

Vanessa Aparecida Mendes

**A biologia, as glândulas de veneno e a secreção cutânea da
perereca da caatinga *Corythomantis greeningi*: um estudo
integrativo**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências do
Instituto Butantan, para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2015

Vanessa Aparecida Mendes

A biologia, as glândulas de veneno e a secreção cutânea da perereca da caatinga *Corythomantis greeningi*: um estudo integrativo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ciências do Instituto Butantan, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Marta Maria Antoniazzi

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Mendes, Vanessa Aparecida

A biologia, as glândulas de veneno e a secreção cutânea da perereca da caatinga *Corythomantis greeningi*: um estudo integrativo. Vanessa Aparecida Mendes/ Orientador; Marta Maria Antoniazzi – Instituto Butantan, São Paulo, 2015

94 fls.: il. color. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências - Instituto Butantan.

1. Anura. 2. Caatinga 3. Casque-head 4. Secreção cutânea 5. Tegumento I. Orientador (Antoniazzi, Marta Maria). II. Programa de Pós-Graduação em Toxinologia. Instituto Butantan. III. Título

CDD 615.9

Elaborada com instruções fornecidas pela Biblioteca do Instituto Butantan

São Paulo, 19 de Fevereiro de 2015

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

Eu, Vanessa Aparecida Mendes mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Toxinologia, autorizo a reprodução deste trabalho no site da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo.

Aluna

Vanessa Aparecida Mendes

Orientadora

Dra. Marta Maria Antoniazzi



**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
INSTITUTO BUTANTAN**

**RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO
MESTRADO**

NOME DA ALUNA: Vanessa Aparecida Mendes

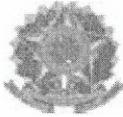
DATA DO EXAME:...../..... /.....

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	ASSINATURA	APROVADO	REPROVADO
_____	_____	()	()
(Presidente)			
_____	_____	()	()
_____	_____	()	()

DECISÃO FINAL: **APROVADO ()** **REPROVADO ()**

Comentários da Banca (opcional):



Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15964-1		Data da Emissão: 08/08/2008 17:58
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2675789	Nome: Marta Maria Antoniazzi	CPF: 107.262.868-69
Nome da Instituição : INSTITUTO BUTANTAN		CNPJ: 61.821.344/0001-56

Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente não exige o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NAO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	FAMILIA	Brachycephalidae, Bufonidae, Hylidae, Dendrobatidae, Pipidae, Caeciliidae, Leptodactylidae, Microhylidae
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	INSTITUTO BUTANTAN	coleção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 91789725





COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

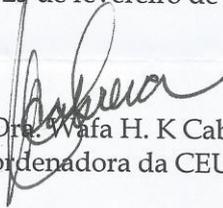
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "A biologia, as glândulas de veneno e a secreção cutânea da perereca da caatinga *Corythomantis greeningi*: um estudo interativo", protocolo n° 1006/13, sob a responsabilidade de Marta Maria Antoniazzi, Carlos Alberto Gonçalves Silva Jared e Vanessa Aparecida Mendes - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 20/02/2013.

Vigência do Projeto:	N° de animais/espécie
03/2013 - 02/2015 Laboratório de Biologia Celular	30 anfíbios <i>Corythomantis greeningi</i> adultos, 35-50g(M,F); 606 camundongos Swiss, 18-20g(M)

São Paulo, 25 de fevereiro de 2013


Dra. Wafa H. K. Cabrera
Vice-Coordenadora da CEUAIB



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

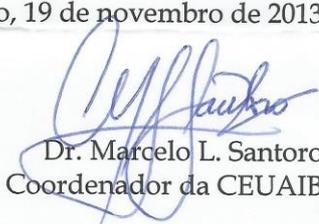
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "A biologia, as glândulas de veneno e a secreção cutânea da perereca da caatinga *Corythomantis greeningi*: um estudo interativo", protocolo nº 1006/13, sob a responsabilidade de Marta Maria Antoniazzi e Carlos Alberto Gonçalves Silva Jared, Vanessa Aparecida Mendes - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/11/2013.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
03/2013 - 02/2015 Laboratório de Biologia Celular	30 anfíbios <i>Corythomantis greeningi</i> adultos, 35-50g(M,F); 606 camundongos Swiss, 18-20g(M)	Alteração de protocolo experimental

São Paulo, 19 de novembro de 2013


Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

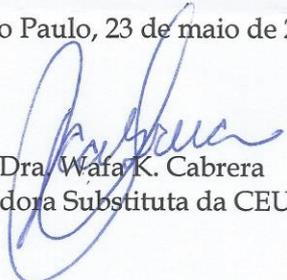
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "A biologia, as glândulas de veneno e a secreção cutânea da perereca da caatinga *Corythomantis greeningi*: um estudo integrativo", protocolo nº 1006/13, sob a responsabilidade de Marta Maria Antoniazzi e Carlos Alberto Gonçalves Silva Jared, Vanessa Aparecida Mendes - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 21/5/2014.

Vigência do Projeto: 03/2013 - 02/2015	Nº de animais/espécie	Observação
Laboratório de Biologia Celular	120 camundongos Swiss, 18-20g (M) - adicional; 30 anfíbios <i>Corythomantis greeningi</i> adultos, 35-50g (M,F); 606 camundongos Swiss, 18-20g (M)	Adicional de animais

São Paulo, 23 de maio de 2014


Dra. Wafa K. Cabrera

Coordenadora Substituta da CEUAIB

À minha família, que nas lutas da vida são meus pilares; nas derrotas, meus ombros consoladores; e nas vitórias, meus mais ardentes torcedores. O estímulo e carinhos de vocês foram essenciais nesta vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha orientadora Dra. Marta Maria Antoniazzi, pela constante orientação, pelas longas conversas, risadas e ensinamentos que me fizeram refletir e crescer pessoal e profissionalmente.

Ao Dr. Carlos Jared, Diretor do Laboratório de Biologia Celular, por ter me dado a oportunidade de me inserir no universo da pele e das secreções cutâneas dos anfíbios.

Ao Dr. Daniel Carvalho Pimenta e a Dra. Juliana Mozer Sciani pela ajuda essencial na caracterização bioquímica da secreção estudada e pelas constantes conversas e sugestões que tornaram esse trabalho cada vez melhor.

À Dra. Katia Cristina Barbaro pela colaboração na realização dos testes *in vivo* das atividades edematogênica e nociceptiva, pelas constantes conversas, apoio e sugestões para melhoria do trabalho.

À Dra. Cecília Mari Abe pela colaboração, pelos ensinamentos e constante ajuda na realização dos testes antimicrobianos.

À Dra. Ruth Camargo Vassão pela colaboração e pelos ensinamentos e na realização dos testes de citotoxicidade.

Aos amigos do laboratório Biologia Celular em especial a Simone Gonçalves Silva Jared, Roberta Fiusa Magnelli, Jéssica Milena da Silva, Patrícia Valoto e Ricardo Alexandre de Souza por toda ajuda, pelas conversas descontraídas, risadas, conselhos, enfim pela amizade.

Aos grandes amigos Pedro Luis Mailho Fontana, Bianca de Carvalho Liba Fernandes Távora, Louise Faggionato Kimura Vieira, José Pedro Prezoto Neto e Gabriela Arezo por toda ajuda na realização de alguns experimentos, pelas sugestões, conselhos, conversas e pela amizade.

Aos pesquisadores, técnicos e funcionários dos Laboratórios de Biologia Celular, Imunopatologia e Bacteriologia que de uma forma ou outra ajudaram na realização desse trabalho.

Agradeço imensamente aos meus pais Lenice e Aristeu, que sempre me apoiaram e cujo incentivo aos estudos são e sempre serão os principais motivos pelos quais sigo minha carreira.

À minha querida irmã Maria Gisele, por todo o carinho, pelos exemplos a serem seguidos, pelo infinito apoio e pela amizade.

À minha querida amiga Lívia Corrêa pelas conversas e conselhos nos momentos difíceis, pelas inúmeras risadas e pelo companheirismo, enfim muito obrigada pela amizade.

Às minhas queridas amigas de moradia Sabrina, Flávia, Carol, Amanda e Jéssica pelas conversas descontraídas, pelos conselhos, companheirismo e amizade.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Ao apoio financeiro da CAPES, FAPESP, INCTTOX e Programa de Pós-Graduação em Toxinologia do Instituto Butantan.

Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

(Clarice Lispector)

Resumo

Mendes, Vanessa Aparecida. A biologia, as glândulas de veneno e a secreção cutânea da perereca da caatinga *Corythomantis greeningi*: um estudo integrativo. 2015. 94 f. Dissertação (Ciências). Instituto Butantan, São Paulo, 2015.

Corythomantis greeningi (Cg) é uma espécie de anuro endêmica da caatinga brasileira, que possui uma cabeça co-ossificada com o crânio ("casque head"), utilizada como tampa quando o animal penetra de ré em pequenas frestas, protegendo-se contra predadores e contra a dessecação, em um comportamento denominado fragmose. Apesar de sua pele já ter sido relativamente bem estudada por nosso grupo, detalhes morfológicos e as características bioquímicas e farmacológicas de sua secreção cutânea não são ainda conhecidos. Esse trabalho objetiva, assim, preencher essa lacuna. Para tanto, fragmentos de pele dorsal, ventral e inguinal foram processados para histologia e microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV). Para os estudos bioquímicos a secreção cutânea foi analisada por SDS-PAGE, RP-HPLC e espectrometria de massas. A secreção bruta e suas principais frações foram testadas quanto às atividades nociceptiva e edematogênica em modelo murino, e quanto à citotoxicidade e ao efeito antitumoral em culturas celulares de melanoma murino (B16F10) e fibroblasto murino (L929). Os resultados mostram que a superfície da pele examinada ao MEV possui um claro dimorfismo sexual, onde o macho apresenta o dorso com inúmeras espículas córneas, enquanto a fêmea possui pele mais lisa. A superfície da pele de todas as regiões apresenta micro-projeções epidérmicas que são mais proeminentes nas regiões ventral e inguinal. Essas projeções formam uma rede de canais intercomunicantes que pode favorecer a captação de água. Em ambos os sexos a superfície da pele da região inguinal, apresenta verrugas hidrofílicas proeminentes, associadas a uma extensa rede capilar e à ausência de camada calcificada; em conjunto, essas características devem facilitar a captação de água do substrato. Em relação às glândulas cutâneas, foram observados dois tipos de glândulas acinosas mucosas, e um tipo de glândula de veneno sincicial, abundante principalmente na região dorsal, mais susceptível ao ataque de predadores. A forma dos grânulos de veneno examinados ao MET revelaram uma estrutura complexa, formada por

diversos compartimentos com eletrodensidades distintas. As análises bioquímicas revelaram abundância de proteínas em todas as faixas de massa molecular principalmente na faixa de 55 a 30 kDa. Já por LC-MS verificou-se abundância de moléculas de baixo peso (200 a 500 Da) compatíveis com massas de alcalóides e esteróides. Foi observada atividade enzimática positiva da secreção para metalopeptidases, bem como cisteínopeptidase e negativa para serinopeptidases, além de terem apresentado atividade hialuronidásica e fibrinogenolítica. A secreção cutânea foi capaz de induzir edema em todas as doses, perdurando na maioria delas até 96 horas após a injeção, além de mostrar-se altamente nociceptiva em todas as doses utilizadas. Os testes com as frações isoladas mostraram que várias delas possuem a capacidade de induzir tanto atividade edematogênica como nociceptiva, porém, com diferentes níveis de intensidade. Além disso, observamos que houve uma maior inibição do crescimento celular na linhagem B16F10 do que em L929, sendo as doses efetivas (IC50) 4,6 µg/mL e 11,9 µg/mL, respectivamente. Esses resultados evidenciam uma possível atividade antitumoral.

Palavra-chave: Anura, Caatinga, *casque-head*, tegumento, morfologia, secreção cutânea e atividades biológicas.

Abstract

Mendes, Vanessa Aparecida. Biology, poison glands and skin secretion of the tree frog of the caatinga *Corythomantis greeningi*: an integrative study. 2015. 94 p. Dissertation (Science). Instituto Butantan, São Paulo.

Corythomantis greeningi (Cg) is an endemic anuran species of the Brazilian Caatinga, which has a co-ossified head with the skull (casque-head), used as cover when the animal enters backwards in small crevices, as a defense against predators and/or desiccation, in a behavior known as fragmosis. Although the skin of this species has already been relatively well studied by our group, its morphological details and the biochemical and pharmacological characteristics of its cutaneous secretion are not yet known. Thus, this work aims to fill this gap in the knowledge of this species. Dorsal, ventral and inguinal skin fragments were processed for histology and transmission (TEM) and scanning (SEM) electron microscopy. For biochemical studies the skin secretion was analyzed by SDS-PAGE, RP-HPLC and mass spectrometry. Crude secretion and its main fractions were tested for nociceptive and edema activities in mice, and for cytotoxicity and antitumor effects in cell cultures of murine melanoma (B16F10) and murine fibroblasts (L929). The results show that the surface of the skin examined by SEM has a clear sexual dimorphism, with males presenting numerous cornified spicules in the dorsum, while the females have smoother skin in this region. The skin surface in all body regions presents epidermal micro-projections which are more prominent in the ventral and inguinal regions. These projections form a network of interconnecting channels that may facilitate the uptake of water. In both genders the skin surface of the inguinal region, has prominent hydrophilic warts associated with an extensive capillary network and the absence of calcified layer; together, these features may facilitate the uptake of the substrate water. Regarding the skin glands two types of acinar mucous glands and one type of venom syncytial gland were observed. This latter gland type is particularly abundant in the dorsal region, which is more susceptible to the attack of predators. The venom granules examined by TEM showed a complex structure comprised of several distinct compartments with different electron densities. The biochemical analyzes revealed that the secretion is plenty of protein in all molecular

mass bands mainly in the range 55-30 kDa. When analyzed by LC-MS it shows many low weight molecules (200 to 500 Da) with masses consistent with alkaloids and steroids. The crude secretion also showed to be positive for the presence of metallopeptidases and cysteine peptidase and negative for serine peptidases. The crude skin secretion was able to induce edema in all doses tested, most of them lasting 96 hours after injection, and was highly nociceptive in all tested doses. Tests with the isolated fractions showed that several of them have the ability to induce edema activity as either nociceptive, but with different intensity levels. In addition, we observed a greater inhibition of cell growth in the B16F10 lineage than in L929 lineage, with the effective doses (IC50) of 4.6 mg/mL and 11.9 mg/mL, respectively. These results showed a possible antitumor activity in *Cg* skin secretion.

Keywords: Anura, Caatinga, *casque-head*, integument, morphology, skin secretion and biological activities

Lista de Figuras

Figura 1. Representantes das três ordens que compõem a classe Amphibia.....	22
Figura 2. Esquema representando o tegumento dos anfíbios.....	23
Figura 3. <i>Corythomantis greeningi</i>	28
Figura 4. Comportamento fragmótico de <i>Corythomantis greeningi</i>	29
Figura 5. Acúmulos glandulares da região da boca.....	44
Figura 6. Corte histológico mostrando da pele dorsal.....	45
Figura 7. Corte histológico da pele dorsal mostrando os dois tipos de glândulas mucosas.....	46
Figura 8. Corte histológico da glândula granulosa.....	46
Figura 9. Histoquímicas da pele da região dorsal.....	47
Figura 10. Histoquímica da pele da região dorsal por von Kossa.....	48
Figura 11. Histologia comparando a pele dorsal de machos e fêmeas.....	48
Figura 12. Histologia comparando as regiões dorsal, ventral e inguinal.....	49
Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão das glândulas mucosas (Gm1). 50	
Figura 14. Microscopia eletrônica de transmissão das glândulas mucosas (Gm2). 51	
Figura 15. Microscopia eletrônica de transmissão da glândula granulosa.....	52
Figura 16. Microscopia eletrônica de transmissão da camada calcificada.....	52
Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura da pele dorsal de fêmea e macho. 53	
Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura do poro de glândula granulosa.....	54
Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura das microprojeções epidérmicas da pele das regiões dorsal, inguinal e ventral.....	54
Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura em maior aumento das microprojeções epidérmicas da região inguinal.....	55
Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura da região inguinal.....	55
Figura 22. SDS-PAGE 12% da secreção cutânea bruta.....	56
Figura 23. Perfil cromatográfico da secreção cutânea por RP-HPLC.....	57
Figura 24. Perfil cromatográfico com detecção por espectrometria de massas (TIC) da secreção cutânea bruta.....	58
Figura 25. Integração de 0,7 a 1,5 min.....	58
Figura 26. Integração de 5 – 5,7 min.....	58

Figura 27. Integração de 5,7 – 6,2 min.....	58
Figura 28. Integração de 6,2 – 6,7 min.....	59
Figura 29. Integração de 6,7 – 7 min.....	59
Figura 30. Integração de 7 – 7,3 min.....	59
Figura 31. Integração de 7,3 – 7,7 min.....	59
Figura 32. Integração de 7,7 – 7,9 min.....	60
Figura 33. Representação das massas (m/z) dos compostos da fração 1.....	60
Figura 34. Representação das massas (m/z) dos compostos da fração 2.....	61
Figura 35. Representação das massas (m/z) dos compostos da fração 2b.....	61
Figura 36. Representação das massas (m/z) dos compostos da fração 3.....	62
Figura 37. Representação das massas (m/z) dos compostos da fração 4.....	62
Figura 38. Representação das massas (m/z) dos compostos da fração 5.....	63
Figura 39. Representação das massas (m/z) dos compostos da fração 6/7.....	63
Figura 40. Representação das massas (m/z) dos compostos da fração 8.....	63
Figura 41. Representação das massas (m/z) dos compostos da fração 9.....	64
Figura 42. Representação das massas (m/z) dos compostos da fração 10.....	64
Figura 43. Atividade enzimática da secreção bruta com substratos fluorogênicos..	66
Figura 44. Zimografia para atividade caseinolítica, gelatinolítica, fibrinogenolítica e hialuronidásica da secreção bruta.....	66
Figura 45. Atividade edematogênica induzida pela secreção bruta.....	67
Figura 46. Atividade edematogênica induzida pelas frações.....	68
Figura 47. Atividade nociceptiva induzida pela secreção bruta.....	69
Figura 48. Atividade nociceptiva induzida pelas frações.....	70
Figura 49. Atividade citotóxica da secreção bruta.....	71
Figura 50. Curva de inibição de crescimento celular causado pela secreção cutânea bruta.....	71

Sumário

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Estrutura do tegumento dos anfíbios	23
1.2. A secreção cutânea dos anuros	25
1.3. <i>Corythomantis greeningi</i>	28
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAS E MÉTODOS	32
3.1. Animais, extração das amostras histológicas e obtenção da secreção cutânea	32
3.2. Técnica histológica	32
3.3. Estudo histoquímico	33
3.4. Fotomicrografias	35
3.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	35
3.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
3.7. Preparação da secreção e frações utilizadas na determinação das atividades biológicas	36
3.8. Estudo bioquímico da secreção	36
3.8.1. Perfil do HPLC e purificação das moléculas	36
3.8.2. Perfil eletroforético unidimensional	37
3.8.3. Espectrometria de massa	37
3.8.4. Ensaio de atividade peptidásica	38
3.8.5. Determinação das atividades caseinolítica, gelatinolítica e fibrinogenolítica.....	38
3.8.6. Determinação da atividade hialuronidásica	39
3.9. Ensaio de atividades biológicas	39
3.9.1. Avaliação da atividade edematogênica	39

3.9.2.	Avaliação da atividade nociceptiva	40
3.9.3.	Manutenção de cultura de células e ensaios de citotoxicidade em fibroblastos e melanoma murino	40
3.9.4.	Avaliação da viabilidade celular	41
3.9.5.	Avaliação da atividade antimicrobiana	41
3.10.	Análises estatísticas	42
4.	RESULTADOS	44
4.1.	Estudo morfológico do tegumento de <i>Corythomantis greeningi</i> (Cg) ..	44
4.1.1.	Histologia e histoquímica da pele	44
4.1.2.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	50
4.1.3.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	53
4.2.	Estudo da secreção cutânea bruta	56
4.2.1.	Perfil eletroforético unidimensional (SDS-Page)	56
4.2.2.	Perfil do HPLC e espectrometria de massa da secreção bruta de Cg ..	56
4.2.3.	Espectrometria de massas das frações obtidas da secreção Cg	60
4.2.4.	Ensaio de atividades peptidásicas e enzimáticas	64
4.3.	Estudo das atividades tóxicas geradas pela secreção cutânea bruta de Cg	67
4.3.1.	Atividade edematogênica	67
4.3.2.	Atividade nociceptiva	68
4.3.3.	Viabilidade celular e atividade antitumoral	70
4.3.4.	Atividade antimicrobiana	72
5.	DISCUSSÃO	73
6.	CONCLUSÕES	83
7.	REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

Os representantes da classe Amphibia foram os primeiros vertebrados a conquistar o ambiente terrestre. Os labirintodontes surgiram a cerca de 390 milhões de anos e são considerados os primeiros representantes da classe Amphibia (DUELLMAN; TRUEB, 1986; RETALLACK, 2011). Atualmente são conhecidas 7.244 espécies de anfíbios que estão alocados na Sub-classe Lissamphibia, que é composta por três ordens distintas: Anura (sapos, rãs e pererecas), Urodela (salamandras e tritões) e Gymnophiona (cecílias ou cobras-cegas) (Fig. 1) (ZARDOYA; MEYER, 2001; POUGH et al., 2002; FROST, 2014).



Figura 1 - Representantes das três ordens que compõem a classe Amphibia. A) *Salamandra salamandra* (Urodela). Fonte: http://www.naturephoto-cz.com/salamandra-de-fogo-picture_pt-8295.html; B) *Rhinella schneideri* (Anura). Fonte: http://www.animalia.xpg.com.br/fotos/anfibios/Bufo/Bufo_schneideri.html; C) *Siphonops annulatus* (Gymnophiona). Foto: Carlos Jared.

Os anfíbios são animais ectotérmicos, que possuem pele úmida e permeável apresentando respiração pulmonar e/ou cutânea e branquial. Por esse motivo, os anfíbios apresentam grande dependência da água, principalmente no período reprodutivo. A ausência de escamas, penas ou pelos na pele torna esses animais muito susceptíveis à dessecação. Tal característica, no entanto, favoreceu o aparecimento de adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais peculiares, que permitiram uma colonização cosmopolita, desde os desertos até ambientes gelados do Ártico (BENTLEY, 1966; DUELLMAN; TRUEB, 1986; STEBBINS; COHEN, 1995; WARBURG, 1997; TRACY et al., 2010).

O tegumento dos anfíbios é considerado a interface morfo-funcional entre o organismo e o ambiente, estando envolvido em diversos processos fisiológicos como osmorregulação, respiração cutânea, defesa química, proteção mecânica, proteção contra perda excessiva de água pela pele, reprodução e recepção sensorial (ZUG, 1993; FOX, 1994; STEBBINS; COHEN, 1995; BRITO-GITIRANA; AZEVEDO, 2005; TRACY et al., 2010). Muitas destas funções estão associadas à presença de glândulas cutâneas, responsáveis pela secreção de muco e de toxinas (STEBBINS; COHEN, 1995).

1.1. Estrutura do tegumento dos anfíbios

O tegumento dos anfíbios é um órgão complexo muito organizado, apresentando diferentes tipos celulares e variados componentes extracelulares (DUELLMAN; TRUEB, 1986). Ele é composto por uma epiderme de origem ectodérmica e, abaixo dela, pela derme de origem mesodérmica, que se divide em estrato esponjoso e estrato compacto (PATT; PATT, 1969; FOX, 1986; ZUG, 1993; FOX, 1994) (Fig. 2).

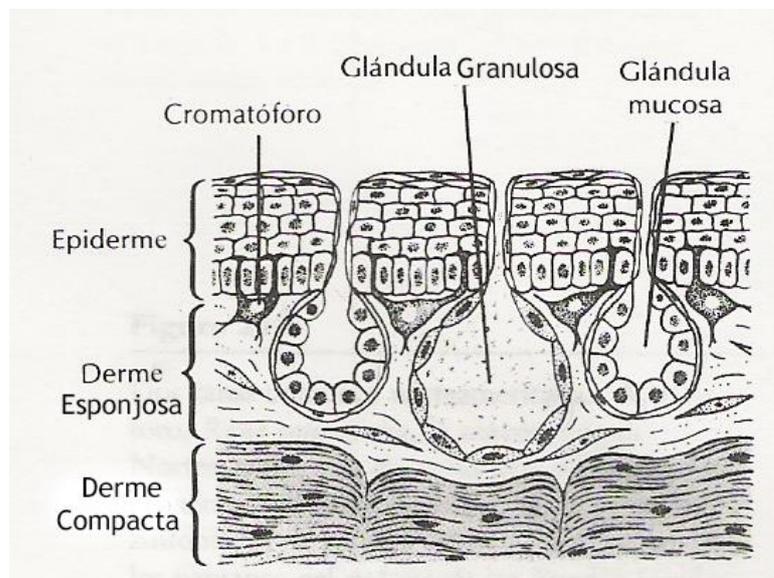


Figura 2 - Esquema representando o tegumento dos anfíbios composto por epiderme, derme esponjosa e derme compacta, além das células pigmentares e das glândulas características. Fonte: Duellman; Trueb, 1986.

