Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. **Int. J. Pept. Protein. Res**. 17 (3): 275-283, 1981 a.

MONTECUCCHI, P.C.; DE CASTIGLIONE, R.; ERSPAMER, V. Identification of dermorphin and Hyp6-dermorphin in skin extracts of the Brazilian frog *Phyllomedusa rhodei*. **Int. J. Pept. Protein. Res**, 17 (3): 316-321, 1981 b.

MONTECUCCHI, P.C. Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins. **Peptides**. 6 (3):187-195, 1985.

MOR, A.; DELFOUR, A.; SAGAN, S.; AMICHE, M.; PRADELLES, P.; ROSSIER, J.; NICOLAS, P. Isolation of dermenkephalin from amphibian skin, a high-affinity delta-selective opioid heptapeptide containing a D-amino acid residue. **FEBS Lett**. 255 (2): 269-274, 1989.

MOR, A.; AMICHE, M.; NICOLAS, P. Structure, synthesis, and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin. **Biochemistry**. 33 (21): 6642-6650, 1994 a.

MOR, A. & NICOLAS, P. Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. **Eur. J. Biochem**. 219 (1-2):145-154. 1994 b.

MOR, A.; HANI, K.; NICOLAS, P. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but arget specific microorganisms. **The Journal of Biological Chemistry**. 269 (50): 31635-31641, 1994 c.

MOR, A. & NICOLAS, P. The NH_2-terminal a-Helical Doma1i-n1 8 of Dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. **The Journal of Biological Chemistry.** 269 (3): 1934-1939, 1994 d.

NEGRI, L.; ERSPAMER, G.F.; SEVERINI, C.; POTENZA, R.L.; MELCHIORRI, P.; ERSPAMER, V. Dermorphin-related peptides from the skin of "*Phyllomedusa bicolor*" and their amidated analogs activate two μ opioid receptor subtypes that modulate antinociception and catalepsy in the rat. **Proc. Nail. Acad. Sci**. USA. 89: 7203-7207, 1992.

PALLAI, P.V.; MABILIA, M.; GOODMAN, M.; VALE, W.; RIVIER, J. Structural homology of corticotropin-releasing factor, sauvagine, and urotensin I: Circular dichroism and prediction studies. **Biochemistry**. USA. 80: 6770-6774, 1983.

POMBAL, J.P.JR. & HADDAD, C.F.B. Espécies de *Phyllomedusa* do grupo *burmeisteri* do Brasil oriental, com descricão de uma espécie nova (Amphibia, Hylidae). **Rev. Brasil. Biol.** São Paulo. 52 (2): 217-229, 1992.

PRATES, M.V. **Peptídeos Catiônicos de *Phyllomedusa tarsius* (Amphibia): Estrutura e atividade biológica**. Brasília, 1999. 74 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, 1999.

REGOLI, D. & BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacological Reviews**, 32: 1-46, 1980.

RICHTER, K.; EGGER, R.; NEGRI, L.; CORSI, R.; SEVERINI, C.; KREIL, G. cDNAs encoding [D-Ala2] deltorphin precursors from skin of "*Phyllomedusa bicolor*" also contain genetic information for three dermorphin-related opioid peptides. **Proc. Natl. Acad. Sci**. USA. 87: 4836-4839, 1990.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **American Journal of Physiology**. 156: 261-273, 1949.

ROITT, I.M. & DELVES, P.J. **Fundamentos de Imunologia.** 10 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 489 p.

SILVA, L.R.; BATISTA, C.V.F.; PRATES, M.; GORDO, M.; BLOCH JR, C. A new antimicrobial peptide homologous to the dermaseptins isolated from *Phyllomedusa tarsius*. **Abstracts/Toxicon**. 38: 487-595, 2000.

SILVA, W.D. DA & MOTA, I. **Imunologia Básica e Aplicada.** 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 388 p.

SOUZA, M., B. *et al.* Anfíbios. In: CARNEIRO DA CUNHA, M. & ALMEIDA, M. W. B. (orgs). **Enciclopédia da Floresta. O Alto Juruá: práticas e conhecimentos das populações**. São Paulo: Cia. das Letras, 2002. p. 601-614.

STEVENS, C.W. & YAKSH, T.L. Spinal action of dermorphin, an extremely potent opioid peptide from frog skin. **Brain Res.** 385 (2): 300-304, 1986.

8.1. Vídeos:

BIOLOGIE DE LA RAINETTE-SINGE *Phyllomedusa bicolor*. Direção de Mohamed Amiche; Pierre Nicolas. França: C.N.R.S. Diffusion, S.F.R.S. Service du Film de Recherche Scientifique, Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), 1995. 1 DVD (13 min), son., color.

JUNGLE TRIP. Direção de Gavin Searle. Produção de Andrew Palmer. Inglaterra: KEO Films, Channel 4, 2001. 1 DVD (54 min), son., color.

8.2. Internet:

ERSPAMER, V. **Sostanze Bioattive: dalla pelle di un anfibio al cervello di uomo** Accademia Nazionale delle Scienzia. 1987. Disponível em: <http://www.accademiaxl.it/biblioteca/virtuale/Erspamer.htm> Acesso em: 20 nov. 2006.

LABATE, B.C. **O pajé que virou sapo e depois promessa de remédio patenteado.** Comunidade Virtual de Antropologia. 2005. Disponível em: <http://www.antropologia.com.br/colu/colu27.htm>. Acesso em: 30 ago. 2006.

NOGUEIRA, B.T. **Vacinado**. Paraíba: Revista Trip, 2005. Disponível em: <http://revistatrip.uol.com.br//140/viagem/sapo.htm>. Acesso em: 30 ago. 2006.

SBH. **Lista de espécies de anfíbios do Brasil.** Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). 2005. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acesso em: 12 out. 2006.