

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

Camurça, D.M.¹, Santos Jr., M.T.¹, Firmo, C.L.², Bastos, M.F.¹.

1- Laboratório de Biociências – Universidade Guarulhos

2 – CEPPE Centro de Pós-graduação, Pesquisa e Extensão – GEA / Universidade Guarulhos

RESUMO

Foram realizadas análises do perfil eletroforético das proteínas constituintes e da atividade antimicrobiana da secreção. Foram realizadas 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.

INTRODUÇÃO

P. bicolor é um anfíbio da região Amazônica que produz uma secreção cutânea utilizada por povos indígenas devido sua capacidade de aumentar a resistência física, diminuir a sensação de fome e causar analgesia. É composta por diversos peptídeos ativos com grande potencial farmacológico que podem provocar potente efeito vasodilatador e aumento nos níveis de corticosterona. Os efeitos da secreção no sistema imune ainda não foram descritos.

OBJETIVOS

Avaliar o perfil eletroforético das proteínas constituintes, a atividade antibacteriana da secreção, a formação de edema e o infiltrado inflamatório no local da inoculação, investigar alterações na contagem total e diferencial de leucócitos sangüíneos.

METODOLOGIA

A secreção coletada no mês de setembro de 2004 na região do Rio Jordão no estado do Acre foi cedida por José Osair Sales, Siã Huni Kuin, líder da tribo indígena Kaxinawá do Rio Jordão.

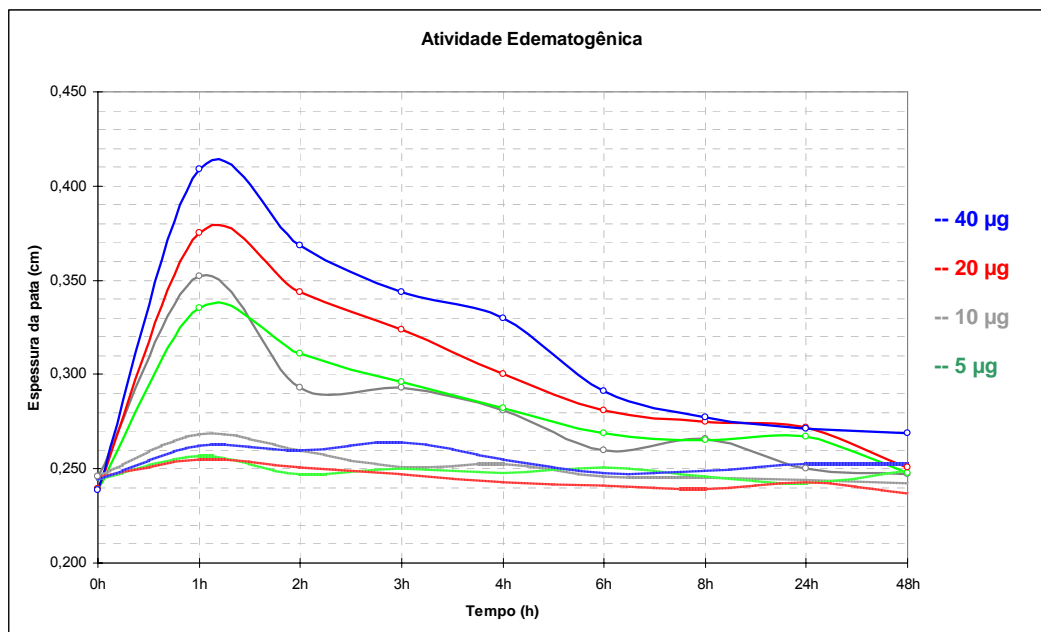
A secreção foi diluída e após dosagem protéica, foi realizada. O perfil de proteínas foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida. Doses de 5,10,20 e 40 μ g foram utilizadas para avaliar a formação de edema no modelo do coxim plantar em camundongos nos períodos de 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 e 48h. Para análise histológica 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 0.5, 1, 2 e 4 μ g sobre *Escherichia coli* ATCC8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