A epiderme de origem ectodérmica geralmente apresenta quatro ou cinco camadas de células, sendo formada pelo estrato córneo (mais externo), estrato granuloso, estrato espinhoso e o estrato germinativo (mais profundo) (FOX, 1986; FOX, 1994; BRITO-GITIRANA; AZEVEDO, 2005; FELSEMBURGH et al., 2009). Essa última camada se apóia sobre a lâmina basal, que separa o epitélio da derme subjacente, e é responsável por originar todas as outras camadas epiteliais (FOX, 1986, FOX 1994; ZUG, 1993).

Abaixo da epiderme está localizada a derme, de origem mesodérmica, que se apresenta dividida em estrato esponjoso e estrato compacto (DUELLMAN; TRUEB, 1986; FOX, 1994; STEBBINS; COHEN, 1995). A derme esponjosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo associado a fibras intercalares, abrigando uma camada de cromatóforos (xantóforos, iridóforos e melanóforos), glândulas cutâneas, geralmente granulosas e mucosas bem como vasos sanguíneos (BAGNARA, 1986; FROST-MASON et al., 1994; STEBBINS; COHEN, 1995). O estrato compacto é constituído de tecido conjuntivo denso modelado associado a fibras colágenas (FOX, 1994; STEBBINS; COHEN, 1995). Imediatamente abaixo do estrato compacto localiza-se a tela subcutânea, composta de tecido conjuntivo frouxo, onde se situam principalmente os vasos sanguíneos e nervos (PATT; PATT, 1969; FOX, 1994).

De todas as características cutâneas dos anfíbios, talvez a mais significativa seja a presença de glândulas na derme, já que representa uma sinapomorfia da classe Amphibia. Tais glândulas desempenham inúmeras funções na manutenção da homeostase desses animais agindo na produção de toxinas contra predadores e microrganismos, osmorregulação, reprodução e respiração cutânea (PFENNING, 1990; BRUNETTI et al., 2012).

Os anfíbios anuros apresentam dois tipos fundamentais de glândulas: as mucosas e as granulosas ou de veneno (TOLEDO; JARED, 1995). As glândulas mucosas estão associadas à síntese de mucopolissacarídeos, que são liberados na superfície do corpo (LENZI-MATTOS et al., 2005). Essas glândulas apresentam uma ampla distribuição pelo corpo e são usualmente acinosas, pequenas e muito numerosas em relação às glândulas granulosas (DELFINO et al., 1998; LENZI-MATTOS et al., 2005; BRUNETTI et al., 2012). A porção secretora é geralmente composta por um epitélio cubóide ou colunar que é responsável pela síntese das secreções mucosas (FOX, 1994). O muco é secretado constantemente na superfície

do corpo, formando uma camada úmida sobre a pele e facilitando o processo de difusão de gases, essencial para a respiração cutânea da maioria desses animais (TOLEDO; JARED, 1995).

As glândulas granulosas são responsáveis pela defesa passiva dos anfíbios (LUTZ, 1966; DUELLMAN; TRUEB, 1986) contra predadores e microrganismos. Atuam através da produção de toxinas constituídas por diversas classes de componentes (PIRES Jr. et al., 2002; MACIEL et al., 2003; MORTARI et al., 2004; PIRES Jr. et al., 2005; CONCEIÇÃO et al., 2006; PRATES et al., 2012). Diferentemente das mucosas, as glândulas granulosas dos anfíbios anuros constituem-se em um sincício secretor de grandes proporções, que produz grânulos esféricos e heterogêneos que se acumulam em seu interior (DELFINO et al., 1996; DELFINO et al., 1998; DELFINO et al., 1999; DELFINO et al., 2001a, b; DELFINO et al., 2006; PRATES et al., 2012).

Tanto as glândulas mucosas como as granulosas são alveolares e envolvidas por uma camada de células mioepiteliais que auxiliam na liberação do material sintetizado (TOLEDO; JARED, 1995; DELFINO et al., 1998; DELFINO et al., 1999; DELFINO et al., 2006).

Na derme de muitas espécies de anuros, encontra-se também a camada de Eberth-Kastchenko ou camada calcificada, localizada entre o estrato esponjoso e o estrato compacto. Essa camada é formada por depósitos globulares de fosfato de cálcio (hidroxiapatita) e proteoglicanas (JARED et al., 1995; KATCHBURIAN et al., 2001), cuja função ainda não está bem elucidada, mas é bem possível que constitua uma barreira eficiente contra a dessecação. Outras possibilidades são que essa camada sirva como reserva de cálcio para o animal e, em função da resistência mecânica que oferece, atuem ainda como uma estrutura protetora contra predadores (TOLEDO; JARED, 1993a, b, c; KATCHBURIAN et al., 2001).

1.2. A secreção cutânea dos anuros

A pele dos anfíbios tem sido fonte de uma grande variedade de substâncias com atividade biológica, entretanto são ainda relativamente poucas as espécies que já foram analisadas sob essa perspectiva (ERSPAMER, 1994; DALY, 1995; SAPORITO et al., 2008; CONLON et al., 2014).

A secreção produzida pelas glândulas cutâneas está diretamente envolvida na proteção contra predadores e patógenos. A estimulação adrenérgica provoca a contração das células mioepiteliais ocorrendo à liberação do conteúdo glandular na superfície do corpo (TOLEDO; JARED, 1995; CONLON et al., 2004). Além disso, a liberação da secreção dos acúmulos glandulares, como as parotóides dos sapos, depende de pressão mecânica externa, como por exemplo, a mordida de um predador. Por este motivo, a estratégia de defesa adotada pela maioria dos anuros é caracterizada como defesa passiva (JARED et al., 2009; MAILHO-FONTANA et al., 2014). Entretanto, recentemente, Mailho-Fontana e colaboradores (2014) estudaram o tegumento e as parotóides do sapo amazônico *Rhaebo guttatus*, a única espécie de anuro conhecida, até o momento, que é capaz de ejetar a secreção das parotóides voluntariamente, caracterizando, assim, um tipo de defesa ativa.

A utilização de venenos como defesa química é comum na natureza. De maneira geral, todos os anfíbios apresentam glândulas granulosas na pele (TOLEDO; JARED, 1995), que exercem efeitos tóxicos por meio de contato com mucosas ou fluxo sanguíneo (TOLEDO; JARED, 1995; LIBÉRIO, 2008; MAILHO-FONTANA et al., 2014). O conteúdo das glândulas granulosas varia muito dependendo do grupo e da espécie (DALY; WITKOP, 1966; DALY et al., 1987, DALY, 1995; TOLEDO; JARED, 1995). Dentre os compostos biologicamente ativos podem ser encontrados aminas biogênicas, esteróides, alcalóides, peptídeos e proteínas. Nessas substâncias já foram descritas, dentre outras, as ações antibiótica, neurotóxica, convulsivante, cardiotóxica e alucinógena (DALY; WITKOP, 1966; DALY et al., 1987; ERSPAMER et al., 1994; TOLEDO; JARED, 1995; PRATES; BLOCH Jr, 2000; RINALDI, 2002; CONCEIÇÃO et al., 2006, CONCEIÇÃO et al., 2007a, b, c; TEMPONE et al., 2007, TEMPONE et al., 2008; CONCEIÇÃO et al., 2009). Essas toxinas geralmente são de origem endógena, sendo sintetizadas pelo metabolismo do próprio animal (MAILHO-FONTANA et al., 2014). Entretanto, existem espécies, como as da família *Dendrobatidae* que possuem secreção altamente tóxica devido à presença de alcalóides que são sequestrados e incorporados a partir da dieta (DALY, 1995; DALY, 2003; SAPORITO et al., 2008; HANTAK et al., 2013).

A composição da secreção evoluiu independentemente nos diferentes grupos de anfíbios de acordo com a sua interação com o meio ambiente. Peptídeos com

atividade antimicrobiana apresentam um importante papel na imunidade inata que constitui a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, além de serem importantes para a angiogênese, reparo tecidual e processo inflamatório (IZADPANA; GALLO, 2005; LIBÉRIO, 2008). Alguns exemplos desses peptídeos são as bradicininas, bombesinas, dermofinas e angiotensinas (ERSPAMER, 1994; BARRA; SIMMACO, 1995; LIBÉRIO, 2008).

A maioria dos peptídeos antimicrobianos de anuros estudados até o momento foi isolada de espécies pertencentes às famílias *Hylidae*, *Ranidae* e *Leptodactylidae*. A interação dos peptídeos com as membranas de microorganismos ou células tumorais ocasiona na grande maioria das vezes desequilíbrio osmótico levando à lise celular (HANCOCK; CHAPPLE, 1999; ZASLOFF, 2002; LIBÉRIO, 2008).

Além dos peptídeos, a secreção da maioria das espécies de híldeos possui uma variedade de esteróides, alcalóides e proteínas que no geral estão associadas às propriedades tóxicas da secreção. Os esteróides, geralmente são cardiotoxicos provocando taquicardia e produzidos a partir do metabolismo do colesterol (HABERMEHL, 1981; Mailho-Fontana *et al.*, 2014) e as aminas biogênicas são produzidas através da descarboxilação de aminoácidos (SCHWARTZ *et al.*, 2007) e possuem ação estimulante da musculatura lisa sendo capazes de irritar as mucosas (SEBEN *et al.*, 1993; TOLEDO; JARED, 1995).

Outras atividades farmacológicas são descritas como ação convulsiva, vasoconstritora, alucinógena e colinérgica (HABERMEHL, 1981; TOLEDO; JARED, 1995). Já as proteínas devem atuar principalmente na defesa química contra predadores por apresentarem atividades enzimáticas (PERRY, 2000; LIBÉRIO *et al.*, 2014).

Atualmente existem poucos estudos farmacológicos experimentais que caracterizem as atividades bioativas das toxinas encontradas nas secreções cutâneas dos anuros. Sendo assim, uma maior quantidade de estudos desta natureza poderia ajudar a entender a dinâmica do envenenamento e, conseqüentemente, o papel dessas toxinas no mecanismo de defesa química do animal e na identificação e caracterização de novas moléculas bioativas de interesse farmacológico (LIBÉRIO, 2008; PAIOLI, 2011; KÖNIG *et al.*, 2012; MAILHO-FONTANA *et al.*, 2014).

1.3. *Corythomantis greeningi*

A família Hylidae é constituída por 941 espécies, que estão agrupadas em três sub-famílias sendo Hylinae (675 sp.), Pelodyadinae (207 sp.) e Phyllomedusinae (59 sp.) (FROST, 2014).

Dentre os anfíbios anuros da família Hylidae ocorrem espécies conhecidas como *casque-head* (JARED et al., 2005) ou, em uma tradução literal, “cabeças cascudas”. São animais que possuem a derme da cabeça totalmente mineralizada e unida aos ossos do crânio, formando uma estrutura única, muitas vezes com projeções em forma de espinhos na direção da superfície do corpo (TRUEB, 1970; JARED et al., 2005). Pelo fato de a maioria dessas espécies viverem em ambientes áridos, supõe-se que a presença da camada calcificada e a co-ossificação da cabeça sirvam para proteção contra perda d'água (DUELLMAN; KLAAS, 1964; TRUEB, 1970; SEIBERT et al., 1974; DUELLMAN; TRUEB, 1986).

O grupo das pererecas *casque-head* é considerado não monofilético pelo fato dos grupos da América do Sul e Índia Ocidental ser filogeneticamente diferentes dos grupos da América Central (*Triprrion*, *Pternohyla*) (TRUEB, 1970; DUELLMAN et al., 2001; FAIVOVICH et al., 2005). Dentro desse grupo, o gênero sulamericano *Aparasphenodon*, é o mais próximo de *Corythomantis*, sendo considerado um grupo irmão (TRUEB, 1970; FAIVOVICH et al., 2005).

Corythomantis greeningi (Cg) é um hilídeo pertencente ao grupo dos *casque-head* e endêmico da caatinga brasileira, ambiente semi-árido, com chuvas, quando ocorrem, concentradas apenas entre os meses de janeiro a março, cuja média anual pluviométrica é de 535 mm (média entre os anos 1911 e 1985) (BOULENGER, 1896; SUDENE, 1990; JARED et al., 1999) (Fig. 3).



Figura 3 - A) *Corythomantis greeningi*; B) habitat no período chuvoso e C) habitat no período de seca. Fotos: Carlos Jared.

A espécie *Cg* só deixou de ser a única do gênero 116 anos depois de ter sido descrita por Boulenger em 1896. Atualmente contamos também com a espécie *Corythomantis galeata* recentemente descrita por Pombal Jr. e colaboradores (2012). Além de *Cg* ser um *casque-head*, essa espécie apresenta um comportamento fragmótico (Fig. 4) (SAZIMA et al., 1986; JARED et al., 1999; JARED et al., 2005) que consiste em se abrigar em buracos e frestas, tampando a entrada com a própria cabeça. Trata-se de uma perereca já bem estudada pelo nosso grupo de pesquisa do ponto de vista da história natural (JARED et al., 1995; JARED et al., 1999, JARED et al., 2005; JARED; ANTONIAZZI, 2009), da co-ossificação cranial, do comportamento fragmótico (NAVAS et al., 2002; JARED et al., 2005), e da camada calcificada dérmica (JARED et al., 1995; KATCHBURIAN et al., 2001).

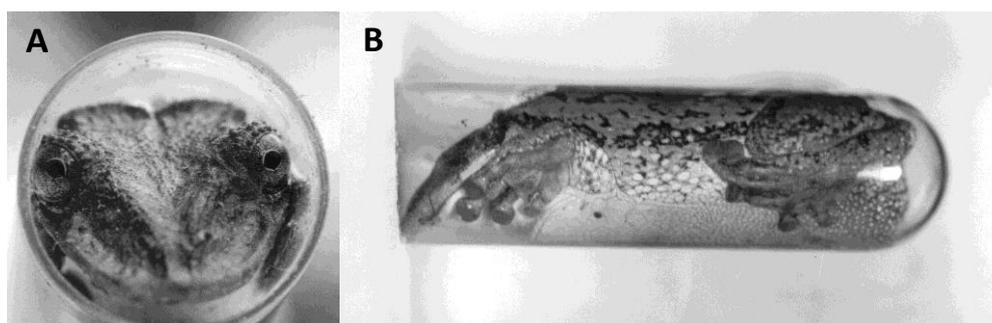


Figura 4 - Comportamento fragmótico de *Corythomantis greeningi* mimetizado em tubos transparentes no laboratório, A) vista frontal e B) vista lateral. Fotos: Carlos Jared.

Estudos realizados por Jared e colaboradores em 2005 demonstraram que a secreção cutânea bruta de *Cg* é letal para camundongos da linhagem Balb/C apresentando uma DL_{50} estimada em 69,75 μ g por animal (Balb/C). Entretanto, ainda não existem dados na literatura sobre a morfologia fina da pele, composição bioquímica, toxicidade e possíveis atividades farmacológicas da secreção cutânea da espécie *Cg*. Neste trabalho levamos em consideração fatos notórios observados no campo que consistia em dor intensa e edema, causado pela penetração da secreção cutânea através de pequenos ferimentos na manipulação desses

animais no momento da coleta (informação verbal)¹, para a escolha dos testes de atividades biológicas.

Dessa forma, o conhecimento sobre a espécie, os detalhes de sua pele e das glândulas, bem como as características bioquímicas e farmacológicas de sua secreção cutânea foram detalhadamente estudados neste trabalho. Esse conhecimento é de fundamental importância para uma melhor compreensão do mecanismo de defesa desse anuro tanto contra a dessecação, bem como contra predadores, já que possui a característica distintiva de colonizar um ambiente totalmente adverso que, à primeira vista, traria pouca chance de sucesso adaptativo, principalmente se tratando de uma perereca. Além dessa visão evolutiva, o estudo aprofundado da secreção cutânea e de suas propriedades tóxicas, antimicrobianas e anti-tumorais poderiam ser utilizadas futuramente para a bioprospecção de moléculas bioativas.

¹ Notícia fornecida pelo Dr. Carlos Jared no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, em São Paulo, em Fevereiro de 2013.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Estudar a morfologia fina da pele da perereca da caatinga *Corythomantis greeningi* e as principais características bioquímicas e farmacológicas de sua secreção cutânea, relacionando os dados obtidos com a defesa dessa espécie contra predadores e contra a dessecação.

Objetivos específicos

- Obter dados morfológicos da pele que possam estar relacionados com a sua adaptação ao ambiente xérico;
- Caracterizar bioquimicamente a secreção cutânea dessa espécie;
- Determinar as atividades enzimáticas da secreção cutânea;
- Realizar testes de atividade biológica da secreção bruta e algumas de suas principais frações para: nocicepção, edema, citotoxicidade e atividade antimicrobiana.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais, extração das amostras histológicas e obtenção da secreção cutânea

Cinco espécimes machos e cinco fêmeas de *Cg* (BOULENGER, 1896) foram coletados através de busca ativa noturna no período de chuvas na Fazenda São Miguel, em Angicos, no Estado do Rio Grande do Norte com a devida licença do SISBIO (15964-1). As metodologias utilizadas foram previamente analisadas e aceitas pela Comissão de Ética em Uso Animal do Instituto Butantan sob o protocolo 1006/13. Os animais foram sacrificados com uma dose letal de 50 mg/Kg de Tiopental, por via intraperitoneal. Amostras de aproximadamente 1 cm² de pele dorsal, ventral e inguinal foram fixadas em solução de paraformaldeído (4%) em tampão PBS 0,1 M, pH 7,2 ou Bouin (4%) por 24 horas e incluídas, respectivamente, em glicol metacrilato ou parafina. Em seguida à remoção das amostras, os animais utilizados foram preservados em formalina e encaminhados à coleção herpetológica do Instituto Butantan.

Para a obtenção da secreção cutânea dez espécimes de cada sexo de *Cg* foram mantidos vivos no biotério do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan. A secreção do corpo foi coletada por excitação glandular através da leve compressão manual da pele dos animais parcialmente submersos em um béquer com PBS pH 7,2.

3.2. Técnica histológica

Para a preparação das amostras histológicas de pele dorsal, ventral e inguinal foram utilizadas técnicas de acordo com o seguinte protocolo (segundo KIERNAN, 2001):

- fixação em paraformaldeído (4%) em tampão PBS 0,1 M, pH 7,2, de 8 a 10 horas;
- desidratação gradual em etanol: 70%, 95% e 100%;
- inclusão orientada em historresina (Leica).

O material incluído em historresina foi cortado em micrótomo nas espessuras de 2 µm, e posteriormente foi corado pelo azul de toluidina-fucsina, para finalmente ser estudado histologicamente.

Coloração azul de toluidina-fucsina

- Coloração dos cortes em historresina com o azul de toluidina por 30 segundos;
- Lavagem dos cortes com água destilada;
- Coloração pela fucsina por 5 segundos;
- Lavagem em água corrente;
- Secagem da lâmina em chapa aquecida ou naturalmente;
- Montagem da lâmina com Entellan®.

Esta coloração é utilizada para visualizações morfológicas gerais dos tecidos incluídos em historresina. O azul de toluidina cora os componentes basofílicos em azul e a fucsina cora o citoplasma em magenta.

3.3. Estudo histoquímico

Este estudo tem por finalidade um primeiro reconhecimento da natureza química das secreções contidas nas glândulas cutâneas e verificar a presença de camada calcificada na derme. Foram realizadas as seguintes reações (ou colorações) histoquímicas (segundo BANCROFT; STEVENS, 1996; KIERNAN, 2001):

Ácido periódico-schiff (PAS) - Mucopolissacarídeos neutros e glicoproteínas se coram em vermelho magenta.

- Desparafinação dos cortes em xilol;
- Hidratação em série alcoólica de concentrações decrescentes;
- Imersão em solução aquosa de ácido periódico (1%) por 10 minutos;
- Lavagem rápida com água destilada;
- Imersão no reativo de schiff por 30 minutos;
- Lavagem em água sulfurosa por três vezes durante 3 minutos cada;
- Lavagem por 30 minutos em água corrente;

- Desidratação em série alcoólica de concentrações crescentes e diafanização em xilol;
- Montagem da lâmina com Entellan®.

Alcian blue, pH 2,5 - mucopolissacarídeos ácidos e glicosaminoglicanas se coram em azul.

- Desparafinação dos cortes em xilol;
- Hidratação em série alcoólica de concentrações decrescentes;
- Coloração com a solução de alcian blue (1%) em ácido acético (3%) com pH 2,5 por 20 minutos;
- Lavagem das lâminas em ácido acético (3%) durante 2 minutos;
- Contra - coloração com hematoxilina de Harris por 15 segundos;
- Desidratação em série alcoólica de concentrações crescentes e diafanização em xilol;
- Montagem da lâmina com Entellan®.

Azul de bromofenol – As proteínas coram-se em azul

- Desparafinação dos cortes em xilol;
- Hidratação em série alcoólica de concentrações decrescentes;
- Imersão dos cortes na solução de azul de bromofenol por 15 minutos;
- Banho em solução de ácido acético (0,5%) por três vezes (1 minuto cada);
- Lavagem em água destilada e em seguida em tampão PBS pH 7,2;
- Desidratação em série alcoólica de concentrações crescentes e diafanização em xilol;
- Montagem da lâmina com Entellan®.

von kossa – Locais ricos em fosfato de cálcio coram-se em preto.

- Desparafinação dos cortes em xilol;
- Hidratação em série alcoólica de concentrações decrescentes;
- Imersão dos cortes em solução de nitrato de prata (5%) sob luz forte por 40 minutos;
- Lavagem das lâminas em água destilada por 2 minutos;

- Redução da prata, através da imersão dos cortes em solução de hidroquinona (0,5%), durante 2 minutos, agitando sempre;
- Banho em solução aquosa de hipossulfito de sódio (5%) por dois minutos;
- Lavagem em água destilada;
- Contra-coloração com safranina (0,5%) durante 20 segundos;
- Desidratação das lâminas em série alcoólicas de concentrações crescentes e diafanização em xilol;
- Montagem da lâmina com Entellan®.

3.4. Fotomicrografias

As imagens foram obtidas no microscópio Olympus BX51 equipado com câmera digital, cujas imagens foram capturadas por meio do Software Image-Pro Express da Media Cybernetics.

3.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Fragmentos de pele das regiões dorsal, ventral e inguinal foram extraídos e submetidos ao seguinte protocolo:

- Fixação em Karnovsky (glutaraldeído 5% e paraformaldeído 4% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2);
- Pós-fixação em tetróxido de ósmio (1%) em tampão cacodilato 0,1 M;
- Contrastação em uranila aquosa (0,5%);
- Desidratação em etanol em série crescente do 70% até o etanol absoluto;
- Pré-embebição em óxido de propileno e resina em diferentes proporções sendo: 2 (propileno):1 (resina), 1(propileno):1 (resina) e 1 (propileno): 2 (resina);
- Pré-inclusão em resina pura tipo epoxy;
- Inclusão em resina epoxy.

3.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Fragmentos de pele dorsal, ventral e inguinal foram extraídos e fixados em solução de Karnovsky ou em paraformaldeído tamponado pH 7,2. Depois passaram

por uma lavagem com detergente concentrado seguida por uma série de quatro lavagens com água destilada em ultrassom. Depois de lavados, os fragmentos foram desidratados até etanol absoluto. As amostras desidratadas foram secas utilizando-se um aparelho de ponto crítico, montadas sobre *stubs* de alumínio utilizando-se fita dupla-face de carbono, e recobertas com uma fina camada de ouro em um aparelho de *sputtering*. A análise foi realizada em alto vácuo no microscópio de varredura FEI Quanta 250.

3.7. Preparação da secreção e frações utilizadas na determinação das atividades biológicas

A secreção cutânea de *Cg* foi diluída em tampão PBS pH 7,4 e a concentração protéica foi quantificada através do método do ácido bicinonínico (SMITH et al., 1985) e curva padrão de soro albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich Chemical CO., St. Louis, MO, U.S.A.). Os cálculos para estimar a concentração foram determinados com o auxílio do Software Curve Expert. A secreção foi então alíquotada em diversos tubos e congelados em freezer - 80 °C.

A secreção cutânea bruta foi fracionada por HPLC e os 10 picos obtidos foram coletados separadamente (Fig. 23). As 10 frações foram liofilizadas, pesadas e ressuspendidas em 500 µL de PBS pH 7,2 e posteriormente utilizadas nos testes para atividade edematogênica e nociceptiva.

3.8. Estudo bioquímico da secreção

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, com a colaboração do Dr. Daniel Pimenta e da Dra. Juliana Mozer Sciani.

3.8.1. Perfil do HPLC e purificação das moléculas

Para o fracionamento da secreção, foi utilizado um sistema binário de HPLC de fase reversa (Proeminence 20A, Shimadzu, Kyoto, Japão) para separação da amostra. A secreção, diluída em água contendo 0,1% TFA, previamente

centrifugada a 10000 x g por 10 minutos, foi submetida à cromatografia em uma coluna ACE C18 (5 µm, 4,6 mm x 250 mm) utilizando um sistema de dois solventes (A) ácido trifluoroacético (TFA)/H₂O (1:1000) e (B) TFA/acetonitrila (ACN)/H₂O (1:900:100). O conteúdo foi eluído com um fluxo de 1,0 mL/min, em um gradiente de 5 a 90% do solvente B durante 30 min e monitorado por UV na absorvância de 214 nm. Análises paralelas complementares da secreção foram realizadas por eletroforese SDS-PAGE a fim de se verificar a presença de proteínas nesta secreção.

3.8.2. Perfil eletroforético unidimensional

Para estimar a massa molecular de proteínas, as amostras na concentração de 20 µg diluídas em um volume de 20 µL foram aplicadas em géis de poliacrilamida (PAGE) a 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), em condições não redutoras, de acordo com o método descrito por Laemmli, (1970). O gel de empacotamento foi utilizado em uma concentração de 5% (p/v) de poliacrilamida e a corrida realizada a 30 mA/gel. Depois da separação das proteínas por eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250. Juntamente com as amostras, foi utilizado um padrão de massa molecular *broad range*, com proteínas de 6,5 a 205 kDa (*Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, Bio-Rad*).

3.8.3. Espectrometria de massa

Para espectrometria de massa tipo *electrospray*, as análises foram realizadas em um instrumento IT-TOF (Shimadzu Co; Japan) do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. As amostras foram analisadas em modo positivo (preferencialmente), após injeção direta no instrumento sob fluxo constante de 200 µL/min em uma solução 50% acetonitrila, contendo 0,5% ácido fórmico. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi realizado pelo software LCMS Solution.

3.8.4. Ensaio de atividade peptidásica

A secreção cutânea fresca de *Cg* foi testada para atividade peptidásica sobre substratos fluorogênicos e/ou com supressão intramolecular de fluorescência por ressonância de energia (FRET) para atividades do tipo serino, cisteíno e metalopeptidases inicialmente. Em resumo: para avaliação das atividades tipo peptidases, a solução fresca da secreção cutânea foi ensaiada em uma solução tamponada (TrisHCl 20 mM, pH 7,5) na concentração de 5 µg/mL. Para avaliação da atividade serinopeptidásica foi utilizado o substrato Z-R-MCA (Z= Carboxybenzil; MCA= 7-amino-4-methyl coumarine); para avaliação da atividade metalopeptidásica, os substratos Abz-GPLGWARQ-EDDnp, Abz-GPQGWARQ-EDDnp foram utilizados em uma solução tamponada de TrisHCL 50 mM e para a atividade tipo cisteíno peptidase, foi utilizada uma solução tamponada de Abz-GIVRAK(Dnp) (Abz= ácido ortomino bezóico, EDDnp= etileno diamino dinitro benzol) em solução tampão de NaH₂PO₄ 50 mM, pH 6. Esses substratos fluorogênicos foram incubados com a secreção cutânea e o ensaio foi monitorado em tempo real, em cubeta termostatizada em um fluorímetro SpectraMax Gemini 2 (Molecular Devices).

3.8.5. Determinação das atividades caseinolítica, gelatinolítica e fibrinogenolítica

A secreção cutânea de *Cg* foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS (SDS- PAGE). Ao gel de resolução 12% foi acrescentado 2 mg/mL de caseína, 2 mg/mL de gelatina ou 0,5 mg/mL de fibrinogênio de acordo com a atividade enzimática desejada. Foi utilizado o gel de empacotamento em uma concentração de 5% (p/v) de poliacrilamida. Cada gel recebeu as amostras na concentração de 20 µg diluídas em 20 µL de tampão de amostra em condições não redutoras e a corrida realizada a 30 mA/gel. O tratamento do gel foi realizado como descrito por Barbaro et al., (2005). Após a incubação, o gel foi corado com azul de Coomassie e em seguida, imerso em solução descorante para retirar o excesso de corante. As áreas claras no gel indicam as regiões onde ocorreu atividade enzimática. Juntamente com as

amostras, foi utilizado um padrão de massa molecular *broad range*, com proteínas de 6,5 a 205 kDa (*Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, Bio-Rad*).

3.8.6. Determinação da atividade hialuronidásica

A atividade hialuronidásica da secreção de *Cg* foi determinada utilizando-se o método descrito por Miura e colaboradores (1995). Para tanto, 170 µg/mL de ácido hialurônico foi incorporado como substrato ao gel com 12% de poliacrilamida. O gel de empacotamento foi utilizado em uma concentração de 5% (p/v) de poliacrilamida. As amostras na concentração 20 µg foram diluídas em 20 µL de tampão de amostra em condições não redutoras e a corrida realizada a 30 mA/gel. O tratamento do gel foi realizado como descrito por Barbaro e colaboradores (2005). O gel foi corado com Alcian Blue (0,5%). A visualização de áreas não coradas no gel é indicativa da presença de atividade enzimática. Juntamente com as amostras, foi utilizado um padrão de massa molecular *broad range*, com proteínas de 6,5 a 205 kDa (*Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, Bio-Rad*).

3.9. Ensaios de atividades biológicas

3.9.1. Avaliação da atividade edematogênica

Para determinar a atividade edematogênica induzida pela secreção cutânea de *Cg*, grupos de camundongos Swiss machos (6 - 9 animais/grupo) tiveram a pata posterior direita mensurada no pletismômetro (7141 Plethysmometer – Ugo Basile, IT) antes da injeção das amostras. Foi inoculado no coxim plantar da pata posterior direita dos animais cinco diferentes doses da secreção de *Cg* (32 µg, 8 µg, 2 µg, 0,5 µg e 0,125 µg) diluídas em 30 µL de PBS. O mesmo experimento foi realizado utilizando de 6 - 9 animais/grupo que foram injetados com as 10 frações isoladas a partir da secreção na concentração de 0,2 µg diluídas em 30 µL de PBS. por fração. O grupo controle foi injetado apenas com PBS pH 7,2. Os resultados foram expressos como a diferença entre a medida do volume deslocado (µL) pela pata experimental em diferentes intervalos de tempos (0,5, 1, 2, 4, 24, 48, 72 e 96 horas) com o volume deslocado desta pata antes da injeção da secreção.

3.9.2. Avaliação da atividade nociceptiva

Para avaliar a capacidade da secreção de Cg em induzir nocicepção camundongos Swiss machos (6-9 animais/grupo) tiveram a pata posterior direita injetada com cinco diferentes doses da secreção (32 µg, 8 µg, 2 µg, 0,5 µg ou 0,125 µg) diluídas em 30 µL de PBS. Para avaliar a capacidade de cada uma das 10 frações em induzir nocicepção (6-9 animais/grupo) foram injetados com as frações purificadas na concentração de 0,2 µg/30 µL de PBS. Os animais foram mantidos em uma superfície refletora sob um funil de vidro (10 minutos antes das injeções para ambientação) com a finalidade de diminuir o estresse e facilitar a visualização dos mesmos. A reatividade positiva foi considerada quando os animais lambiam a pata injetada. O tempo despendido nas lambidas foi mensurado em segundos, durante 30 minutos de avaliação experimental (HUNSKAAR et al., 1985). Animais injetados somente com PBS foram utilizados como controle negativo.

3.9.3. Manutenção de cultura de células e ensaios de citotoxicidade em fibroblastos e melanoma murino

Para os ensaios de citotoxicidade foi realizada a manutenção em cultura de duas linhagens celulares, sendo uma de melanoma murino (B16-F10) e a outra de fibroblastos normais de camundongo (L929).

As células, inicialmente mantidas em nitrogênio líquido, passaram por processo de descongelamento sendo colocadas em garrafas de cultura celular de 25 cm² contendo meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 10.000 U/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina. As duas linhagens celulares foram então mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂ até a confluência.

Para o tratamento das linhagens celulares com a secreção de Cg, os dois tipos celulares foram plaqueados em uma concentração de 3 x 10⁵ células/mL (3 x 10⁴ células/poço) de meio RPMI-1640 completo em placas de cultivo celular de 96 poços. Após aderência das células, a secreção foi diluída na proporção de 1:2 e posteriormente foi diluída em série na razão 2 com meio RPMI-1640 e distribuídas em quadruplicata na placa de cultivo. Os ensaios foram feitos com 24 horas de

incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, sendo repetidos por três vezes. Como controles negativos foram mantidos poços com cultura de células livre de tratamento com o veneno e como controle positivo foi utilizado veneno de *Bothrops jararaca* na concentração de 100 µg/100 µL.

3.9.4. Avaliação da viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular após tratamento com a secreção, foi feita com o ensaio de MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] (MOSMAN, 1983). Este composto é metabolizado nas mitocôndrias pelas células viáveis formando os cristais de formazan, ou seja, onde o efeito citotóxico for maior, haverá pouca formação de cristais. Após duas lavagens com tampão fosfato estéril (100 µL/poço), o MTT foi adicionado na concentração de 5 mg/mL, sendo 100 µL/poço, e novo período de incubação por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. A seguir, o MTT foi removido individualmente dos poços com micropipeta e adicionado o mesmo volume de DMSO (dimetilsulfóxido) para diluição dos cristais de formazan. Uma vez diluídos os cristais, a leitura da placa foi feita em um leitor de ELISA (Multiskan EX[®]) em comprimento de onda de 540 nm.

Os valores, em quadruplicata, da densidade óptica (D.O.) obtidos foram então utilizados para o cálculo da viabilidade celular da seguinte maneira:

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{Média D.O. tratamento} \times 100}{\text{Média D.O. controle}}$$

3.9.5. Avaliação da atividade antimicrobiana

A secreção cutânea bruta de *Cg* foi avaliada quanto à sua atividade antimicrobiana. As seguintes cepas bacterianas padrões foram utilizadas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 19659).

3.9.5.1. Ensaio para a atividade antimicrobiana – difusão em ágar

O ensaio de difusão em ágar foi realizado adaptando-se a metodologia descrita por Bauer e colaboradores em 1966, originalmente desenvolvida para o estudo de susceptibilidade bacteriana a antibióticos. Este ensaio consiste na aplicação de 20 µL da solução das amostras (secreção cutânea de *Cg*) em discos de antibiograma de 6 mm de diâmetro na maior concentração possível de ser testada (40 µg/mL). Estes discos foram aplicados sobre o ágar Müller Hinton previamente inoculado em placas de Petri com culturas bacterianas crescidas em meios apropriados por 18 horas a 37 °C, diluídas em 3 mL de solução fisiológica a 0,85% até atingir uma turbidez de 0,5 na escala de MacFarland, correspondente a 2×10^8 UFC/mL. Após este período, as preparações foram observadas quanto à formação ou não de halos de inibição de crescimento bacteriano.

3.9.5.2. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

A concentração inibitória mínima (MIC) das amostras foi determinada por meio de leitura espectrofotométrica. Diluições seriadas de cada amostra foram incubadas com suspensões bacterianas, e após incubação por um período de 24 h a 37 °C, as placas foram analisadas em espectrofotômetro a 595 nm.

3.10. Análises estatísticas

A análise dos resultados obtidos para atividade edematogênica e nociceptiva realizados com a secreção cutânea bruta de *Cg* foi feita por análise de variância (ANOVA) de duas variáveis, seguida pelo teste de Tukey ou de Bonferroni. As diferenças serão consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

Os resultados de cada fração para atividade edematogênica e nociceptiva foram estatisticamente testados com Two-way ANOVA/Bonferroni versus o PBS. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,01$.

A análise dos dados de viabilidade celular foi feita por análise de variância (ANOVA) de duas variáveis, seguida pelo teste de Bonferroni. As diferenças serão

consideradas significativas quando $p < 0,01$. O cálculo da viabilidade celular foi obtido a partir de uma regressão não linear dos dados.

Para todos os testes estatísticos e elaboração dos gráficos foi utilizado o software Prisma Graph Pad 5.0. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo morfológico do tegumento de *Corythomantis greeningi* (Cg)

4.1.1. Histologia e histoquímica da pele

Externamente o tegumento de *Cg* é desprovido de verrugas, mas nos indivíduos machos são observadas inúmeras espículas córneas dispersas que dão à pele um aspecto espinhoso. Além disso, indivíduos machos e fêmeas da espécie possuem um acúmulo glandular na região da boca (Fig. 5), já descrito por Jared e colaboradores (2005).

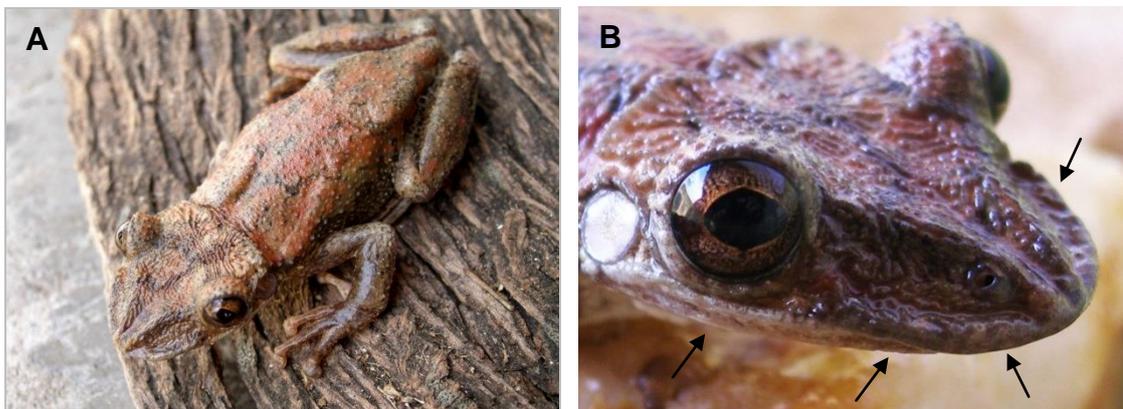


Figura 5 - (A) *Corythomantis greeningi*; (B) acúmulos glandulares da região da boca (setas). Fotos: Carlos Jared.

Histologicamente o tegumento é caracterizado por apresentar uma epiderme composta por cerca de seis camadas celulares, sendo a mais externa uma camada córnea. No estrato esponjoso da derme, logo abaixo da epiderme, ocorre uma camada contínua de células pigmentares de espessura variável. O restante do estrato esponjoso é, em grande parte ocupado, pelas glândulas mucosas e granuladas, além de inúmeros vasos sanguíneos e nervos (Fig. 6).

Abaixo do estrato esponjoso ocorre o estrato compacto rico em fibras de colágeno do tipo I que se dispõem longitudinalmente. Entre o estrato esponjoso e

compacto da derme existe uma espessa camada formada por depósitos de cálcio (camada calcificada). Abaixo do estrato compacto, localiza-se a tela subcutânea, provida de numerosos vasos sanguíneos e nervos (Fig. 6).

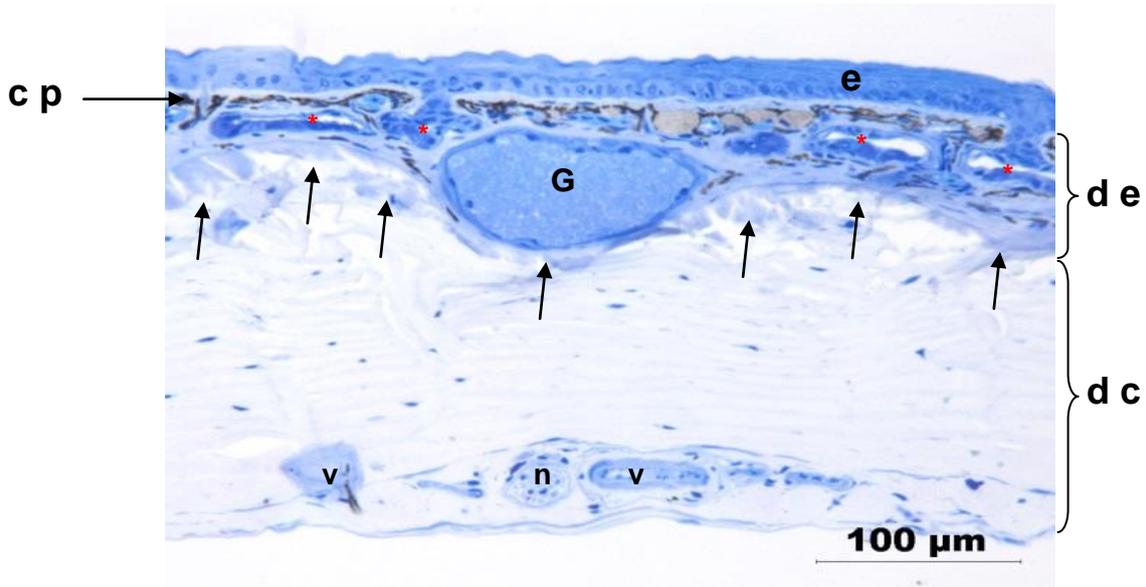


Figura 6 - Corte histológico mostrando o aspecto geral da pele dorsal de *Corythomantis greeningi*. (e) epiderme, (c p) células pigmentares, (G) glândula granulosa, (*) glândula mucosa, (d e) derme esponjosa, (d c) derme compacta, (setas) camada calcificada, (v) vasos sanguíneos e (n) nervos. Historresina, coloração por toluidina-fucsina.

As glândulas mucosas estão dispostas logo abaixo da epiderme, são menores do que as glândulas granulosas apresentando forma acinosa com lúmen evidente e central (Fig. 7 A). O tegumento apresentou dois tipos de glândulas mucosas, que foram nomeadas como glândula mucosa tipo 1 (Gm1) e glândula mucosa tipo 2 (Gm2). O tipo 1 possui um epitélio secretor espesso, diferente do tipo 2, que apresenta um epitélio secretor mais delgado (Fig. 7 B). Ambos os tipos glandulares são compostos por dois tipos celulares distintos.

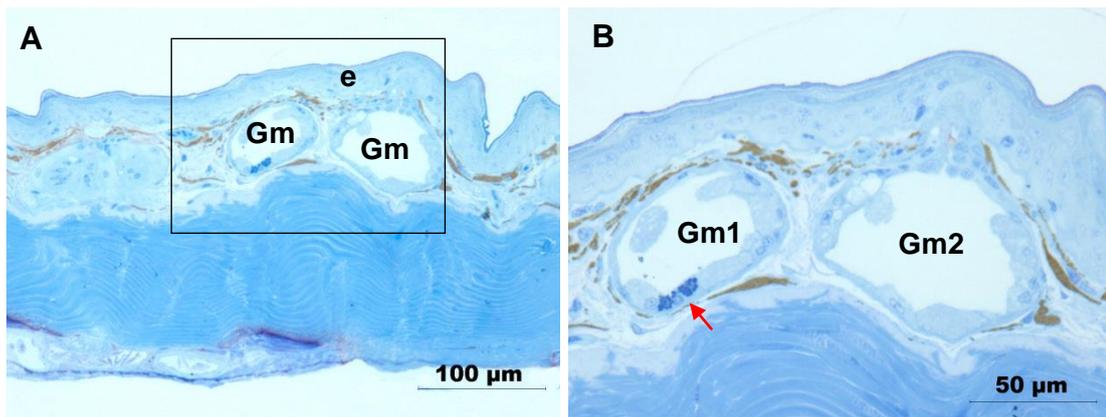


Figura 7 - (A) Corte histológico da pele dorsal mostrando a localização e o aspecto dos dois tipos de glândulas mucosas (Gm) encontradas logo abaixo da epiderme (e) em *Corythomantis greeningi*. (B) Maior aumento da região demarcada na figura A, sendo a glândula mucosa do tipo 1 (Gm1), composta por células que apresentam no citoplasma grânulos bem definidos e que se coram fortemente pelo azul de toluidina (seta vermelha) e células que se coram fraca e uniformemente. Glândula mucosa do tipo 2 (Gm2), com epitélio secretor delgado, composto por células que se coram fracamente pelo azul de toluidina. Historresina, coloração por toluidina-fucsina.

As glândulas granulosas não apresentam lúmen, são sinciciais e apresentam se totalmente preenchidas por grânulos esféricos (Fig. 8).

Externamente todas as glândulas cutâneas são revestidas por uma monocamada de células mioepiteliais (Fig. 8) e se conectam com o exterior através de dutos epidérmicos por onde a secreção é liberada na superfície do corpo.

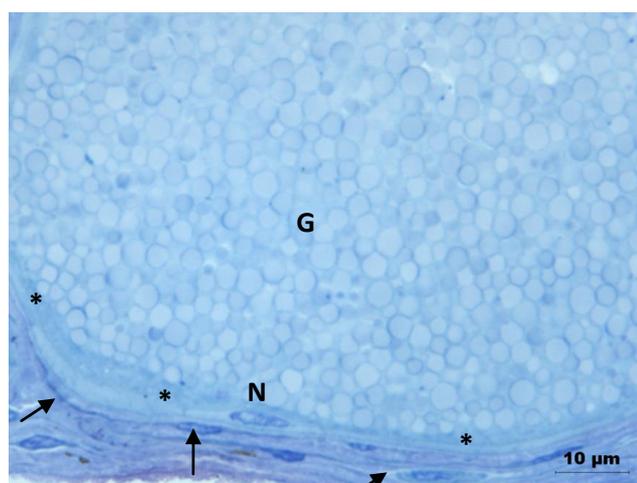


Figura 8 - Corte histológico da glândula granulosa mostrando o sincício secretor (*) com núcleos periféricos (N) e totalmente preenchido por grânulos (G) de secreção. As setas apontam a camada mioepiteliais que envolve a glândula. Historresina, coloração por azul de toluidina-fucsina.

As glândulas da pele, independentemente da região do corpo examinada, apresentaram resultados histoquímicos semelhantes. O epitélio secretor da glândula mucosa do tipo 1 (Gm1) reage positivamente ao alcian blue, pH 2,5, corando-se em tons de azul turquesa, ao PAS corando-se em magenta e ao azul de bromofenol em tons de azul (Fig. 9 A, B e D). Já as glândulas mucosas do tipo 2 (Gm2) apresentaram-se fracamente positivas ao alcian blue pH 2,5, negativas ao azul de bromofenol (Fig. 9 A e B) e positivas ao PAS (Fig. 9 D). As glândulas granulosas possuem conteúdo reativo ao azul de bromofenol, principalmente na periferia dos grânulos, é fracamente reativo ao alcian blue, pH 2,5 e negativo para o PAS (Fig. 9 A, C e D).

A camada calcificada revelou ser muito reativa ao método histoquímico do von Kossa, mostrando a forte reação do nitrato de prata com a camada calcificada, que se cora na cor negra (Fig. 10).

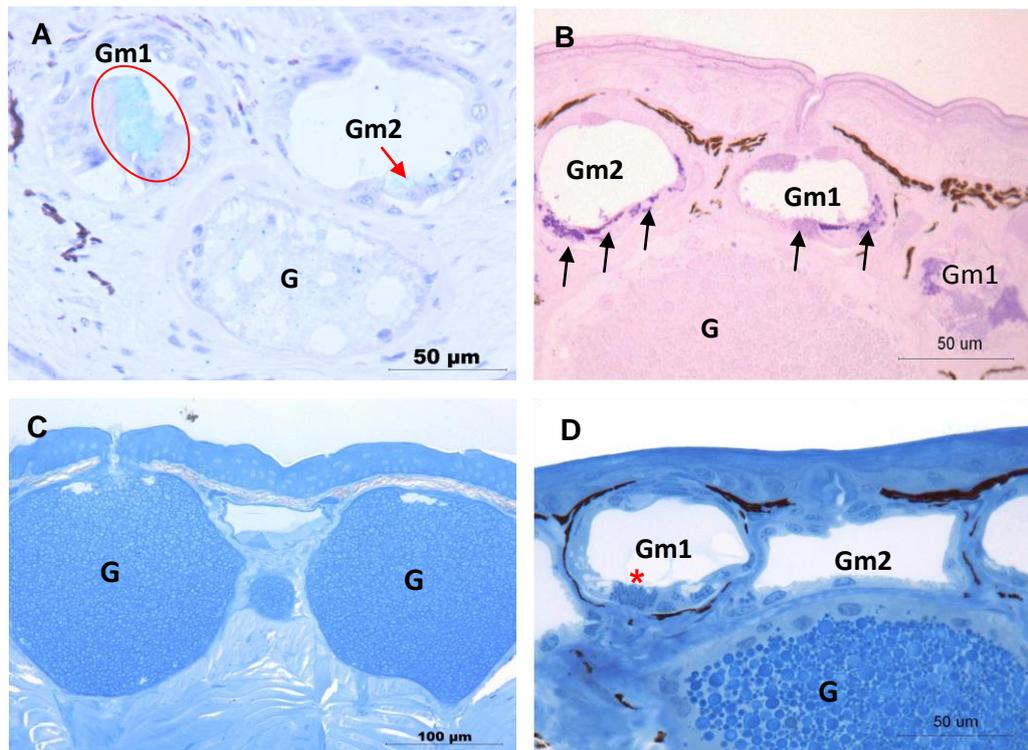


Figura 9 - Histoquímica da pele da região dorsal. (A) As regiões coradas em azul turquesa indicam a positividade ao alcian blue, pH 2,5 de algumas células das glândulas mucosas tipo 1 (Gm1) (circulo), e uma fraca positividade de algumas células da glândula tipo 2 (Gm2) (seta vermelha). (B) As regiões coradas em magenta indicam a forte positividade ao PAS (setas pretas) de certas células das glândulas mucosas tipo 1 e 2 (Gm1 e 2). (C e D) grânulos das glândulas granulosas (G) e parte das células da glândula mucosa tipo 1 (Gm1) (asterisco vermelho), apresentando reatividade ao azul de bromofenol. Historresina.