RESULTADOS PRELIMINARES

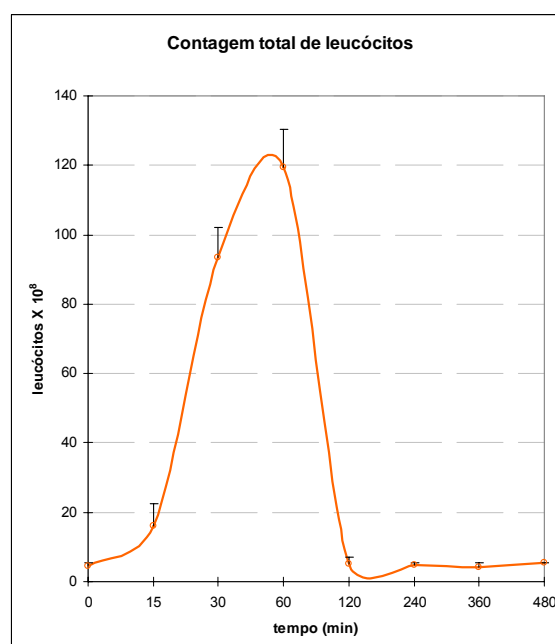
A concentração protéica da secreção utilizada foi de 940 μ g/ml. Proteínas com diferentes massas moleculares foram observadas, sendo que a maior parte apresentava peso molecular inferior à 83-37 kDa 35-14 kDa.



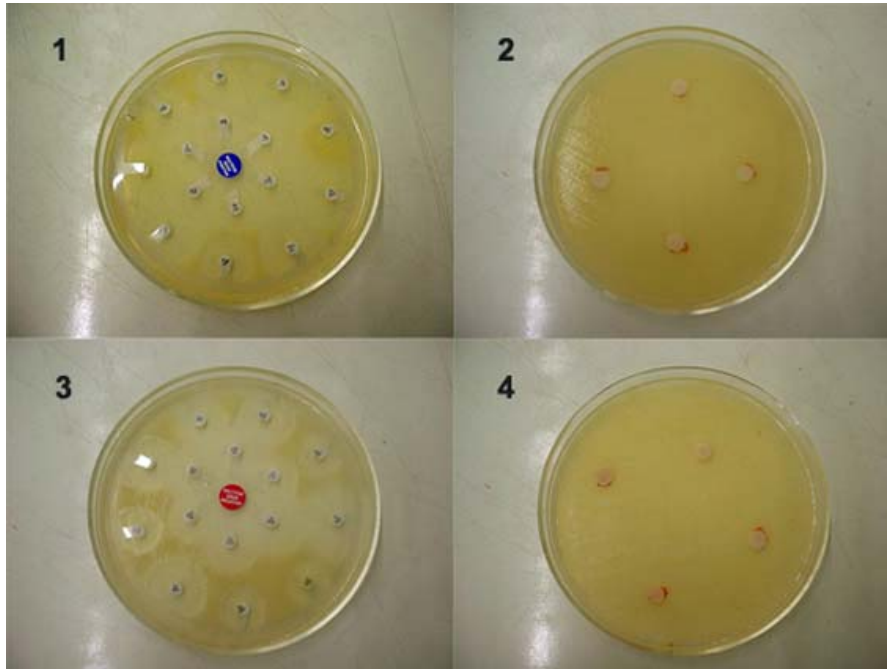
A formação de edema foi observada para todas as doses testadas, sendo que a de 40 μ g causou o maior aumento na espessura da pata (71%) e diferenças significativas foram determinadas para os períodos entre 1 e 6 h ($p < 0,05$).



Aumento significativo no número de leucócitos totais foi observado para os períodos de 30 e 60 min ($p < 0,05$), retornando aos níveis normais após 2h.



Não foi observada atividade antimicrobiana para as doses testadas.
Novos testes estão sendo realizados com uma secreção recém coletada



1- *S. aureus* – controle / 2- *S.aureus* - secreção / 3- *E.coli* – controle / 4 – *E.coli* - secreção

REFERÊNCIAS

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

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. 1992. 89:10960 -10963.

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. 1993. 31 (9):1099-1111.

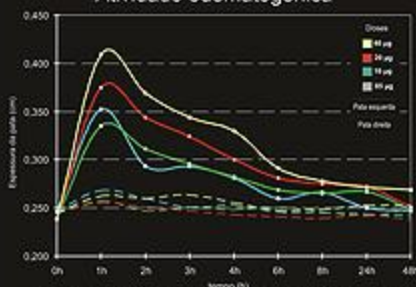
LIMA, E.C.DE & LABATE, B.C. "A expansão urbana do kampo (*Phyllomedusa bicolor*): notas etnográficas". In: LABATE, B.C.; FIORE, M.; GOULART, S. (orgs). Drogas: perspectivas em Ciências Humanas. Mercado de Letras. Campinas. no prelo.