Figura 10 - Corte histológico da pele da região dorsal submetido ao método de von Kossa, mostrando a forte reação da camada calcificada que se revela na cor negra (setas). Historresina.

A pele dorsal das fêmeas de *Cg* possui superfície bem lisa não apresentando verrugas nem espículas córneas. Já os indivíduos machos diferentemente das fêmeas apresentaram na superfície da pele inúmeras espículas córneas (Fig. 11 A e B).

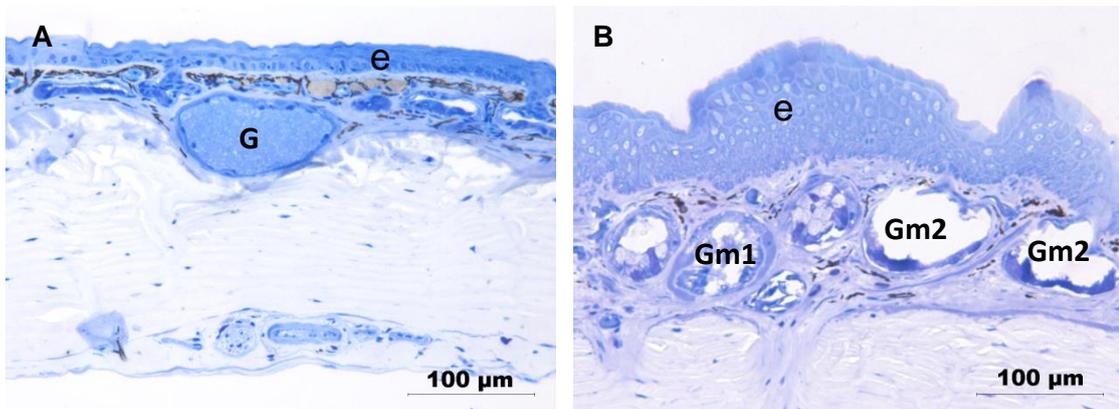


Figura 11 - (A) Corte histológico da pele dorsal da fêmea de *Corythomantis greeningi*, com a superfície da epiderme (e) relativamente plana. (B) Corte histológico da pele dorsal do macho evidenciando uma epiderme (e) irregular e com espículas córneas. Glândula granulosa (G), glândulas mucosas do tipo 1 (Gm1) e 2 (Gm2). Historresina, coloração por azul de toluidina-fucsina.

Ao compararmos apenas qualitativamente a pele das diversas regiões examinadas, foi observado que na região dorsal existe um maior número de glândulas granulosas e uma camada calcificada bem mais espessa do que as regiões ventral e inguinal, onde as glândulas granulosas são bem mais esparsas e a camada calcificada ou é bem delgada ou ausente, respectivamente (Fig. 12 A, B e C).

A região inguinal, além de não apresentar camada calcificada, é caracterizada por ser muito dobrada, formando as chamadas verrucas hidrofílicas, estruturas típicas dos anfíbios especializadas na captação de água. Além disso, essa região possui inúmeros vasos sanguíneos que, provenientes da tela subcutânea, ramificam-se pela derme e permeiam a epiderme na forma de capilares, ficando muito próximos à superfície da pele (Fig. 12 C e D).

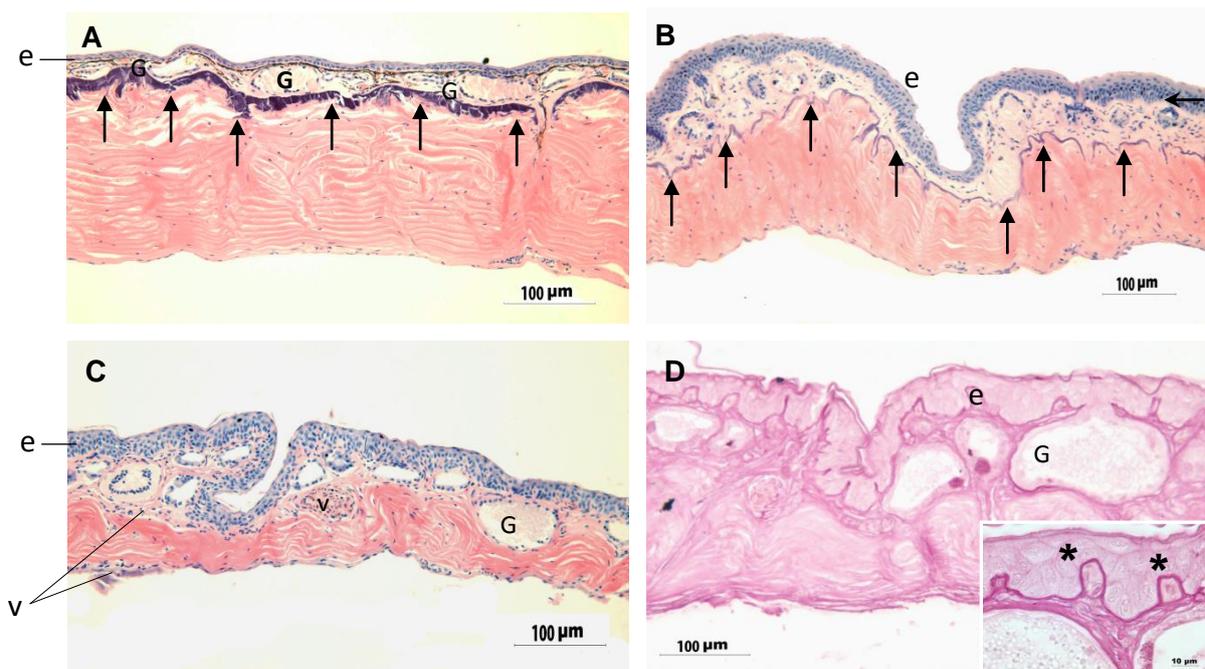


Figura 12 - Cortes histológicos do tegumento de *Corythomantis greeningi* sendo: região dorsal (A), ventral (B) e inguinal (C e D). Observamos que a camada calcificada (setas) está ausente apenas na região inguinal (C e D). Essa região possui um grande número de capilares sanguíneos (*) que se adentram na epiderme, circundados pela lâmina basal, bem evidenciada pelo PAS no inserto em maior aumento na figura D. (e) epiderme, (G) glândula granulosa, (v) vasos sanguíneos. Parafina, coloração por hematoxilina–eosina (A, B e C) e PAS (D).

4.1.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A partir de análises por microscopia eletrônica de transmissão do tegumento de *Cg* foi verificado que as glândulas mucosas do tipo 1 (Gm1) apresentam um epitélio secretor mais espesso, sendo composto por células de dois tipos diferentes (Fig. 13 A e B). Uma célula apresenta grânulos uniformes e eletrodensos e a outra possui inúmeros grânulos pouco eletrodensos, apresentando eletrodensidade moderada por apresentarem uma textura semelhante a “favos de mel” (Fig. 13). Ambos os tipos celulares, que compõem a Gm1, possuem microvilosidades apicais e apresentam o citoplasma repleto pelos grânulos de secreção (Fig. 13).

As glândulas mucosas do tipo 2 apresentam luz ampla e um epitélio secretor delgado onde se observam microvilosidades apicais (Fig. 14). Este é também formado por dois tipos celulares. O primeiro apresenta grânulos muito eletrodensos com tamanhos e formas variados. O outro tipo apresenta grânulos de eletrodensidade moderada. O citoplasma é preenchido por um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido com lamelas amplas e repletas de secreção (Fig. 14).

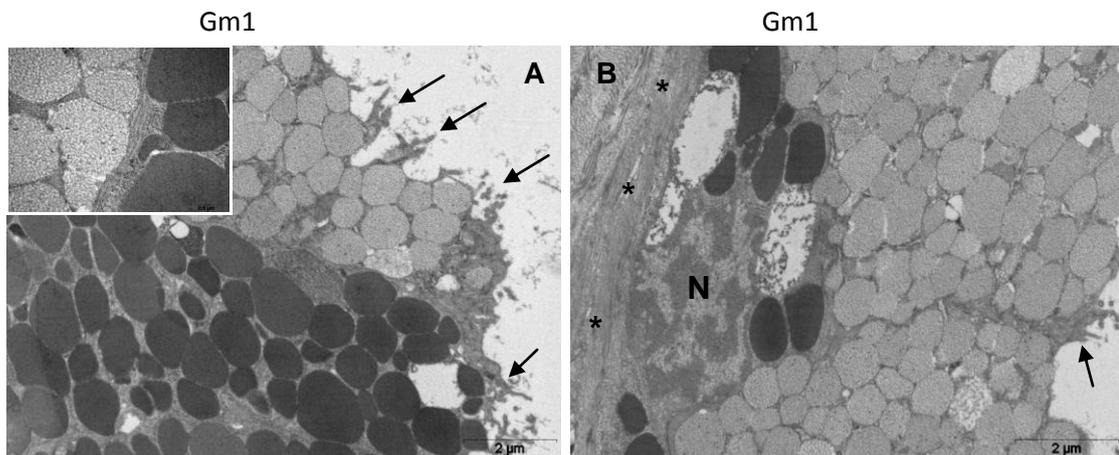


Figura 13 - Microscopia eletrônica de transmissão da pele de *Corythomantis greeningi* (A) e (B) é possível observar os dois tipos celulares que compõem a glândula mucosa do tipo 1 (Gm1), sendo que em uma os grânulos são muito eletrodensos e na outra os grânulos são moderadamente eletrodensos. Os detalhes dos grânulos podem ser vistos no inserto da figura A. Além dos grânulos observamos a presença de microvilosidades voltadas para a luz da glândula. Legendas: (N) núcleo, (*) camada mioepitelial e microvilosidades (setas).

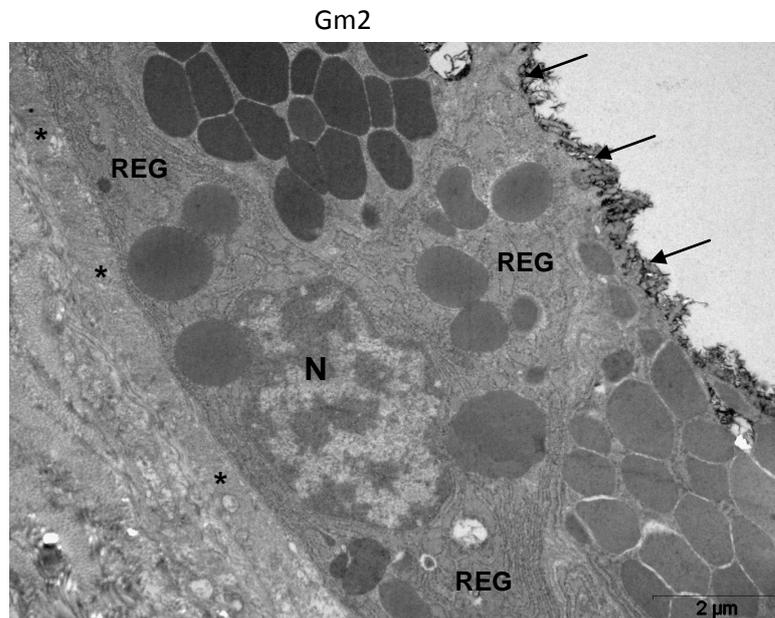


Figura 14 - Microscopia eletrônica de transmissão da pele de *Corythomantis greeningi*. A glândula mucosa tipo 2 (Gm2) com dois tipos celulares, sendo um com grânulos muito eletrodensos e outro com grânulos menos eletrodensos. Além disso, observamos a presença de microvilosidades voltadas para a luz da glândula. Legendas: (N) núcleo, (*) camada mioepitelial, (REG) retículo endoplasmático rugoso e (setas) microvilosidades.

As glândulas granulosas sinciciais apresentam uma região periférica contendo o retículo endoplasmático rugoso, e a região central repleta de grânulos esféricos e elípticos de dimensões variadas, mergulhados em uma matriz citoplasmática (Fig.15). Os grânulos são compostos periféricamente por uma região eletrodensa, sendo internamente preenchidos por um material de eletrodensidade moderada com alguns pontos eletrodensos na região central (Fig. 15).

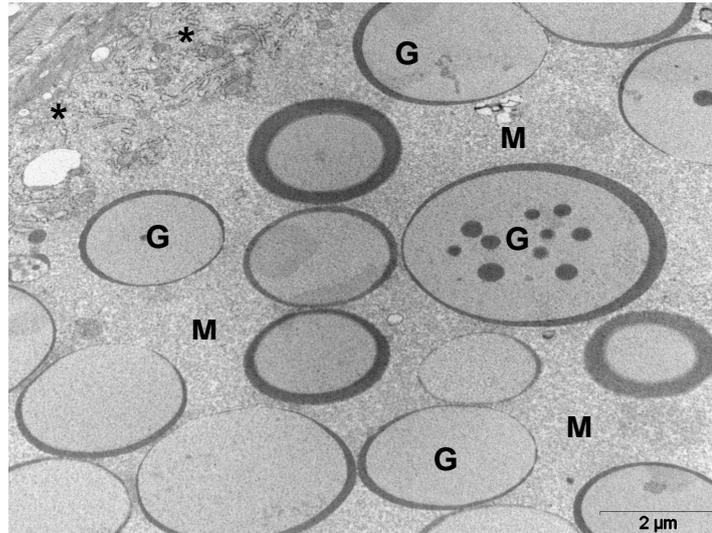


Figura 15 - Microscopia eletrônica de transmissão da glândula granulosa da pele de *Corythomantis greeningi*. Sincício secretor com retículo endoplasmático desenvolvido e grânulos de secreção elípticos e de tamanhos variados. Observamos que os grânulos são compostos por uma região periférica eletrodensa, de espessura variada, e são preenchidos por um material pouco eletrodenso, podendo ou não apresentar pequenos pontos eletrodensos em seu interior. Legendas: (*) Retículo endoplasmático rugoso, (G) grânulos e (M) matriz citoplasmática.

Na região entre a derme esponjosa e compacta é possível observar a camada calcificada composta por glóbulos irregulares de pouca eletrodensidade (Fig. 16).

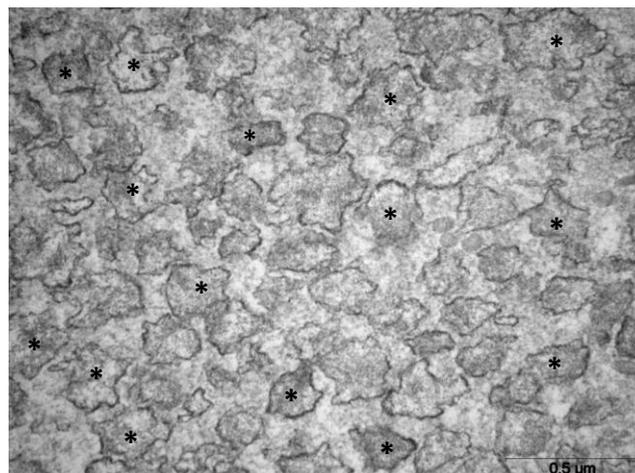


Figura 16 - Microscopia eletrônica de transmissão dos glóbulos irregulares de eletrodensidade variada (*) que compõem a camada calcificada encontrada na pele de *Corythomantis greeningi*.

4.1.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura elucidou a diferença entre a pele dorsal dos machos e fêmeas de *Cg*. A pele das fêmeas é totalmente lisa sendo desprovida de qualquer ornamentação córnea (Fig. 17 A). Já o dorso dos machos mostrou uma grande quantidade de estruturas córneas em forma de espinhos (Fig. 17 B). Essas estruturas são constituídas de um grande espinho central rodeado por vários espinhos menores (Fig. 17 B).

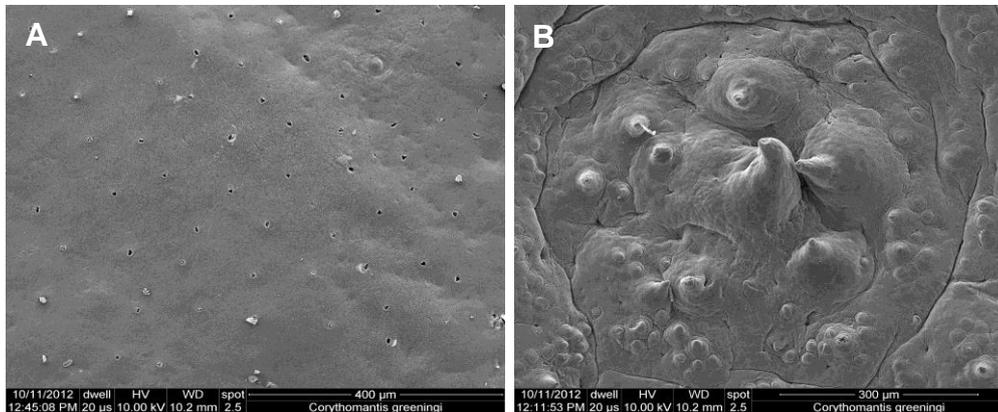


Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura da pele dorsal de *Corythomantis greeningi*. (A) fêmea e (B) macho.

No dorso tanto das fêmeas quanto dos machos foram encontrados uma grande quantidade de poros dos ductos das glândulas cutâneas (Fig. 17 A). Os ductos são estruturas com formas geralmente elípticas ou em forma de “Y” que podem ou não estar obstruídos pela secreção das glândulas (Fig. 18).



Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura de um poro de glândula granulosa obstruído pela secreção (seta).

A superfície da pele de todas as regiões apresenta micro-projeções epidérmicas (Fig. 19 A, B e C). Essas projeções são mais proeminentes nas regiões ventral e inguinal (Fig. 19 B e C). Na região ventral e inguinal existem espaços onde as projeções epidérmicas não estão presentes formando depressões e canais que se intercomunicam constituindo uma rede por toda extensão da pele (Fig. 20). Na região dorsal essas projeções são menores formando uma estrutura semelhante a um labirinto (Fig. 19 A).

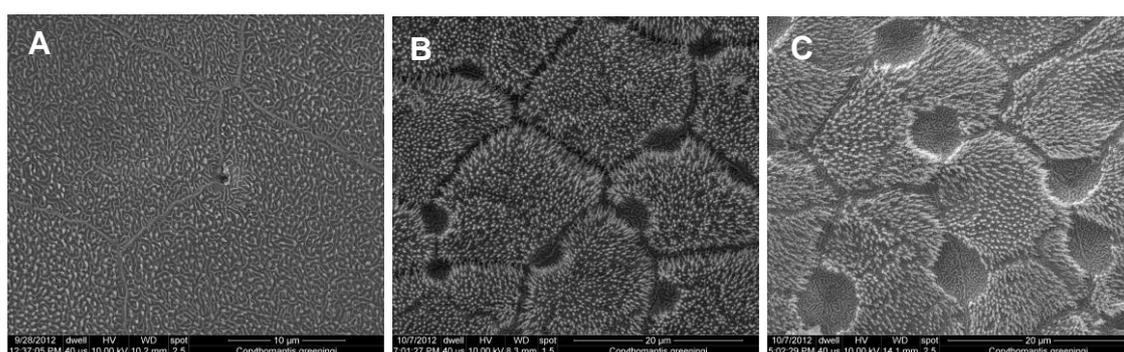


Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura das microprojeções epidérmicas presentes na superfície da pele das regiões dorsal de *Corythomantis greeningi* (A), inguinal (B) e ventral (C).

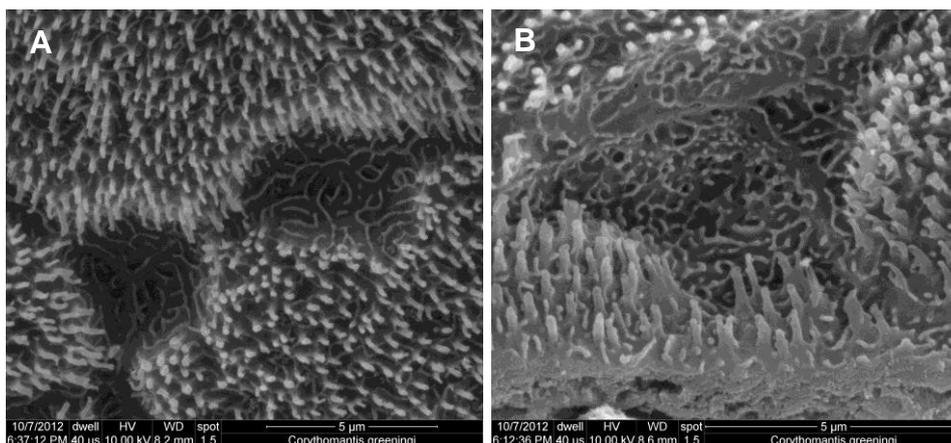


Figura 20 - Microscopia eletrônica de varredura da pele da região inguinal de *Corythomantis greeningi*. As fotos A e B mostram os detalhes das micro-projeções epidérmicas e as regiões em que elas estão ausentes formando depressões.

Em cortes transversais da região inguinal é possível observar uma grande quantidade de verrugas hidrofílicas (Fig. 21 A e B). A epiderme dessa região é delgada sendo permeada por vários capilares que ficam muito próximos a superfície da pele (Fig. 21 C).

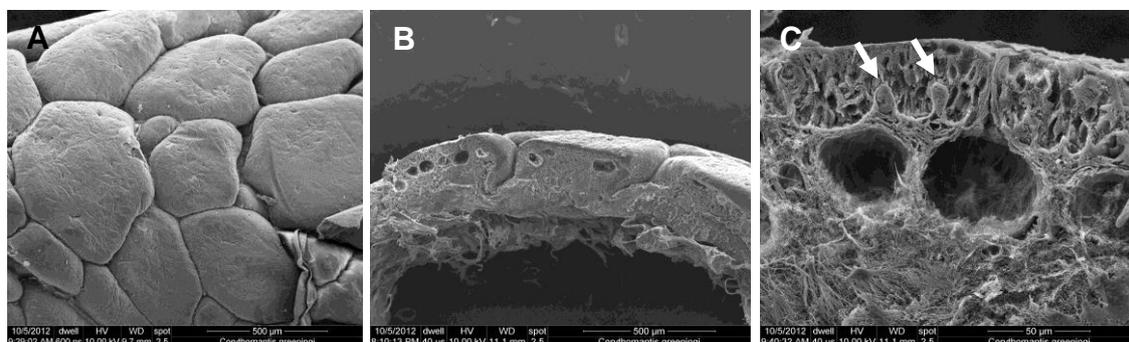


Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura da região inguinal de *Corythomantis greeningi*. (A) verrugas hidrofílicas em vista superficial, (B) corte transversal das verrugas hidrofílicas e (C) maior aumento das verrugas mostrando os vasos sanguíneos que permeiam a epiderme (setas).

4.2. Estudo da secreção cutânea bruta

4.2.1. Perfil eletroforético unidimensional (SDS-PAGE)

O perfil eletroforético mostra uma abundância de proteínas em diferentes massas moleculares, sendo mais proeminentes na faixa de 55 a 30 kDa. Além disso, bandas de baixa massa molecular também foram observadas na região de 14 kDa (Fig. 22).

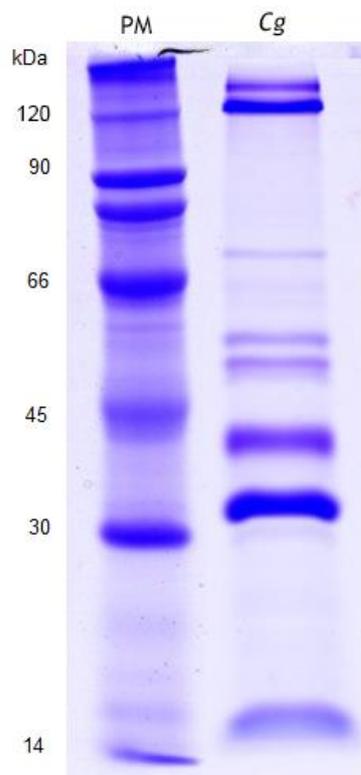


Figura 22 - Perfil da eletroforese (SDS-PAGE 12%) da secreção cutânea de *Corythomantis greeningi*, em condições não redutoras. Legenda: PM= padrão de massa molecular; Cg= *Corythomantis greeningi*.

4.2.2. Perfil do HPLC e espectrometria de massa da secreção bruta de *Cg*

O perfil cromatográfico em coluna C18, obtido a partir da secreção de *Cg*, mostrou-se complexo, com a presença de vários picos ao longo do gradiente e

possível separação de vários componentes. Foram obtidas 10 frações utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC). As frações foram numeradas de 1 a 10, de acordo com a ordem em que aparecem no perfil cromatográfico, como mostram a figura 23.

Análises por espectrometria de massas indicam moléculas de baixa massa molecular, variando entre 200 e 500 m/z, monocarregadas (Figs. 24 a 32).

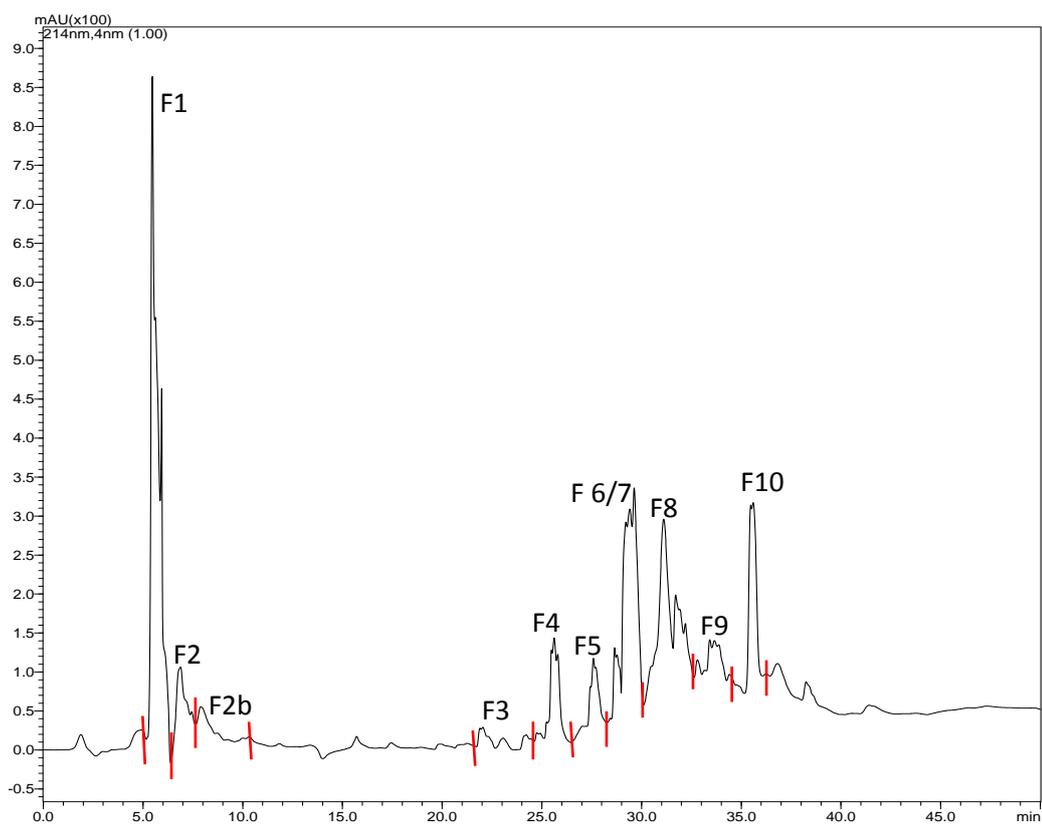


Figura 23 - Perfil cromatográfico da secreção cutânea de *Cg* por RP-HPLC, em coluna C18 e detecção UV ($\lambda = 214$ nm). F (1, 2, 2b, 3, 4, 5, 6/7, 8, 9, 10), frações coletadas utilizadas nos testes de atividade biológica. Secreção com alta complexidade de compostos.

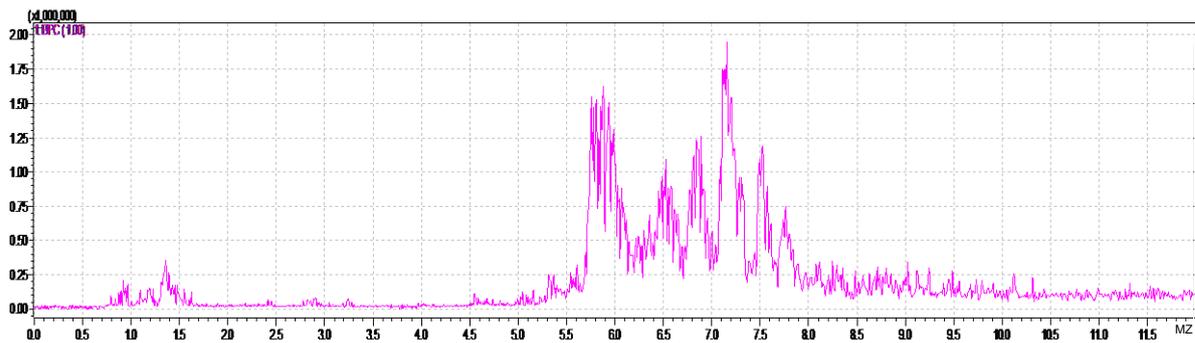


Figura 24 - Perfil cromatográfico com detecção por espectrometria de massas (TIC) da secreção cutânea de *Cg*, obtido em uma coluna C18. Foram observados íons de baixa massa molecular em sua maioria entre 200 e 500 m/z, monocarregados.

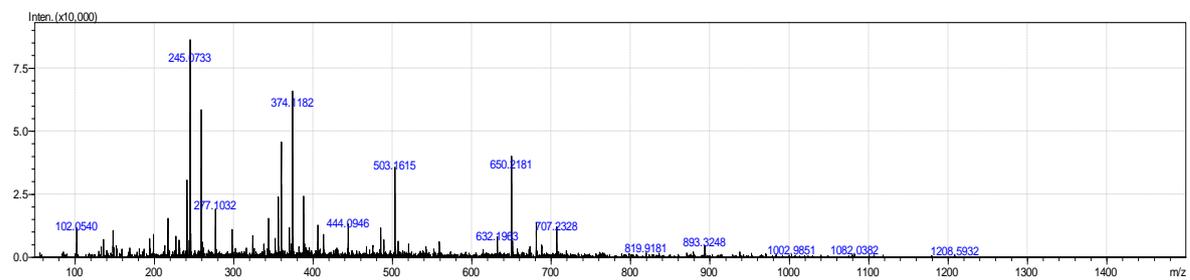


Figura 25 - Integração de 0,7 a 1,5 min. Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na secreção de *Cg*.

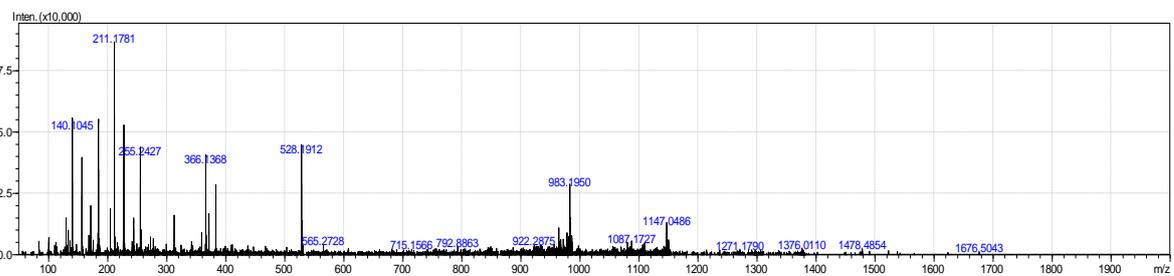


Figura 26 - Integração de 5 – 5,7 min. Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na secreção de *Cg*.

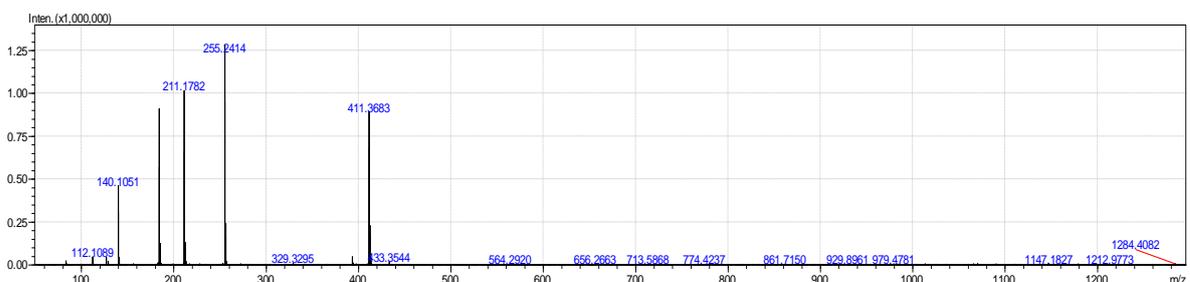


Figura 27 - Integração de 5,7 – 6,2 min. Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na secreção de *Cg*.

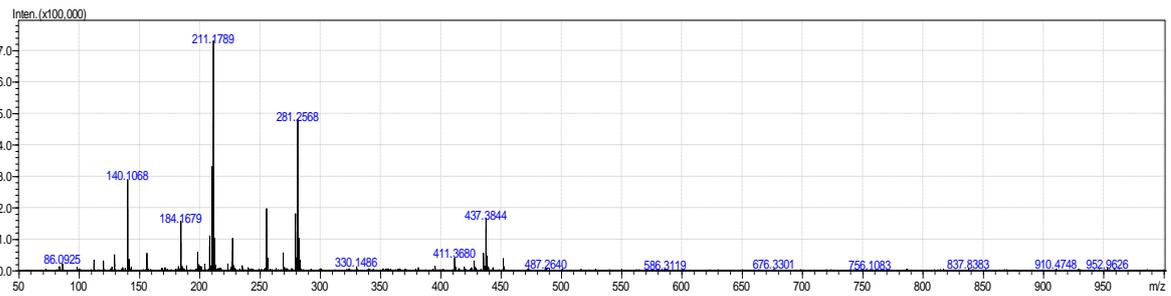


Figura 28 - Integração de 6,2 – 6,7 min. Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na secreção de Cg.

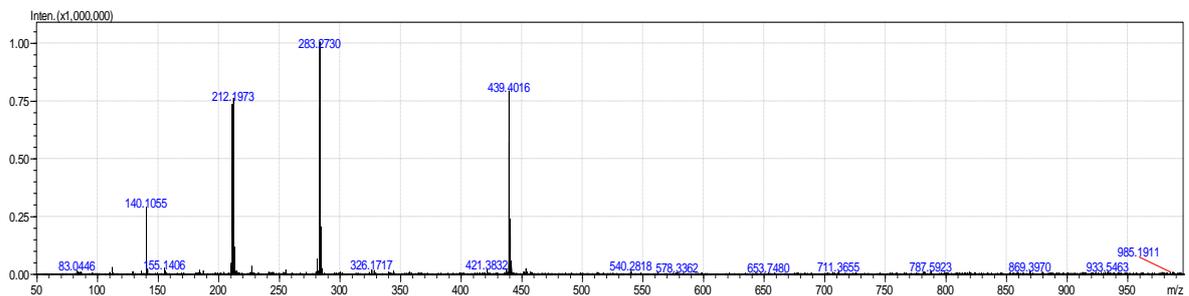


Figura 29 - Integração de 6,7 – 7 min. Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na secreção de Cg.

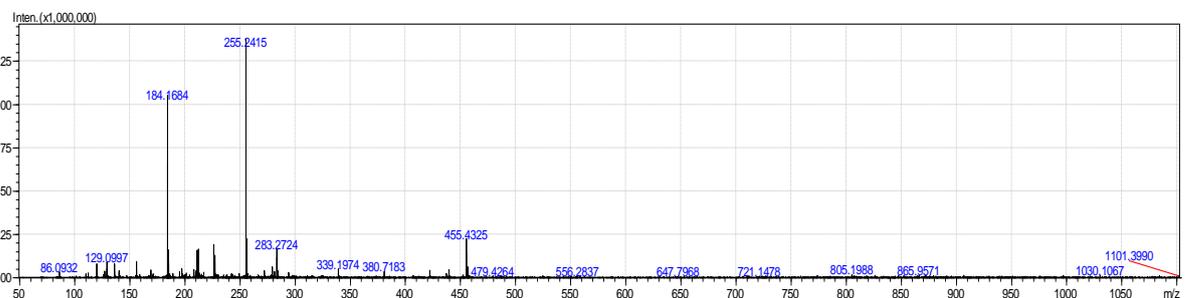


Figura 30 - Integração de 7 – 7,3 min. Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na secreção de Cg.

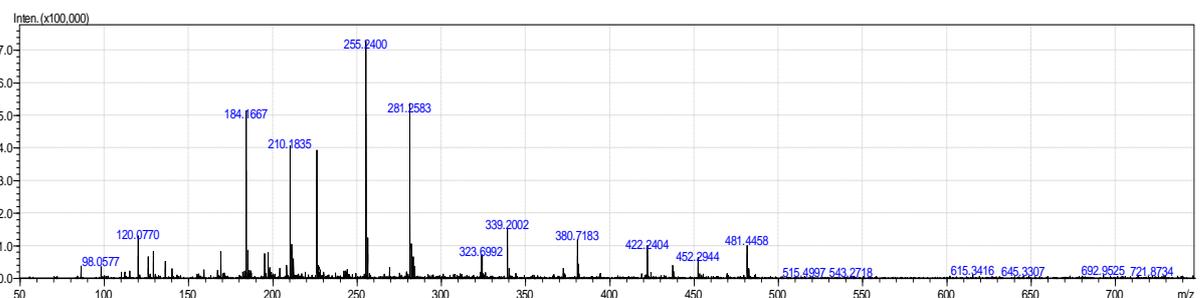


Figura 31 - Integração de 7,3 – 7,7 min. Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na secreção de Cg.

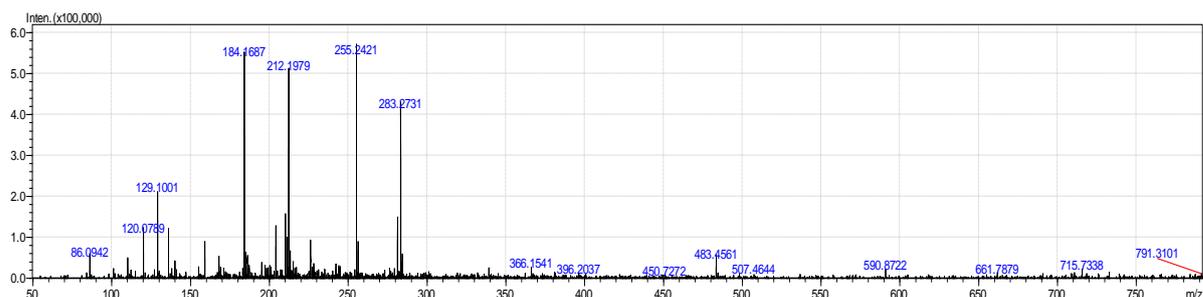


Figura 32 - Integração de 7,7 – 7,9 min. Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na secreção de Cg.

4.2.3. Espectrometria de massas das frações obtidas da secreção Cg

Ao comparar os padrões de fragmentação das moléculas de cada fração, com o que já está descrito na literatura pudemos observar que essas massas são típicas de esteróides e alcalóides semelhantes a outros já identificados para algumas espécies de anfíbios. Além disso, em todas as frações as massas representadas revelam assinaturas iônicas ainda não descritas.

As análises por espectrometria de massas da fração 1 indicam moléculas de baixa massa, variando entre 158,9593 a 566,9038 m/z, monocarregadas. As massas com valores entre 158,9593 m/z a 274,8869 m/z possivelmente são de alcalóides, já as massas maiores ou iguais a 299,1740 possivelmente são de esteróides (Fig. 33).

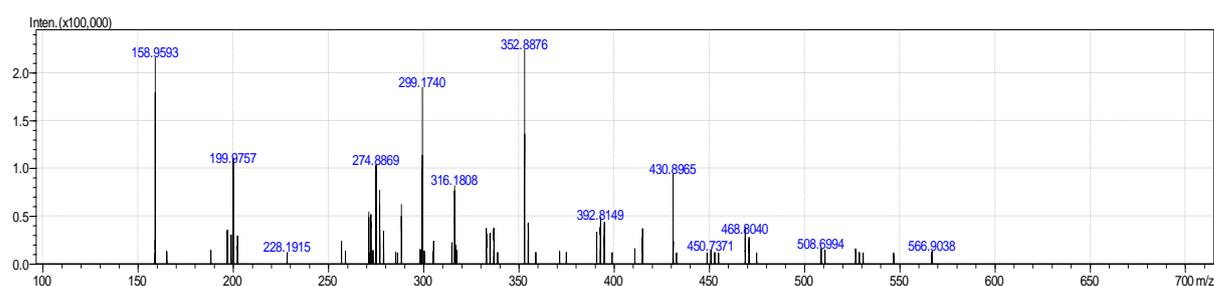


Figura 33 - Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na fração 1 obtida a partir da cutânea secreção de Cg.

As análises por espectrometria de massas da fração 2 evidenciaram poucas moléculas também de baixa massa. As massas representadas indicam que os compostos presentes na fração 2 possivelmente são esteróides (Fig. 34).

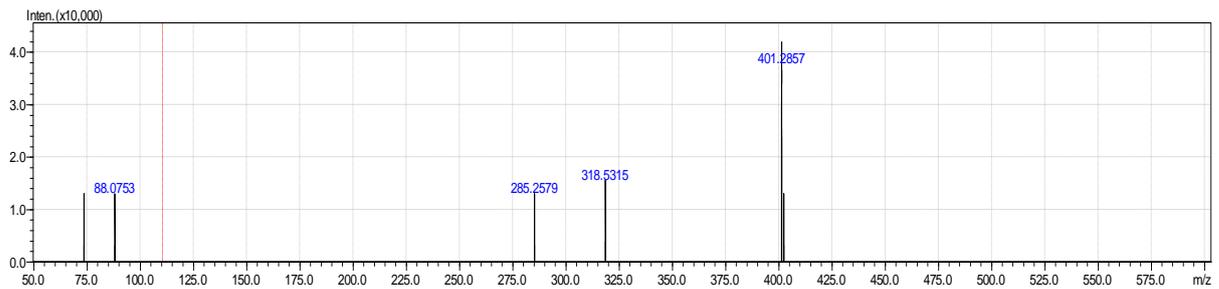


Figura 34 - Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na fração 2 obtida a partir da cutânea secreção de *Cg*.

A fração 2b revelou possuir moléculas de massas que variaram entre 146,0925 a 707,2321 m/z . A maioria das moléculas possuem íons monocarregados com exceção das massas 384,7703; 441,7849; 526,3603 m/z que possuem duas cargas. As massas menores de 146,0925 m/z até 229,1468 m/z possivelmente são de alcalóides, já as massas maiores possivelmente são de esteróides (Fig. 35).

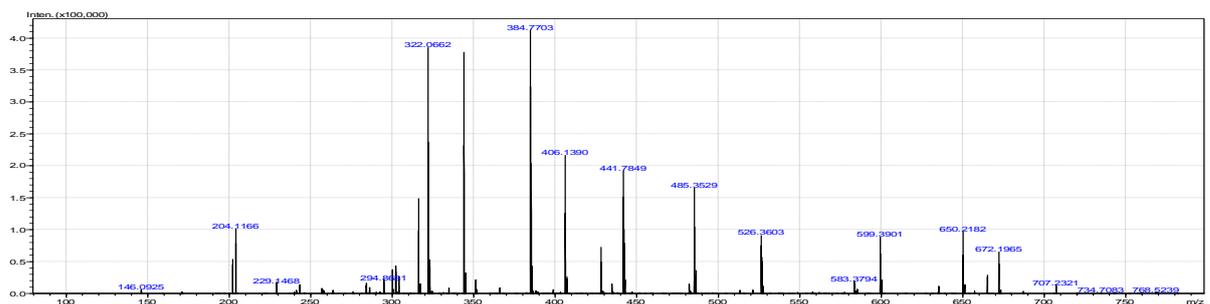


Figura 35 - Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na fração 2b obtida a partir da cutânea secreção de *Cg*.

As poucas moléculas que compõem a fração 3 são de baixa massa (m/z), monocarregadas e típicas de esteróides (Fig. 36).

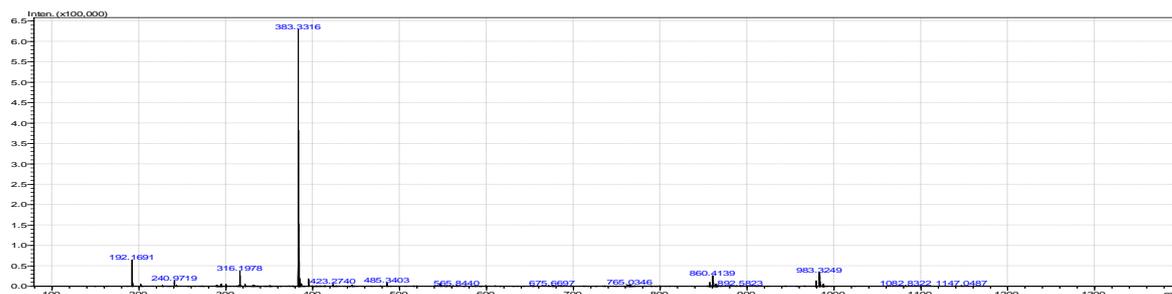


Figura 36 - Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na fração 3 obtida a partir da cutânea secreção de *Cg*.

A fração 4 revelou possuir moléculas de massas moleculares que variaram entre 184,1645 a 409,3434 m/z . Os íons que se apresentam na forma de monocarregados, sendo que as massas possivelmente correspondem a esteróides (Fig. 37).

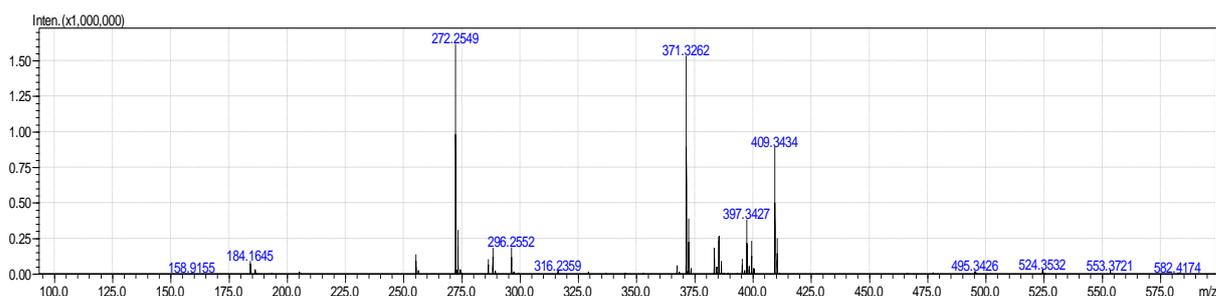


Figura 37 - Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na fração 4 obtida a partir da cutânea secreção de *Cg*.

A fração 5 revelou possuir poucas moléculas, de baixa massa e monocarregadas. Os dois íons mais evidentes representados são 206,1828 m/z , e o 411,3593 m/z , que provavelmente correspondem a um alcalóide e um esteróide, respectivamente. Esse íon de massa 411,3593 m/z , além de estar presente na fração 5, também é encontrado nas frações 6/7 e 9 (Fig. 38).

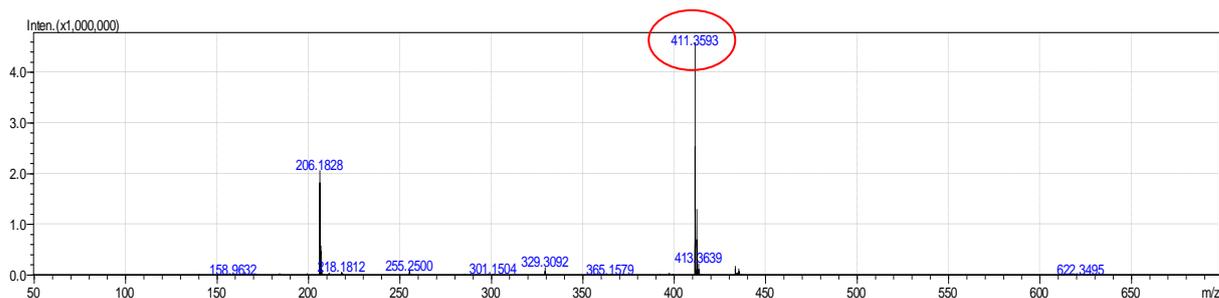


Figura 38 - Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na fração 5 obtida a partir da cutânea secreção de *Cg*.

A fração 6/7, também possui poucas moléculas, de baixa massa e são monocarregadas. Os dois íons mais evidentes representados são 437,3737 e 411,3600 m/z, este último deve ser uma variação do íon de massa 411,3593 m/z encontrada na fração 5 e provavelmente também seja um esteróide (Fig. 39).