ESTUDO SOBRE ATIVIDADE EDEMATOGENICA, PRO-INFLAMATORIA, ANTIMICROBIANA E PERFIL ELETROFORÉTICO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE *Phyllomedusa bicolor* (Boddart, 1772) (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae)

Camurça, D. M.¹, Santos Jr., M.T.¹, Firmo, C.L.², Bastos, M.F.¹

¹ - Laboratório de Biociências - Universidade Guarulhos / 2 - CEPPE Centro de Pós-graduação Pesquisa e Extensão - GEA/ Universidade Guarulhos

Atividade edematogênica



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: grupo 1 - 5 µg; grupo 2 - 10 µg; grupo 3 - 20 µg; grupo 4 - 40 µg.

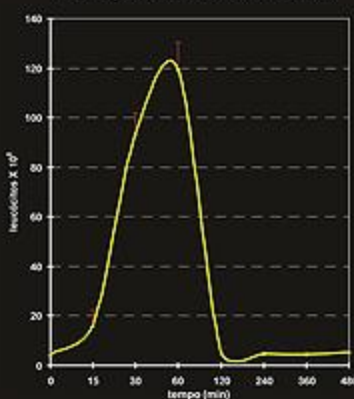
Foi inoculado pela via subcutânea 50 µl de solução contendo as diferentes doses da secreção de *P. bicolor* na pata posterior esquerda de cada animal.

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 marca Manostat modelo 1011.

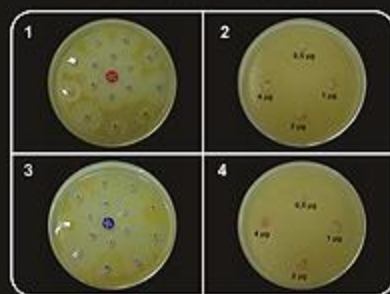
A dose de 40 µg causou um aumento na espessura da pata de 71% e diferenças significativas foram determinadas para os períodos entre 1 e 6 horas (p<0,05).

Contagem total de leucócitos



Os animais inoculados por via subcutânea no coxim plantar com doses de 40 µg da secreção foram sangrados pelo plexo retroorbital após 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480 min da inoculação. Uma amostra de sangue foi imediatamente colocada em um tubo contendo EDTA como anticoagulante e homogeneizada. Em seguida uma alíquota do sangue coletado foi diluída (1:10) em Líquido de Turk e colocada em um hemocitômetro para realização da contagem de leucócitos totais. Os resultados foram expressos em número de células por mililitro de sangue. Pudemos constatar um aumento no número de leucócitos após 15 min retornando à normalidade após 120 min. Diferenças significativas foram determinadas para os períodos entre 30 e 60 min (p<0,05).

Atividade antimicrobiana



As culturas em meio líquido das bactérias *Escherichia coli* (gram negativa) e *Staphylococcus aureus* (gram positiva) foram diluídas em solução salina até a turbidez de 0,5 na escala do MacFarland e semeadas em placas de petri contendo agar Mueller Hinton. Foram introduzidos quatro discos contendo 5 µl da secreção nas seguintes dosagens: 0,5 µg, 1 µg, 2 µg e 4 µg em ambas as placas com as culturas de *E. coli* (2) e *S. aureus* (4). Como controle, foram induzidos discos contendo antibióticos: 15 tipos para gram negativas (1) e 15 tipos para gram positivas (3). Todas as placas foram acondicionadas em uma estufa com temperatura de 37°C por um período de 24h. Não foi observada nenhuma atividade antibacteriana para estas doses, e novos testes com secreções recentemente coletadas serão realizados.

INTRODUÇÃO

Phyllomedusa bicolor é um anfíbio da região Amazônica que produz uma secreção cutânea utilizada principalmente por povos indígenas do tronco lingüístico Pano devido sua capacidade de aumentar a resistência física, diminuir a sensação de fome e causar analgesia. É composta por diversos peptídeos ativos com grande potencial farmacológico que podem provocar potente efeito vasodilatador, e aumento nos níveis de corticosterona. Os efeitos da secreção no sistema imune ainda não foram descritos.

OBJETIVOS

Avaliar o perfil eletroforético das proteínas constituintes, a atividade antibacteriana da secreção, a formação de edema e o infiltrado inflamatório no local da inoculação, investigar alterações na contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos.

MATERIAIS E MÉTODOS

A secreção coletada no mês de setembro de 2004 na região do Rio Jordão - AC foi cedida por José Osair Sales, Sil Huni Kuin, líder da tribo indígena Kaxinawá do Rio Jordão.