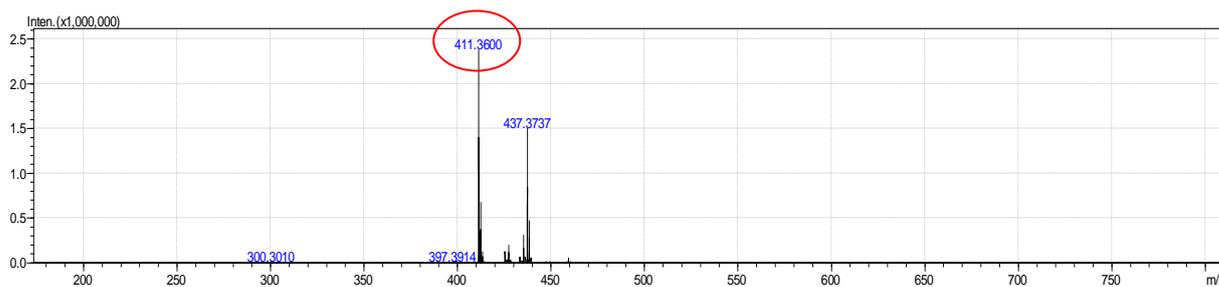


Figura 39 - Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na fração 6/7 obtida a partir da cutânea secreção de *Cg*.

A fração 8 revelou possuir moléculas de massas que variaram entre 104,9917 a 701,3751 m/z. As moléculas possuem íons monocarregados, sendo que as massas devem, também, corresponder a alcalóides e esteróides (Fig. 40).

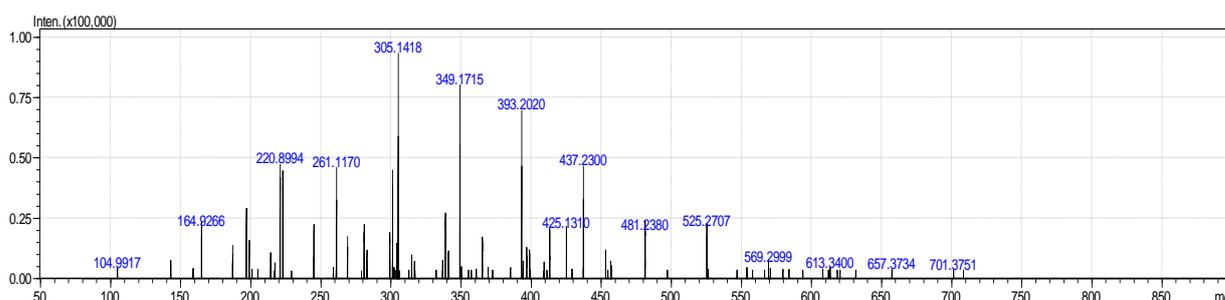


Figura 40 - Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na fração 8 obtida a partir da cutânea secreção de *Cg*.

A fração 9 possui moléculas de massas que variam entre 206,1837 a 439,3883 m/z. As moléculas possuem íons monocarregados. As massas representadas possivelmente são de esteróides. O íon de massa 411,3569 m/z, que está presente na fração 9, também é encontrado nas frações 5 e 6/7 (Fig. 41).

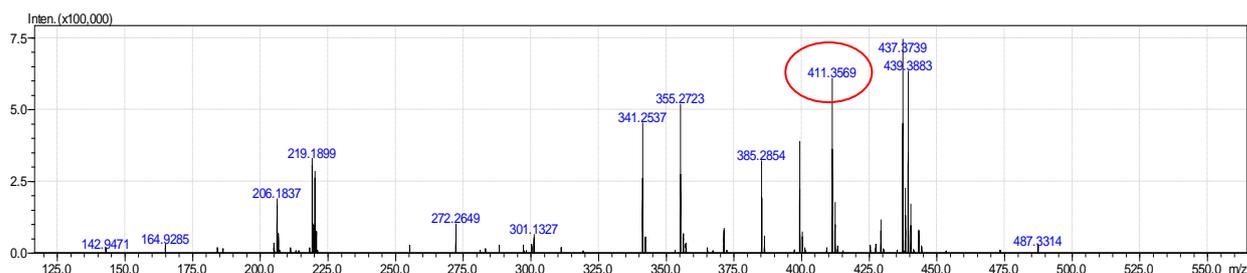


Figura 41 - Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na fração 9 obtida a partir da cutânea secreção de *Cg*.

A fração 10 revelou possuir moléculas de massas que variam entre 355,2751 a 511,2539 m/z, que mostram íons não compartilhados com outras frações (Fig. 42).

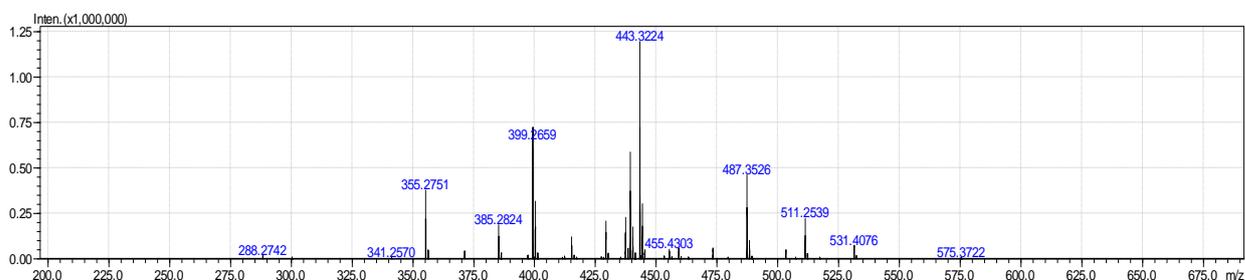


Figura 42 - Representação das massas (m/z) dos compostos presentes na fração 10 obtida a partir da cutânea secreção de *Cg*.

4.2.4. Ensaio de atividades peptidásicas e enzimáticas

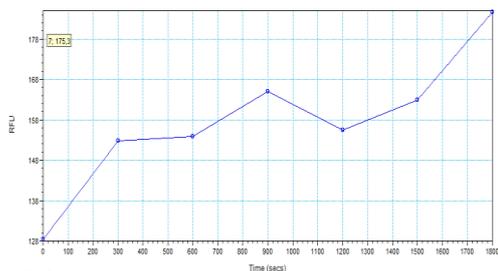
A secreção cutânea de *Cg* foi testada em substratos fluorogênicos, que permitem verificar a presença de atividade enzimática. Foram utilizados os substratos Abz-GPLGWARQ-EDDnp, Abz-GPQGWARQ-EDDnp, ambos para avaliação de atividade metalopeptidásica, Z-R-MCA, para avaliação de atividade de

serinopeptidases, e Abz-GIVRAK(Dnp), para avaliação de cisteinopeptidases. Esses substratos foram escolhidos para avaliação dessas 3 classes de enzimas, pois são as mais abundantes nas secreções animais. A secreção cutânea bruta de *Cg* (5 µg/mL) foi capaz de clivar os dois substratos para metalopeptidases, além do Abz-GIVRAK(Dnp), indicando a presença dessas classes de enzimas na secreção, porém não houve atividade enzimática com o uso do substrato Z-R-MCA, indicando a ausência de serinopeptidases. A figura 43 A, B, C e D mostra a clivagem do substrato pelas enzimas contidas na secreção bruta de *Cg* ao longo do tempo, indicando a presença de enzimas proteolíticas.

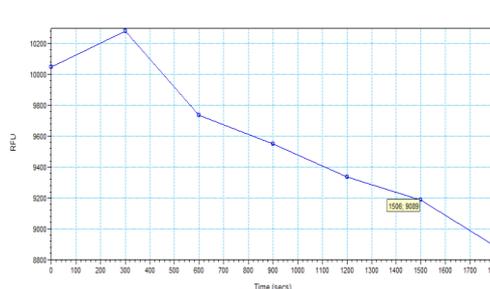
A atividade enzimática também foi testada por zimografia para os substratos caseína, gelatina, fibrinogênio e ácido hialurônico. A secreção de *Cg* na concentração de 20 µg/20 µL apresentou atividade apenas para os substratos fibrinogênio e ácido hialurônico, na região entre 50 e 37 kDa (Fig. 44).

Devido ao resultado negativo para a atividade caseinolítica e gelatinolítica, a zimografia foi novamente realizada utilizando-se gel nativo, sem SDS, a fim de se descartar a possibilidade de interferência desse componente na atividade das metalopeptidases presentes na secreção. A similaridade dos resultados com e sem o SDS confirmou a ausência dessas duas atividades.

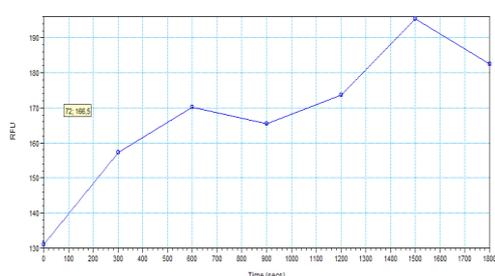
A) Abz-GPLGWARQ-EDDnp



B) Z-R-MCA



C) Abz-GPQGWARQ-EDDnp



D) Abz-GIVRAK(Dnp)

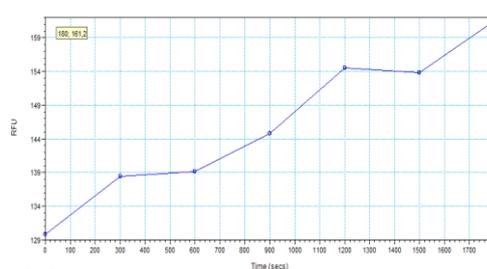


Figura 43 - Atividade enzimática da secreção bruta de *Cg* após a incubação com substratos fluorogênicos sintéticos, sendo (A) Abz-GPLGWARQ-EDDnp, (B) Z-R-MCA, (C) Abz-GPQGWARQ-EDDnp e D) Abz-GIVRAK(Dnp).

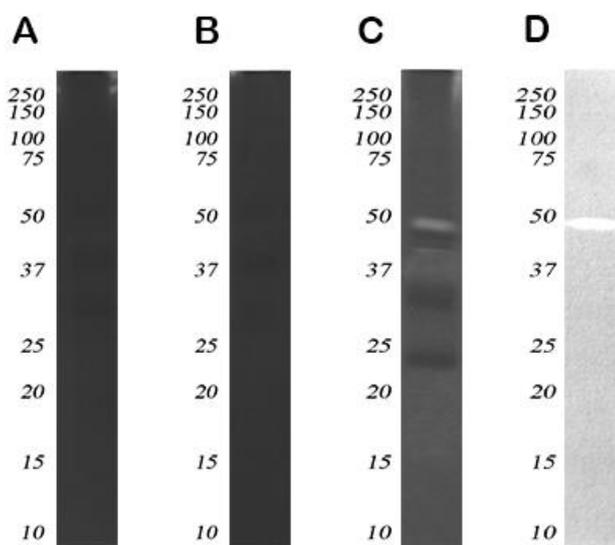


Figura 44 - Zimografia para avaliar a presença de atividade caseinolítica (A), gelatinolítica (B), fibrinogenolítica (C) e hialuronidásica (D) na secreção de *Cg* (20 µg/20 µL). A secreção não apresentou atividade caseinolítica e gelatinolítica, que pode ser observada nos géis A e B. Nos géis C e D a presença de bandas mais claras entre 50 e 37 kDa mostra que a secreção possui atividade fibrinogenolítica e hialuronidásica respectivamente. Os números a esquerda representam os marcadores de massa molecular entre 250 a 10 kDa.

4.3. Estudo das atividades tóxicas geradas pela secreção cutânea bruta de *Cg*

4.3.1. Atividade edematogênica

A secreção cutânea de *Cg* foi capaz de induzir edema em todas as doses testadas. No tempo de 0,5 h já foi observado intenso edema que se manteve até 1 h. Após 2 h já é possível verificar o início da diminuição do edema em todas as doses testadas. Nas doses 32 e 8 µg o edema perdurou até 96 horas após a injeção, sendo que na menor dose de 0,125 µg, o edema foi somente detectado até 4 horas após a injeção (Fig. 45).

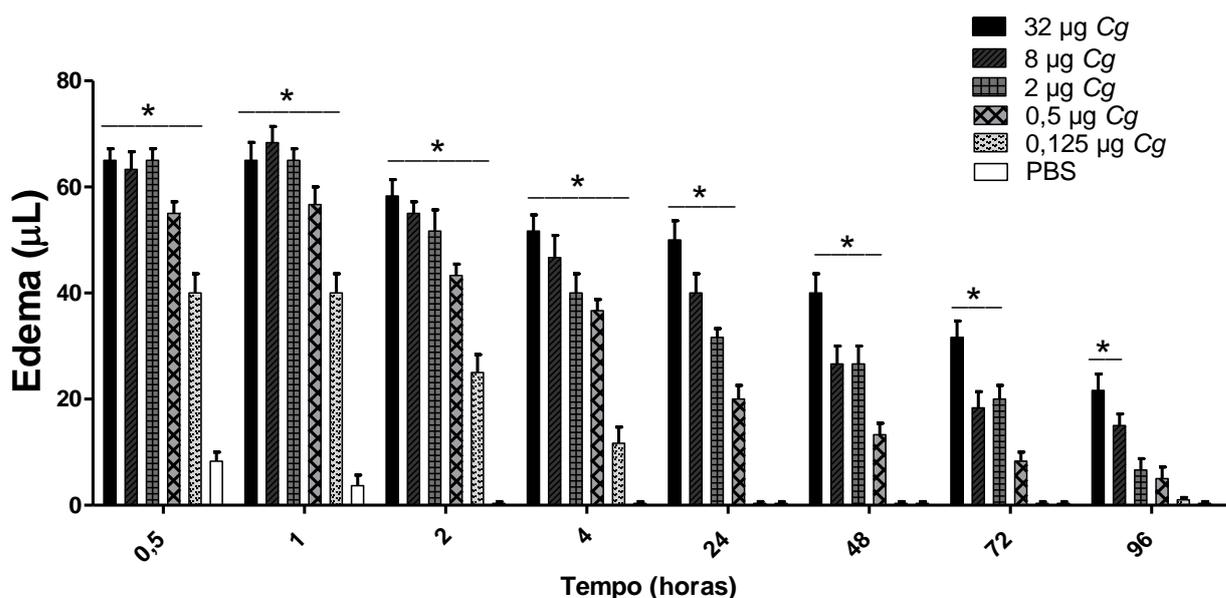


Figura 45 - Atividade edematogênica induzida pela secreção de *Corythomantis greeningi* (*Cg*). Animais foram injetados com diferentes concentrações da secreção *Cg* (32; 8; 2; 0,5 e 0,125 µg/30 µL) ou PBS como controle negativo. O edema foi calculado nos tempos de 0,5; 1; 2; 4; 24; 48, 72 e 96 h após a injeção pela diferença de volume (µL) das patas dos animais antes e depois da injeção. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. (*) Diferenças estatísticas significantes comparando as diferentes concentrações da secreção com o PBS ($p < 0,05$).

Os experimentos realizados para determinar a capacidade de induzir edema e verificar sua dinâmica ao longo do tempo foram realizados com as 10 frações

purificadas a partir da secreção cutânea bruta de *Cg*. Os resultados revelaram que as frações 1, 2, 5, 6/7, 9 e 10 apresentaram atividade edematogênica. A fração 5 revelou ser capaz de induzir uma atividade edematogênica mais potente quando comparada com as demais frações (Fig. 46).

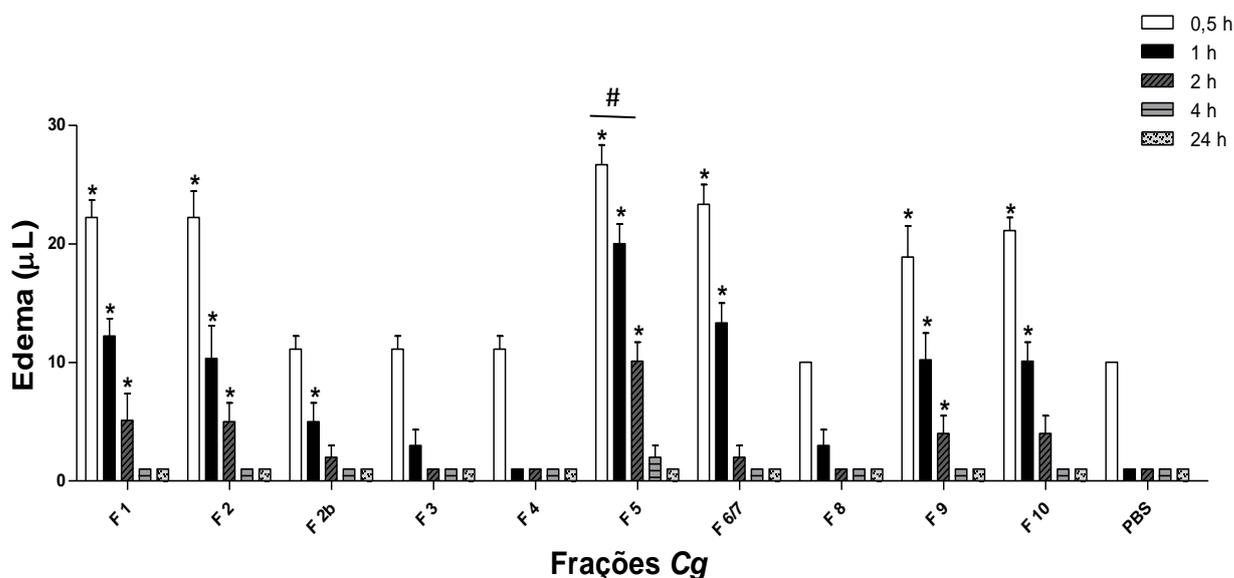


Figura 46 - Atividade edematogênica induzida pelas frações obtidas da secreção de *Corythomantis greeningi*. Animais foram injetados com 10 frações todas na mesma concentração de 0,2 µg/30 µL ou PBS como controle negativo. O edema foi calculado nos tempos de 0,5; 1; 2; 4; 24 h após a injeção pela diferença de volume (µL) das patas dos animais antes e depois da injeção. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. (*) Diferenças estatísticas significantes comparando as diferentes frações com o PBS ($p < 0,05$) nos diferentes tempos. (#) Fração com maior potência edematogênica ao ser comparada com as demais frações.

4.3.2. Atividade nociceptiva

A secreção cutânea de *Cg* mostrou ser altamente nociceptiva, pois foi capaz de induzir nocicepção em todas as doses testadas. A menor dose (0,125 µg/30 µL) utilizada foi capaz de induzir nocicepção por aproximadamente 50 s, sendo este um tempo considerável para uma dose tão baixa. O pico de nocicepção induzida pela secreção de *Cg* foi atingida na dose de 8 µg (Fig. 47).

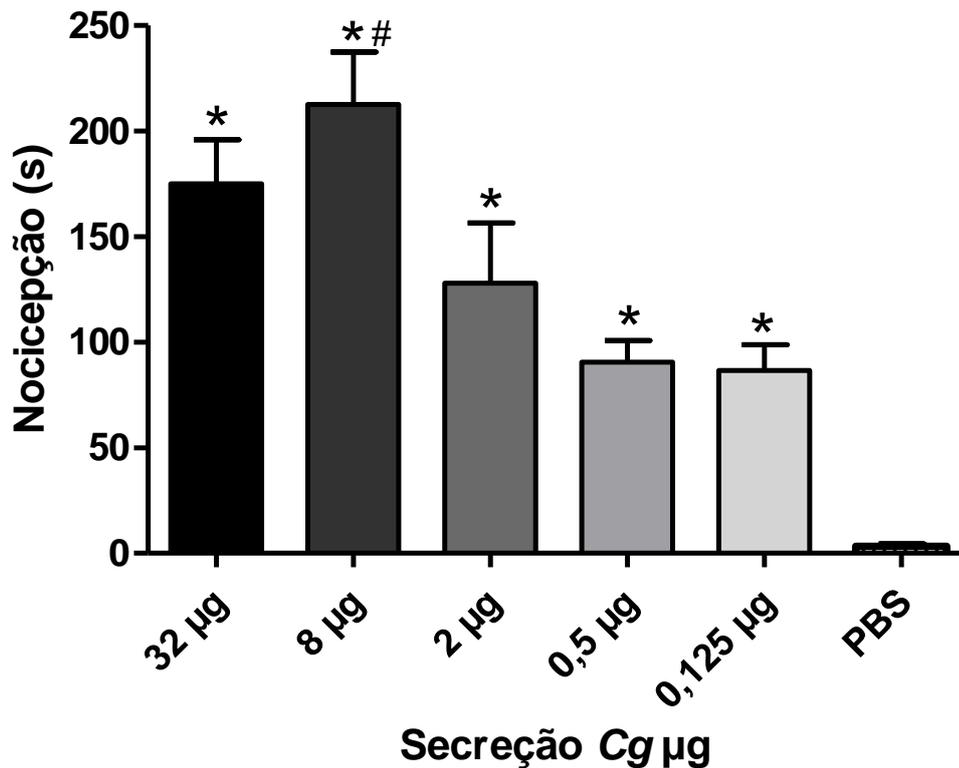


Figura 47 - Atividade nociceptiva induzida pela secreção de *Corythomantis greeningi*. Os animais foram injetados com as concentrações (32; 8; 2; 0,5; 0,125 µg/30 µL) ou PBS controle negativo. A avaliação da atividade nociceptiva foi feita cronometrando o tempo (segundos) que os animais lambiam a pata injetada. (*) Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre a nocicepção induzida pelas diferentes concentrações quando comparado com o controle negativo (PBS), (#) Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) da nocicepção induzida pela concentração de 8 µg quando comparado com outras doses (32, 2, 0,5 e 0,125 µg/30 µL).

Os experimentos realizados com as 10 frações purificadas revelaram que as frações 1, 2, 2b 5, 6/7, 8 e 10 foram capazes de induzir atividade nociceptiva (Fig. 48). Entretanto, a nocicepção provocada pelas frações foi menos intensa quando comparada com a causada pela secreção bruta. As frações 6/7 e 10 foram capazes de induzir uma nocicepção mais intensa ao serem comparadas com as demais frações positivas para a atividade (1, 2, 2b, 5 e 8) (Fig. 48).

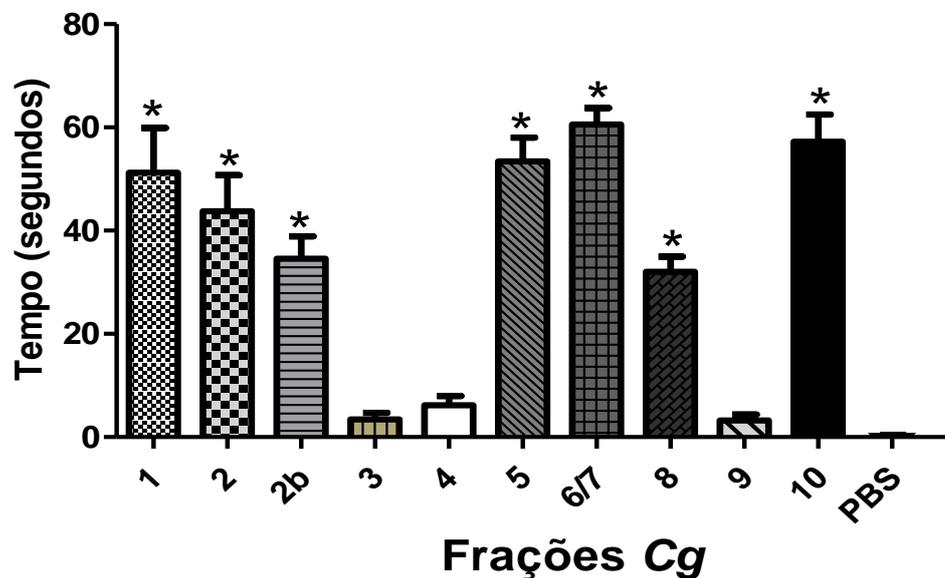


Figura 48 - Atividade nociceptiva induzida pelas frações purificadas da secreção de *Corythomantis greeningi*. Os animais foram injetados com 10 frações do veneno todas na mesma concentração de 0,2 µg/30 µL ou com PBS controle negativo. A avaliação da atividade nociceptiva foi feita cronometrando o tempo (segundos) que os animais lambiam a pata injetada. (*) Diferenças estatísticas significantes comparando as diferentes concentrações da secreção com o PBS ($p < 0,05$).

4.3.3. Viabilidade celular e atividade antitumoral

A secreção cutânea de *Cg* mostrou atividade citotóxica para as linhagens de células B16F10 (melanoma murino) e L929 (fibroblasto murino). Ao se comparar as linhagens celulares foi observado que houve uma maior inibição do crescimento celular na linhagem B16F10 do que na L929, sendo as doses efetivas (IC50) 4,6 µg/mL e 11,9 µg/mL respectivamente (Fig. 49 e 50). Estatisticamente foram encontradas diferenças significativas na inibição do crescimento celular entre as linhagens testadas B16F10 e L929.

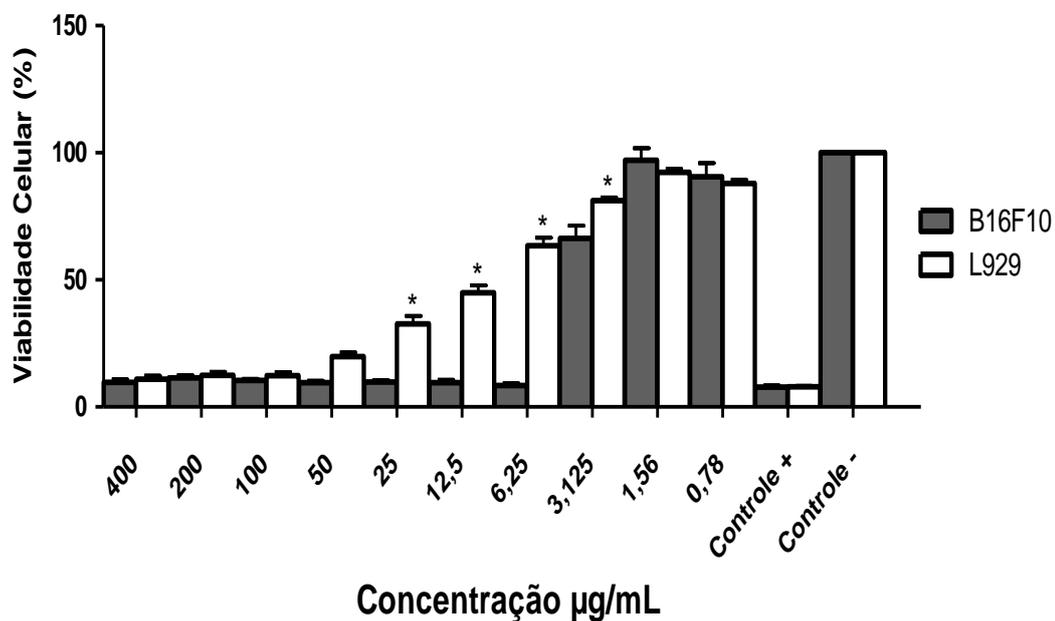


Figura 49 - Atividade citotóxica da secreção de *Corythomantis greeningi* para as linhagens B16F10 (melanoma murino) e L929 (fibroblasto murino). As células foram incubadas com diferentes concentrações da secreção durante 24 h a 37 °C e a viabilidade celular foi obtida por ensaio de MTT. Houve uma maior inibição no crescimento celular na linhagem tumoral B16F10. (*) diferenças significativas ($p < 0,01$) comparando as concentrações testadas em B16F10 versus L929. Como controle positivo foi utilizado veneno de *Bothrops jararaca* e o controle negativo apenas meio de cultura RPMI.

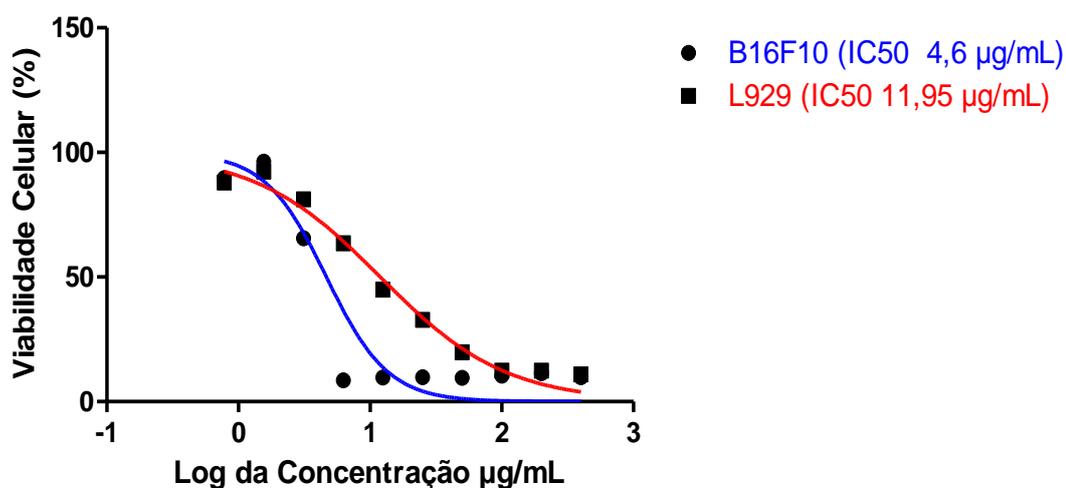


Figura 50 - Curva de inibição de crescimento celular causado pela secreção cutânea bruta de *Corythomantis greeningi* e as doses mínimas efetivas que matam 50% das células (IC50) para B16F10 e L929.

4.3.4. Atividade antimicrobiana

A secreção cutânea bruta de *Cg* foi submetida a testes de inibição de crescimento microbiano por meio de teste de difusão em Ágar e determinação da concentração mínima inibitória (MIC). A secreção de *Cg*, por meio das metodologias utilizadas revelou não possuir atividade antimicrobiana para nenhuma das cepas testadas.

5. DISCUSSÃO

Apesar de suas características pouco favoráveis, a Caatinga apresenta uma anurofauna que pode ser considerada exuberante para um ambiente semi-árido (NAVAS et al., 2004). A espécie *casque-head Corythomantis greeningi* (Cg) é endêmica da Caatinga e mostra uma série de adaptações morfo-fisiológicas que permitiram seu sucesso nesse ambiente (JARED et al., 1999). Talvez, as mais evidentes sejam a co-ossificação da derme de sua cabeça tornando-a cascuda e o seu comportamento fragmótico, ambas importantes para evitar a perda d'água por evapotranspiração (JARED et al., 1999; KATCHBURIAN et al., 2001).

O comportamento fragmótico, para esta espécie, representa um papel muito importante para a defesa contra predadores, uma vez que esses animais ao fecharem a entrada do abrigo com a cabeça expõem um acúmulo de glândulas de veneno que estão associadas a espículas ósseas (JARED et al., 1999; JARED et al., 2005; KATCHBURIAN et al., 2001). A localização dessas glândulas e a presença das espículas facilitam o envenenamento de potenciais predadores, que tentem capturar esses anuros quando estão em seus abrigos (JARED et al., 1999). Sendo assim, visando uma melhor compreensão do papel da pele na biologia de Cg, realizamos um estudo detalhado da morfologia da pele e das características toxinológicas da sua secreção cutânea. Com esse trabalho visamos também fornecer subsídios para futuros estudos farmacológicos sobre a secreção cutânea dessa espécie.

A análise por microscopia de luz evidenciou que a pele e as glândulas cutâneas seguem o padrão básico já descrito para várias outras espécies de anfíbios anuros (DUELLMAN; TRUEB, 1986; TOLEDO; JARED, 1995; STEBBINS; COHEN, 1995). Qualitativamente observamos que a pele dorsal de Cg abriga uma maior quantidade de glândulas cutâneas, principalmente granulosas, quando comparada às demais regiões analisadas. As glândulas granulosas dos anfíbios são normalmente responsáveis pela produção de substâncias tóxicas e/ou impalatáveis (TOLEDO; JARED, 1995; MELZER et al., 2013). Assim, protegida por essas glândulas, a pele dorsal da espécie Cg deve ser de fato capaz de promover

uma defesa química eficiente contra predadores, confirmando o que já foi observado por Jared e colaboradores em 2005.

Examinadas por microscopia eletrônica de transmissão, as glândulas granulosas revelaram-se, em grande parte, homogêneas em relação à morfologia, possuindo uma ultra-estrutura complexa. Os seus grânulos de secreção são muito peculiares estruturalmente, possuindo compartimentos de diferentes eletrodensidades, o que deve refletir na segregação das diferentes substâncias que compõem o veneno. Entre os anuros existe uma grande diversidade morfológica nas glândulas granulosas e conseqüentemente em seus grânulos (DELFINO et al., 1998; DELFINO et al., 1999; DELFINO et al., 2001a; DELFINO et al., 2002; NOSI et al., 2002; LENZI-MATTOS et al., 2005; DELFINO et al., 2006; CHAMMAS et al., 2014). O padrão estrutural dos grânulos de secreção observado em *Cg* assemelha-se ao já descrito para *Hyla setentrionalis*, onde o envoltório eletrodense foi definido como “córtex” e o material interno pouco eletrodense como “medula” (DELFINO et al., 2001a). Além disso, os grânulos das glândulas mucosas Gm1 de *Cg*, revelaram uma textura característica muito semelhante ao padrão dos grânulos encontrados nas glândulas mucosas da espécie australiana *Litoria ewingii* (MELZER et al., 2013).

Além de glândulas, na pele dos anuros existe uma estrutura comumente encontrada denominada camada calcificada ou camada de Eberth-Kastschenko. Essa camada já foi bem caracterizada química e morfológicamente em trabalhos anteriores (JARED et al., 2005; KATCHBURIAN et al., 2001). No entanto, a função da camada calcificada ainda não é bem compreendida (JARED, 1993c; JARED et al., 2005; KATCHBURIAN et al., 2001). Alguns autores relacionam essa estrutura à diminuição da perda de água pela pele e/ou a uma reserva natural de cálcio do organismo (JARED, 1993c; JARED et al., 2005; KATCHBURIAN et al., 2001; NAVAS et al., 2004).

Na espécie *Cg* a camada calcificada é bem desenvolvida (JARED et al. 2005), sendo observada nas regiões dorsal, onde é mais espessa, e ventral do corpo, estando ausente na região inguinal. A presença de uma camada calcificada espessa na região dorsal pode estar associada ao fato da espécie em estudo ser endêmica da Caatinga, precisando enfrentar longos períodos de seca (JARED et al., 1999; NAVAS et al., 2004). Dessa forma, associada ao comportamento fragmótico e à cabeça co-ossificada, a camada calcificada deve de fato representar um importante

elemento no aparato anti-dessecação dessa espécie, como já afirmado por Jared e colaboradores (2005).

Além da ausência da camada calcificada, a região inguinal, quando analisada por histologia e por MEV, apresentou uma epiderme muito fina e com uma imensa quantidade de capilares sanguíneos que se invaginam na epiderme, chegando muito próximos da superfície da pele. Nos anuros sabidamente a região inguinal é uma área do corpo responsável pela absorção ativa de água através das verrucas hidrofílicas, típicas da pele dessa região (DUELLMAN; TRUEB, 1986; NAVAS et al., 2004). No caso de *Cg*, a exuberância dessa rede de capilares tão próximas à superfície da epiderme deve representar uma adaptação importante para tornar a absorção de água mais rápida e eficiente no ambiente seco de Caatinga.

Associado ao sistema formado pelas verrucas hidrofílicas e os capilares sanguíneos, que permeiam a epiderme, observamos por MEV que a superfície da pele da região ventral e especialmente da região inguinal, possuem um relevo que sugere fortemente a formação de pequenos canais condutores que poderiam dar maior eficiência ao sistema de captação de água proveniente principalmente do orvalho durante a atividade noturna e nas primeiras horas do dia. Sistemas semelhantes já foram observados em outros anuros tais como *Rhinella ornata* e *R. icterica* (BRITO-GITIRANA; AZEVEDO, 2005; FELSEMBURGH et al., 2009). Essa água conduzida para a região inguinal seria, então, absorvida através das verrucas hidrofílicas, estruturas já bem conhecidas nos anuros, típicas dessa região do corpo e especializadas na absorção ativa de água (NAVAS et al., 2004; PEREIRA, 2009). Além disso, as verrucas hidrofílicas devem aumentar a superfície o que favorece ainda mais a capacidade de absorção de água pela pele.

Para melhor avaliar a possível origem dessas adaptações morfológicas na pele inguinal de *Cg*, se foram decorrentes de pressões ambientais ou se impostas filogeneticamente, avaliamos de forma semelhante a pele da região inguinal da espécie também *casque-head* *Aparasphenodon bruno* (*Ab*), que é filogeneticamente próxima a *Cg*, porém habitando o ambiente úmido de Mata Atlântica, bem contrastante com a Caatinga (resultados não apresentados). Essa comparação mostrou que as verrucas hidrofílicas de *Ab* também possuem em sua superfície microprojeções epidérmicas. No entanto, elas não são tão proeminentes, não chegando a formar canais tão evidentes como o que foi observado em *Cg*. Além

disso, a partir da análise histológica e por MEV de cortes transversais de pele da região inguinal verificamos que a rede de capilares presentes em *Ab* não é exuberante como a de *Cg*, não apresentando projeções que adentram a epiderme. Assim, comparando as duas espécies, *Cg* e *Ab*, as estruturas presentes na pele da região inguinal de *Cg*, pelo menos nessa avaliação prévia, parecem estar em grande parte relacionadas à adaptação ao estresse hídrico a que essa espécie é submetida na Caatinga.

Em relação à defesa contra predadores, os componentes comportamentais e morfológicos do mecanismo de defesa dos anuros é complementada pela maquinaria de síntese de compostos biologicamente ativos em suas glândulas cutâneas, especialmente nas glândulas granulosas ou de veneno (DALY, 1995; TOLEDO; JARED, 1995; CLARKE, 1997; CONCEIÇÃO et al., 2007a; MAILHO-FONTANA et al., 2014). Os estudos sobre as atividades biológicas desses venenos vêm atraindo muita atenção nas últimas décadas, já que a infinidade de moléculas que os compõem pode eventualmente ser utilizada para fins farmacológicos (CONLON; MECHKARSKA, 2014). Além disso, os efeitos desses venenos podem servir como chave para uma melhor compreensão do mecanismo de defesa química dos anuros (DALY, 1995; TOLEDO; JARED, 1995; CLARKE, 1997; CONLON et al., 2007a, b, c; MAILHO-FONTANA et al., 2014).

Os principais componentes tóxicos e biológicos encontrados na secreção cutânea dos anuros incluem principalmente os efeitos cardiotoxícos, neurotóxicos, alucinógenos, próinflamatórios, nociceptivos, edematogênicos, antimicrobianos, antifúngicos, anti-inflamatórios, antitumorais e anestésicos (DALY; WITKOP, 1966; DALY, 1987; ERSPAMER et al., 1993; TOLEDO; JARED, 1995; PRATES; BLOCH Jr, 2000; RINALDI, 2002; CONCEIÇÃO et al., 2006, CONCEIÇÃO et al., 2007a, b, c, CONCEIÇÃO et al., 2009; CONLON et al., 2007a, b, c; TEMPONE et al., 2007; TEMPONE et al., 2008; SCIANI et al., 2013; MAILHO-FONTANA et al., 2014; CONLON; MECHKARSKA, 2014).

A secreção cutânea dos hilídeos (pererecas) parece apresentar uma variação muito grande quanto à sua composição, pelo menos entre espécies de gêneros diferentes (DALY, 1995; CLARKE, 1997; CONLON et al., 2007a, b, c). Dentre esses animais, o gênero *Phyllomedusa* é um dos mais estudados, possuindo uma secreção cutânea já bem caracterizada bioquimicamente, que mostra que

compostos opióides e peptídeos detêm a maior parte dos efeitos biológicos para essa espécie (CONCEIÇÃO et al., 2006; CONCEIÇÃO et al., 2007a, b, c; CONCEIÇÃO et al., 2009). Além da *Phyllomedusa*, a secreção cutânea de anuros de outros gêneros como *Rhinella*; *Scinax*, *Dendrobates* e *Leptodactylus* têm sido muito estudados quanto à composição bioquímica e a presença de atividades biológicas (MEYER; DALY, 1976; PERRY, 2000; TERRENI et al., 2003; KING et al., 2005; GARG et al., 2007; LIBÉRIO, 2008; SCIANI et al., 2013a; LIBÉRIO et al., 2014).

Levando em consideração o conhecimento prévio de nosso grupo sobre a biologia da espécie *Cg* e de experiências casuais com os efeitos de sua secreção cutânea durante expedições de coleta (informação verbal)², realizamos testes de atividade biológica onde demonstramos que a secreção bruta foi capaz de induzir intensa nocicepção e edema prolongado, além de apresentar atividade citotóxica. Os dados obtidos para as atividades tóxicas (edema e nocicepção) corroboram com o trabalho realizado anteriormente por Jared e colaboradores (2005), onde o teste de letalidade com a secreção (DL₅₀), também, revelou um alto grau de toxicidade. A partir desses efeitos causados pela secreção bruta, realizamos nesse trabalho o fracionamento da secreção por HPLC, onde os principais picos obtidos foram analisados quanto à composição bioquímica e, então, foram novamente testados para nocicepção e edema.

As técnicas bioquímicas utilizadas no presente estudo indicaram a presença de alcalóides, esteróides e proteínas, uma vez que as massas majoritárias encontradas na secreção são compatíveis as massas desses grupos químicos, conforme já descrito para outros anfíbios (LIU et al., 2010). Por outro lado, não foram encontradas massas que correspondam a peptídeos, que geralmente constituem uma classe de substâncias muito comum na secreção de pererecas. Além disso, mesmo após o fracionamento do veneno, a atividade inflamatória e nociceptiva ainda puderam ser observadas, o que mostra a ação de moléculas atuando isoladamente. Apesar do trabalho não ter avançado até a caracterização completa dessas moléculas, levando-se em conta estudos anteriores (LIU et al., 2010),

² Notícia fornecida pelo Dr. Carlos Jared no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, em São Paulo, em Fevereiro de 2013.

verificamos que as principais moléculas responsáveis por essas atividades possuem massas, em sua maioria, compatíveis com esteróides e com alguns alcalóides.

Com o fracionamento, obtivemos seis frações capazes de induzir edema (1, 2, 5, 6/7, 9 e 10) e sete frações (1, 2, 2b, 5, 6/7, 8 e 10) indutoras de nocicepção. Contudo, somente as frações 9 (edema) e 2b (nocicepção) induziram apenas uma das atividades. Além disso, dentre as 10 frações testadas apenas a 3 e a 4 não induziram nenhum dos efeitos biológicos testados nesse trabalho. Adicionalmente verificamos que as frações 5, 6/7 e 9 compartilham íons de massa semelhante (411 m/z), possivelmente representando um mesmo esteróide. Esse fato poderia explicar a atividade edematogênica semelhante verificada entre as frações 5, 6/7 e 9 e para a atividade nociceptiva entre as frações 5 e 6/7.

Assim como observado para *Cg*, vários estudos revelam que as proteínas, alcalóides e esteróides da secreção cutânea dos anuros detêm a maior parte das atividades biológicas. Dentre esses compostos, os alcalóides têm sido alvo de muitos estudos, por serem indutores principalmente de atividades biológicas que estão ligadas ao sistema nervoso (DALY et al., 1987; SILVA, 2009; CARVALHO, 2008; CUNHA-FILHO, 2010). A epibatidina, por exemplo, é um alcalóide que atua em receptores opióides e foi identificada a partir da secreção de um anfíbio colombiano da espécie *Epipedobates tricolor* (DALY et al., 1987; LAZARUS et al., 1994; DALY, 1995). No caso de *Cg*, dentre as frações obtidas, as frações 2b, 5 e 10 durante a realização dos experimentos demonstraram a capacidade de induzir nocicepção neuropática, identificada pela intensa nocicepção apresentada pelos animais nos instantes iniciais dos experimentos. Por esse motivo é possível que essas frações contenham alcalóides que atuem diretamente em receptores nociceptivos.

Por outro lado, moléculas como os esteróides, também, são capazes de atuar na nocicepção como, por exemplo, os bufadienólídeos opióides de sapos bufonídeos, que são capazes de diminuir o limiar da nocicepção (SILVA, 2009; VITOR, 2009; CARVALHO, 2008; CUNHA-FILHO, 2010). Apesar da secreção cutânea de *Cg* possuir vários esteróides, identificados nas frações 1, 2, 2b, 6/7, 8 e 10, ao contrário dos bufadienólídeos analgésicos, revelaram possuir a capacidade de induzir intensa nocicepção, que possivelmente é provocada por processos

inflamatórios, pois além da nocicepção imediata foi observado que os animais permaneciam com nocicepção durante todo o tempo de experimento.

A secreção cutânea bruta de *Cg*, além de nocicepção, foi capaz de induzir atividade edematogênica intensa e prolongada permanecendo até 96 horas após a injeção na pata dos camundongos. Esse tempo tão longo do processo inflamatório deve ser desencadeado pelas moléculas presentes no veneno, que promovem a liberação de mediadores inflamatórios. Por outro lado, constatamos que muitas das moléculas que compõem o veneno de *Cg* possuem dupla ação, sendo edematogênicas e nociceptivas simultaneamente, como foi o caso das frações 1, 2, 5, 6/7 e 10 fato que já foi observado em outros anfíbios, bem como em outros animais venenosos (SCIANI, 2012; CONCEIÇÃO et al., 2007a,b; MAILHO-FONTANA et al., 2014).

Durante muito tempo os estudos sobre as atividades biológicas de secreções se voltaram apenas para os peptídeos, que eram considerados os grandes responsáveis pelas atividades tóxicas da secreção cutânea de anuros, bem como de outros animais (CONCEIÇÃO et al., 2007; SCIANI, 2012). Atualmente os estudos relacionados à ação de esteróides e alcalóides vêm aumentando, sendo, no entanto, mais voltados para as propriedades farmacológicas e deixando uma lacuna sobre as atividades tóxicas dessas classes de compostos. Recentemente foram isolados alguns esteróides presentes na secreção das glândulas parotóides de sapos do gênero *Rhinella*, como os bufadienólídeos analgésicos identificados em *Rhinella jimi* e *R. schneideri* (CUNHA-FILHO, 2010; SILVA, 2009) e os alcalóides anti-ráxicos, também isolados da secreção de *R. jimi* (BARROS, 2013). Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho auxiliam na compreensão do poder tóxico dos esteróides e alcalóides e a sua importância no mecanismo de defesa dos anuros contra predadores.

Como foi elucidado neste trabalho, a secreção bruta de *Cg* é composta por muitas moléculas, que provavelmente atuam por meio de diferentes mecanismos de ação que quando somados potencializam os efeitos nociceptivo e edematogênico da secreção. Outra hipótese possível é que possa existir uma interação entre as moléculas que compõem a secreção promovendo uma atividade mais intensa e duradoura nos testes utilizando a secreção bruta.

Ao analisarmos esses efeitos biológicos em prol da defesa química, concluímos que o veneno deve ser eficaz em afastar possíveis predadores que, ao sofrerem os efeitos dessas toxinas, aprendem a evitar esse tipo de presa em encontros futuros. Soma-se a isso a ação mecânica da peculiar cabeça de *Cg*, que além de muito resistente por ser co-ossificada com o crânio, é totalmente ornamentada de espinhos ósseos entremeados por glândulas de veneno, que são semelhantes ao do restante da pele, mas de maiores proporções (JARED et al., 2005).

A secreção cutânea além do seu papel defensivo, muito importante para a vida desse animal em seu ambiente natural, também apresentou uma possível atividade antitumoral, pelo menos para a linhagem de célula testada neste trabalho. Devido à resistência de alguns tumores às terapias hoje disponíveis, a busca por novos antitumorais cresce. Nesse contexto, os compostos de origem natural podem oferecer novas oportunidades de tratamento (PAIOLI, 2011). Dentre esses compostos naturais, já foram identificadas moléculas com efeito antitumoral como a crotoxina, obtida do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* (Paioli, 2011). Dentre os anfíbios, já se obteve atividade antitumoral, por exemplo, a partir da secreção cutânea do anuro sulamericano *Leptodactylus labyrinthicus* (LIBÉRIO, 2008; PAIOLI, 2011; LIBÉRIO et al., 2014). A maioria desses compostos antitumorais são peptídeos ou proteínas que interagem com as membranas de microorganismos ou células tumorais ocasionando na grande maioria das vezes desequilíbrio osmótico levando à lise celular (HANCOCK; CHAPPLE, 1999; ZASLOFF, 2002; LIBÉRIO, 2008; SCIANI et al., 2013; LIBÉRIO et al., 2014).

Os dados apresentados para atividade antitumoral a partir da secreção cutânea de *Cg* revelaram que para as células de melanoma testadas nesse trabalho a secreção foi mais citotóxica do que para os fibroblastos normais. Assim, a secreção apresenta em teoria um potencial terapêutico antitumoral, mas devido ao pouco tempo, o mecanismo de ação desse possível composto não foi identificado. Recentemente, estudos realizados por Sciani e colaboradores (2013) revelaram que esteróides da família dos bufadienólídeos obtidos de extratos da pele das espécies *Rhaebo guttatus*, *Rhinella crucifer*, *Rhinella margaritifera*, *Rhinella major* e *Phyllomedusa hypochondrialis* são capazes de inibir o crescimento de células tumorais da linhagem MDA-MB-231. Assim como as espécies que foram utilizadas

por Sciani e colaboradores (2013), *Cg* também apresentou em sua secreção cutânea uma grande quantidade de esteróides que podem, portanto, estar envolvidos no maior efeito citotóxico detectado para células de melanoma (B16F10) em relação aos fibroblastos (L929).