Camundongos da linhagem suíça, machos, provenientes do Biotério do Instituto Adolfo Lutz foram utilizados durante os experimentos. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Biociências.

As cepas das bactérias *Escherichia coli* (ATCC8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) provenientes do Instituto Adolfo Lutz foram mantidas no laboratório de microbiologia da UNG (Universidade Guarulhos).

A secreção foi diluída e a dosagem protéica foi realizada. O perfil de proteínas foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida. Doses de 5, 10, 20 e 40 µg 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 h. Para análise histológica 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 0,5, 1, 2 e 4 µg sobre *E. coli* e *S. aureus*.

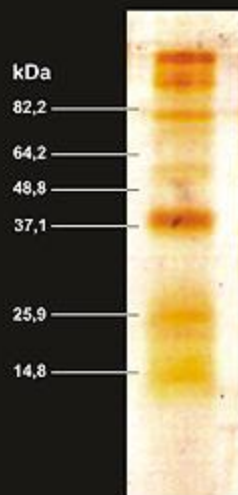
RESULTADOS PRELIMINARES

A concentração protéica da secreção utilizada foi de 940 µg/ml. Proteínas com diferentes massas moleculares foram observadas, sendo que a maior parte apresentava peso molecular entre os intervalos de 82-37 kDa e 35-14 kDa. A formação de edema foi observada para todas as doses testadas, sendo que a dose de 40 µg causou o maior aumento na espessura da pata (71%) e diferenças significativas foram determinadas para os períodos entre 1 e 6 h (p<0,05). Aumento significativo no número de leucócitos totais foi observado para os períodos de 30 e 60 min, retornando aos níveis normais após 2h. Não foi observada atividade antimicrobiana para as doses testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARAMASCHI, U. & DA CRUZ, C.A.G. *Phyllomedusa*: posição taxonômica, hábitos e biologia (Amphibia, Anura, Hylidae). *Phyllomedusa*, 2002, 1(1): 5-10.
- 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*, 1992, 89: 10960-10963.
- 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 Matsigenka Indians in shamanic hunting practices. *Toxicol.*, 1993, 31(9): 1099-1111.
- LIMA, E.C.D.E. & 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*. Mercado de Letras, Campinas, no prelo.

Análise do perfil eletroforético



As amostras da secreção 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, 0,01 TEMED (N,N,N',N'-Tetrametilenoediamina) e 0,05 persulfato de amônio, para o volume final de 10mL. Após a polimerização desse gel, foi preparado o gel de empacotamento contendo acrilamida 3% em tampão 0,1 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,01% TEMED e 0,05% persulfato de amônio, para o volume final de 5mL.

Uma alíquota de aproximadamente 20 µl da secreção foi misturada com o tampão desnatante 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 0,025 M Tris-HCl, contendo 0,19 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 Bench Mark Pro stained protein ladder (Invitrogen).

Proteínas com diferentes massas moleculares foram observadas entre os intervalos de 82-37 kDa e 35-14 kDa, sendo que as mais evidentes apresentavam pesos moleculares aproximados de: 82,2kDa, 50 kDa e 39 kDa.

A utilização tradicional 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. bem como a secreção propriamente dita, sendo "kampe", "kampe", "kapun" as formas mais comuns entre as etnias da família lingüística Pano (Kaxinawá, Katukina, Yawanawá entre outras) e a denominação "kambo" entre os seringueiros e usuários das grandes metrópoles.

Os Achaninkas da família lingüística Azuak conhecem a *Phyllomedusa* 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.



Após a captura, o animal é irritado para incentivar a liberação da secreção (1) que é cuidadosamente retirada com uma pequena espátula de madeira (2) e transferida para uma paleta, também de madeira (3), onde separam a secreção mais forte, coletada da lateral do corpo e a mais fraca, coletada nos apêndices locomotores. Após a retirada da secreção o animal é solto na floresta.

A aplicação da secreção é feita queimando a epiderme com um cipó em brasa, na maioria das vezes é utilizado o cipó *Metopropis flexuosa* (4), retirando a pele da queimadura (5), coletando a secreção previamente hidratada com água ou saliva da espátula de madeira e aplicando sob o ferimento (6).

O número de "pontões" (queimaduras na pele) pode variar muito, os Kaxinawá aplicam a secreção em menor quantidade de 2 a 10 pontos, já os Yawanawá podem aplicar de 50 a 60 pontos e os Katukina 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.