Nos anuros grande parte dos peptídeos estudados até o momento possui ação antimicrobiana e foram isolados de espécies pertencentes às famílias *Hylidae*, *Ranidae* e *Leptodactylidae*, sendo que a maioria deles possui atividade antimicrobiana e representam um importante papel na imunidade inata que constitui a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, além de serem importantes para a angiogênese, reparo tecidual e processo inflamatório (HANCOCK; CHAPPLE, 1999; ZASLOFF, 2002; IZADOANAH; GALLO, 2005; LIBÉRIO, 2008; LIBÉRIO et al., 2014). Esses peptídeos, em geral, atuam interagindo com as membranas celulares dos microorganismos ou células tumorais ocasionando desequilíbrio osmótico e levando à lise celular (HANCOCK; CHAPPLE, 1999; ZASLOFF, 2002; LIBÉRIO, 2008).

Ao considerarmos que *Cg* passa longos períodos em abrigos para se proteger da dessecação acreditava-se que essa espécie seria uma forte candidata a apresentar atividade antimicrobiana na sua secreção cutânea (informação verbal)³. No entanto, não foi possível detectar essa atividade nos experimentos, que realizamos utilizando duas metodologias para cinco diferentes cepas bacterianas. Coincidentemente, essa secreção não apresentou peptídeos, que geralmente são os responsáveis pela atividade antimicrobiana, como discutido acima. Assim, a não detecção de peptídeos poderia estar de alguma forma relacionada com a ausência de atividade antimicrobiana na secreção cutânea de *Cg*. Não se pode descartar, porém, a possibilidade de que essa atividade possa ser revelada caso sejam utilizadas cepas bacterianas provenientes do ambiente da caatinga onde esses animais vivem.

Finalizando, com esse trabalho procuramos aprofundar o conhecimento sobre a espécie *Corythomantis greeningi* apresentando os detalhes morfológicos ultraestruturais da pele, aspectos do sistema de defesa química contra predadores, características bioquímicas da secreção cutânea e alguns efeitos biológicos

³ Notícia fornecida pelo Dr. Carlos Jared no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, em São Paulo, em Outubro de 2014.

causados pela sua secreção cutânea. Ainda, procuramos apresentar, a partir desses resultados, algumas possíveis aplicações farmacológicas dessa secreção. Os resultados obtidos, somados ao conhecimento prévio adquirido por outros autores, confirmaram que *Cg* é extremamente adaptada ao ambiente seco de modo a evitar a perda excessiva de água pela pele e maximizar a absorção de água disponível no ambiente. Além disso, revelou possuir um eficiente mecanismo de defesa química contra predadores, já que possui uma secreção que além de tóxica, causa dor intensa e edema, o que deve, em boa parte das vezes, interromper o ataque de predadores, além de desencorajar novos ataques em futuros encontros.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A partir dos dados morfológicos obtidos neste trabalho foi possível confirmar a adaptação do tegumento de *Corythomantis greeningi*, para a vida no ambiente seco da Caatinga;
- ✓ A estrutura morfológica do tegumento, em particular a da região inguinal, deve promover uma absorção muito eficiente da água presente no ambiente;
- ✓ A distribuição das glândulas, a composição química da secreção e as atividades biológicas testadas para a secreção cutânea de *Corythomantis greeningi* compõem um mecanismo de defesa química passiva deve ser extremamente eficiente contra predadores;
- ✓ A secreção é composta principalmente por esteróides e poucos alcalóides que são os principais responsáveis pelos efeitos biológicos observados;
- ✓ Os testes com a secreção cutânea apresentaram intensa atividade edematogênica e nociceptiva;
- ✓ Das dez frações testadas seis apresentaram atividade edematogênica (1, 2, 5, 6/7, 9 e 10) e sete apresentaram atividade nociceptiva (1, 2, 2b 5, 6/7, 8 e 10);
- ✓ Apenas as frações 3 e 4 apresentaram resultados negativos para todos os testes realizados, portanto as moléculas que compõem essas frações, não estão diretamente ligadas aos efeitos causados pela secreção;
- ✓ A secreção apresentou maior efeito citotóxico nas células de linhagem tumoral. Testes adicionais são necessários para melhor caracterizar a ação antitumoral da secreção de *Cg*.
- ✓ A secreção de *Cg*, por meio das metodologias utilizadas revelou não possuir atividade antimicrobiana para nenhuma das cepas testadas;
- ✓ *Cg* revelou possuir um eficiente mecanismo de defesa química contra predadores, uma vez que possuir uma secreção que causa intensa

nocicepção é muito mais pedagógico, no sentido de evitar que predadores ataquem indivíduos da espécie *Cg* em encontros futuros.

7. REFERÊNCIAS

BAGNARA, J. T. **Pigment cells In: Biology of the Integument.** Vol.2 - Vertebrates. Edit by Bereiter-Hahn, J; Matoltsy, A. G; Richards, K. S; Springer, Berlin, 1986, p.137-149.

BANCROFT, J. D; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques.** 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1996.

BARBARO, K. C; KNYSAK, I; MARTINS, R; HOGAN, C; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v. 45, p. 489-499, 2005.

BARRA, D; SIMMACO, M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. **Trends. Biotechnol.**, v. 13, p. 205–209, 1995.

BARROS, H. V. **Estudo do possível efeito de alcalóides obtidos a partir da secreção cutânea de *Rhinella jimi* e *Rhinella icterica* na penetração do vírus da raiva em células de mamífero mediado pelo receptor nicotínico de acetilcolina.** 2013. 93 f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Toxinologia, Instituto Butantan, São Paulo – SP, 2013.

BAUER, A. W; KIRBY, M. M; SHERRIS, J. C; TRUCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 493-6, 1966.

BENTLEY, P. J. Adaptations of amphibia to arids environments. **Science**, v. 152, p. 619-623, 1966.

BOULENGER, G. A. Descriptions of new Batrachians in the British Museum, **Ann. Mag. Nat. Hist. Lond.**, v. 6, p. 401-406, 1896.

BRITO-GITIRANA, L; AZEVEDO, R. A. Morphology of *Bufo ictericus* integument (Amphibia, Bufonidae). **Micron**, v. 36, p. 532–538, 2005.

BRUNETTI, A. E; HERMIDA, G. N; FAIVOVICH, J. New insights into sexually dimorphic skin glands of Anurans: the structure and ultrastructure of the mental and lateral glands in *Hypsiboas punctatus* (Amphibia: Anura: Hylidae). **J. Morphol.**, v. 273, p. 1257–1271, 2012.

CALIXTO, J. B; CABRINI, D. A; FERREIRA, J; CAMPOS, M. M. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Curr. Opin. Anesth.**, v. 14, p. 519–526, 2001.

CARVALHO, I. F. **Atividade antinociceptiva em dores agudas de um novo fator opióide da secreção cutânea de *Rhinella schneideri*.** 2008. 111 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza – CE, 2008.

CHAMMAS, S. M; CARNEIRO, S. M; FERRO, R. S; ANTONIAZZI, M. M; JARED, C. Development of integument and cutaneous glands in larval, juvenile and adult toads

(*Rhinella granulosa*): A morphological and morphometric study. **Acta Zool.**, in press, 2014.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretion, their normal functioning and potential medical applications. **Rev. Biol.**, v. 72, p. 365-370, 1997.

CONCEIÇÃO, K; KONNO, K; RICHARDSON, M; ANTONIAZZI, M. M; JARED, C; DAFFRE, S; CAMARGO, A. C. M; PIMENTA, D. C. Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, v. 27, p. 3092-309, 2006.

CONCEIÇÃO, K; BRUNI, F. M; ANTONIAZZI, M. M; JARED, C; CAMARGO, A. C. M; LOPES-FERREIRA, M; PIMENTA, D. C. Major biological effects induced by the skin secretion of the tree frog *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Toxicol.**, v. 49, p. 1054-1062, 2007a.

CONCEIÇÃO, K; BRUNI, F. M; PAREJA-SANTOS, A; ANTONIAZZI, M. M; JARED, C; LOPES-FERREIRA, M; LIMA, C; PIMENTA, D. C. Unusual profile of leukocyte recruitment in mice induced by a skin secretion of the tree frog *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Toxicol.**, v. 49, p. 625-633, 2007b.

CONCEIÇÃO, K; KONNO, K; MELO, R. L; ANTONIAZZI, M. M; JARED, C; SCIANI, J. M; CONCEIÇÃO, I. M; PREZOTO, B. C; CAMARGO, A. C. M; PIMENTA, D. C. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, v. 28, p. 515-523, 2007c.

CONCEIÇÃO, K; BRUNI, F. M; SCIANI, J. M; KONNO, K; MELO, R. L; ANTONIAZZI, M. M; JARED, C; LOPES-FERREIRA, M; PIMENTA, D. C. Identification of bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa nordestina* skin secretion using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a single-step liquid chromatography. **Jour. Vets. Anims. Tox. Trop. Dis.**, v. 15, p. 633-652, 2009.

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

CONLON, J. M; AL-GHAFFER, N; ABRAHAM, B; LEPRINCE, J. Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. **Methods**, v. 42, p. 349-357, 2007a.

CONLON, J. M; AL-GHAFFER, A; AL-MUTAWA, E; AL-KHARRGE, R; AHMED, E; KOLODZIEJEK, J; NOWOTNY, N; NIELSEN, P. F; DAVIDSON, C. Peptide defenses of the Cascades frog *Rana cascadae*: implications for the evolutionary history of frogs of the Amerana species group. **Peptides**, v. 28, p. 1268-1274, 2007b.

CONLON, J. M; WOODHAMS, D. C; RAZA, H; COQUET, L; LEPRINCE, J; JOUENNE, T; VAUDRY, H; ROLLINS-SMITH, L. A. Peptides with differential cytolytic

from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). **Toxicon**, v. 50, p. 498-506, 2007c.

CONLON, J. M; MECHKARSKA, M. Host-Defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family Pipidae. **Pharmaceuticals**, v. 7, p. 58-77, 2014.

COSTA, K. A. **Caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo induzido pela epibatidina em modelo de dor neuropática em ratos**. 2010. 109 f. Tese Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP. 2010.

CUNHA-FILHO, G. S. A. **Bufadienolídeos da secreção cutânea de *Rhinella schneideri* (Anura: Bufanidae) – Isolamento, caracterização, modificações químicas e avaliação das atividades biológicas**. 2010. 175 f. Dissertação de Doutorado. Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2010.

DALY, J. W; WITKOP, B. The venoms of amphibians. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, p. 425-432, 1966.

DALY, J. W; MYERS, C. W; WHITTAKER, N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (*Dendrobatidae*), with a general survey of toxic noxious substances in the amphibia. **Toxicon**, v. 7, p. 103-108, 1987.

DALY, J. W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **PNAS**, v. 92, p. 9-13, 1995.

DALY, J. W. Amphibian skin: A remarkable source of biologically active arthropod alkaloids. **J. Med. Chem.**, v. 46, p. 445–452, 2003.

DELFINO, G; BRIZZI, R; MELIS, G. Merocrine secretion from serous cutaneous glands in *Rana esculenta* complex and *Rana iberica*. **Alytes**, v. 13, p. 179-192, 1996.

DELFINO, G; BRIZZI, R; ALVAREZ, B. B; KRACKE-BERNDORFF, R. Serous cutaneous glands in *Phyllomedusa hypohondrialis* (Anura, Hylidae): secretory patterns during ontogenesis. **Tiss. Cell**, v. 30, n. 1, p. 30-40, 1998.

DELFINO, G; BRIZZI, R; ALVAREZ, B. B; TADDEI, L. Secretory polymorphism and serous cutaneous gland heterogeneity in *Bufo granulatus*. **Toxicon**, v. 37, p. 1281-1296, 1999.

DELFINO, G; NOSI, D; GIACHI, F. Secretory granule-cytoplasm relationships in serous glands of anurans: ultrastructural evidence and possible functional role. **Toxicon**, v. 39, p. 1161-1171, 2001a.

DELFINO, G; NOSI, D; BRIZZI, R; ALVAREZ, B. B. Serous cutaneous glands in the paludicoline frog *Physalaemus biligonigerus* (Anura, Leptodactylidae): patterns of cytodifferentiation and secretory activity in premetamorphic specimens. **Act. Zool.**, v. 82, p. 149-158, 2001b.

DELFINO, G; BRIZZI, R; NOSI, D; TERRENE, A. Serous cutaneous glands in new world Hylid frogs: an ultrastructural study on skin poisons confirms phylogenetic relationships between *Osteocephalus septentrionalis* and *Phrynohyas venulosa*. **Jour. Morph.**, v. 253, p. 176-186, 2002.

DELFINO, G; DREWES, R. C; MAGHERINI, S; MALENTACCHI, NOSI, D; TERRENI, A. Serous cutaneous glands of the Pacific tree-frog *Hyla regilla* (Anura, Hylidae): Patterns of secretory release induced by nor-epinephrine. **Tiss. Cell**, v. 38, p. 65-77, 2006.

DUELLMAN, W. E; KLAAS, L. T. The biology of the hylid frog *Triprion petasatus*. **Copeia**, v. 2, p. 308-321, 1964.

DUELLMAN, W. E; TRUEB, L. **The Biology of Amphibians**. MacGraw-Hill Book Company, New York, 1986.

DUELLMAN, W. E. **The Hylid frogs of Middle America**. Ithaca, New York: Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 2001, p. 545-552.

ERSPAMER, V. Bioactive of the amphibian integument In: Heatwole, h; Barthalmus, G. T; Heatwole, A. Y(Eds), **Amphibian Biology**, vol,1. Surrey Beatty and Sons, 1994, p. 179-186.

FAIVOVICH, J; HADDAD, C. F. B; GARCIA, P. C. A; FROST, D. R; CAMPBELL, J. A; WHEELER, W. C. Systematic review of the frog family hylidae, with special reference to hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **B. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 294, p. 1–240, 2005.

FELSEMBURGH, F. A; ALMEIDA, P. G; CARVALHO-E-SILVA, S. P; BRITO-GITIRANA, L. Microscopical methods promote the understanding of the integument biology of *Rhinella ornata*. **Micron**, v. 40, p. 198-205, 2009.

FOX, H. Epidermis In: Biology of the Integument, **In: Vertebrates**. Edit by Bereiter-Hahn, J.; Matoltsy, A.G.; Richards, K.S. Springer, Berlin, 1986, p. 78-135.

FOX, H. The structure of integument, In: **Amphibian Biology - The integument**. Edit by Harold Heatwole Surrey Beatty Sons, Austrália, 1994, p. 1-32.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (29/05/2014). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA, 2014.

FROST-MASON, S; MORRISON, R; MASON, K. Pigmentation, In: **Amphibian Biology - The integument**. Edit by Harold Heatwole Surrey Beatty Sons, Austrália, 1994, p. 64-97.

GRAG, A. D; KANITKAR, D. V; HIPARGI, R. V; GANDHARE, A. N. 2007. Antimicrobial activity of skin secretions isolated from Indian toad, *Bufo melanostictus* Schneider. **Nat. Preced.**, v. 10, p. 1038-1045, 1799.

HABERMEHL, G. **Venomous animals and their toxins**. New York: Springer Verlag, 1981.

HANCOCK, R. E. W; CHAPPLE, D. S. Peptides Antibiotics. **Antimic. Agts. Chem.** v. 43, p. 1317–1323, 1999.

HANTAK, M. M; GRANT, T; REINSCH, S; MCGINNITY, D; LORING, M; TOYOOKA, N; SAPORITO, R. A. Dietary alkaloid sequestration in a poison frog: An experimental test of alkaloid uptake in *Melanophryniscus stelzneri* (Bufonidae). **J. Chem. Ecol.**, v. 39, p. 1400–1406, 2013.

HUNSKAAR, S; FASMER, O. B; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Meth.**, v. 14, p. 69-76, 1985.

IZADPANAH, A; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 52, p. 381–389, 2005.

JARED, C; ANTONIAZZI, M. M. Anfíbios: Biologia e Venenos. In: Cardoso, J.L.C.; França, F.O.S.; Wen, F.H.; Malaque, C.M.S.; Haddad Jr., V.. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil - biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2a ed. São Paulo: Sarvier, 2009, p. 317-330.

JARED, C; TOLEDO, R. C; ANTONIAZZI, M. M. A. histological study of the integument of *Corythomantis greeningi* (Amphibia, Anura, Hylidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 55, n. 3, p. 509-515, 1995.

JARED, C; ANTONIAZZI, M. M; KATCHBURIAN, E; TOLEDO, R. C; FREYMULLER, E. Some aspects of the natural history of the *casque-head* tree frog *Corythomantis greeningi* Boulenger (Hylidae). **Anal. Scienc. Natur.**, v. 3, p. 105-115, 1999.

JARED, C; ANTONIAZZI, M. M; NAVAS, C. A; KATCHBURIAN, E; FREYMULLER, E; TAMBOURGI, D. V; RODRÍGUEZ, M. T. Head co-ossification, phragmosis and defence in the casque-dead tree frog *Corythomantis greeningi*. **J. Zool. Lond.**, v. 265, p. 1-8, 2005.

JARED, C; ANTONIAZZI, M. M; JORDÃO, A. E. C; SILVA, J. R. M. C; GREVEN, H. & RODRIGUES, M. T. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): their structure and functioning in passive defence. **Toxicon**, v. 54, p. 197-207, 2009.

KATCHBURIAN, E; ANTONIAZZI, M. M; JARED, C; FARIA, F. P; SOUZA-SANTOS, H; FREYMULLER, E. Mineralized dermal layer of the Brazilian tree-frog *Corythomantis greeningi*. **J. Morphol.**, v. 248, p. 56-63, 2001.

KIERNAN, J. A. **Histological and histochemical methods - theory and practice**, 3th ed. London: Oxford University Press, 2001.

KING, J. D; AL-GHAFFERI, N; ABRAHAM, B; SONNEVEND, A; LEPRINCE, J; NIELSEN, P. F; CONLON, J. M. Pentadactylin: an antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. **Comp. Biochem. Phys.**, v. 141, p. 393-397, 2005.

KÖNIG, E; ZHOU, M; WANG, L; CHEN, T; BININDA-EMONDS, O. R. P; SHAW, CHRIS. Antimicrobial peptides and alytesin are co-secreted from the venom of the Midwife toad, *Alytes maurus* (Alytidae, Anura): Implications for the evolution of frog skin defensive secretions. **Toxicon**, v. 60, p. 967–981, 2012.

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

LAZARUS, L. H; BRYANT, S. D; ATTILA, M; SALVARORI, S. Frog skin opioid peptides: a case for environmental mimicry. **Environ. Health Perspect.**, v. 102, n. 8, p. 648-654, 1994.

LENZI-MATTOS, R; ANTONIAZZI, M. M; HADDAD, C. F. B; TAMBOURGI, D. V; RODRIGUES, M. T; JARED, C. The inguinal macroglands of the frog *Physalaemus nattereri* (Leptodactylidae): structure, toxic secretion and relationship with deimatic behaviour. **J. Zool. Lond.**, v. 266, p. 385-394, 2005.

LIBÉRIO, M. S. **Caracterização química e biológica da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*: peptídeos antimicrobianos e anticarcinogênicos, fosfolipases e peptidases.** 2008. 146 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Brasília - UnB, Distrito Federal, 2008.

LIBÉRIO, M. S; BASTOS, I. M. D; PIRES-JUNIOR, O. R; FONTES, W; SANTANA, J. M; CASTRO, M. S. The crude skin secretion of the pepper frog *Leptodactylus labyrinthicus* is rich in metallo and serine peptidases. **Plos**, v. 9, n. 6, p. 96893-96902, 2014.

LIU, Y; XIAO, Y; XUE, X; ZHANG, X; LIANG, X. Systematic screening and characterization of novel bufadienolides from toad skin using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid. Commun. Mass Spectrom.**, v. 24, p. 667–678, 2010.

LUTZ, B. Biological significance of cutaneous secretions in toads and frogs. **Mem. Inst. Butantan.**, v. 33, p. 55-59, 1966.

MACIEL, N. M; SCHWARTZ, C. A; PIRES-JUNIOR, O. R; SEBBEN, A; CASTRO, M. S; SOUZA, M. V; FONTES, W; SCHWARTZ, E. N. F. Composition of indolealkylamines of *Bufo rubescens* cuneous secretion compared to six other Brazilian bufonids with phylogenetic implications. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 134, p. 641-649, 2003.

MAILHO-FONTANA, P. L; ANTONIAZZI, M. M; TOLEDO, L. F; VERDADE, V. K; SCIANI, J. M; BARBARO, K. C; PIMENTA, D. C; RODRIGUES, M. T; JARED, C. Passive and active defence in toads: the parotoid macroglands in *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus*. **J. Exp. Zool.**, v. 321, p. 65-77, 2014.

MELZER, S; CLERENS, S; BISHOP, P. J. Skin gland morphology and secretory peptides in naturalized Litoria species in New Zealand. **J. Herpt.**, v. 47, n. 4, p. 565–574, 2013.

MILLAN, M. J. 1999. The induction of pain: an integrative review. **Prog. in Neur.**, v. 57, p. 1-164.

MIURA, R. O; YAMAGATA, S; MIURA, Y; HARADA, T; YAMAGATA, T. Analysis of glycosaminoglycan - degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (Zymography). **Anal. Bioch.**, v. 225, n. 2, p. 333-340, 1995.

MORTARI, M. R; SCHWARTZ, E. N. F; SCHWARTZ, C. A; PIRES JR, O. R; SANTOS, M. M; BLOCH JR, C; SEBEN, A. Main alkaloids from the Brazilian dendrobatidae frog *Epipedobates flavopictus*: pumiliotoxin 251D, histrionicotoxin and decahydroquinolines. **Toxicon**, v. 43, p. 303- 310, 2004.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. **J. Immun. Met.**, v. 65, p. 55 – 63, 1983.

MYERS, C. W; DALY, J. W. Preliminary evaluation of skin toxins and vocalizations in taxonomic and evolutionary studies of poison-dart frogs (Dendrobatidae). **Americ. Mus. Nat. Hist. Bull**, v. 157, n. 3, p. 173-262, 1976.

NAVAS, C. A; JARED, C; ANTONIAZZI, M. M. Water economy in the *casque-head* tree-frog *Corythomantis greening* (Hylidae): role of behaviour, skin, and skull skin co-ossification. **J. Zool. Lond**, v. 257, p. 525-532, 2002.

NAVAS, C. A; ANTONIAZZI, M. M; JARED, C. A preliminary assessment of anuran physiological and morphological adaptation to the Caatinga. **Intern. Cong. Ser.**, v. 1275, p. 298-305, 2004.

NOSI, D; TERRENI, A; ALVAREZ, B. B; DELFINO, G. Serous gland polymorphism in the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* (Anura: Hylidae): Response by different gland types to norepinephrine stimulation. **Zoomorphology**, v. 121, n. 3, p. 139-148, 2002.

PAIOLI, F. S. **Efeito citotóxico da crotoxina em células de melanoma murino e fibroblasto**. 2011. 78 f. Dissertação de Mestrado, USP/IPT e Instituto Butantan, São Paulo, 2011.

PATT, D. I; PATT, G.R. **Comparative Vertebrate Histology**. Joanna Cotler Books, New York, 1969.

PEREIRA, I. C. **Aspectos fisiológicos e ecológicos da estivação em *Pleurodema dipolistris* (Leiuperidae/Anura)**. 2009. 76 f. Dissertação de Mestrado, IB/USP, São Paulo, 2009.

PERRY, P. Proteins of parotoid gland secretions from toads of genus *Bufo*. **Contemp. Herpetol.**, v. 2000, n. 3, p. 1-3, 2000.

PFENNING, D. W. The adaptive significance of an environmentally-cued developmental switch in an anuran tadpole. **Oecologia**, v. 85, p. 101-107, 1990.

PIRES JR, O. R; SEBBEN, A; SCHWARTZ, E. F; LARGURA, S. W. R; BLOCH JR, C; MORALES, R, A. V; SCHWARTZ, C. A. Occurrence of tetrodotoxin and its analogues in the Brazilian frog *Brachycephalus ephippium* (Anura: Brachycephalidae). **Toxicon**, v, 40, p. 761-766, 2002.

PIRES JR, O. R; SEBBEN, A; SCHWARTZ, E. F; MORALES, R. A. V; BLOCH JR, C; SCHWARTZ, C. A. Further report of the occurrence of the tetrodotoxin and new analogues in the Anuran family Brachycephalidae. **Toxicon**, v, 45, p. 73-79, 2005.

POMBAL JR, J. P; MENEZES, V. A; FONTES, A. F; NUNES, I; ROCHA, C. F. D; SLUYS, M. V. A second species of the *casque-head* frog genus *Corythomantis* (Anura: Hylidae) from northeastern Brasil, the Distribution of *C. greeningi*, and comments on the genus. **Bol. Mus. Nac.**, v. 530, p. 1-14, 2012.

POUGH, F. H; ANDREWS, R. M; CADLE, J. E; CRUMP, M. L; SAVITZKY, A. H; WELLS, K. D. **Herpetology**. New Jersey: Prentice-Hall, 2002.

PRATES, M. V; BLOCH JR, C. Peptídeos antimicrobianos. **Biotec. Cienc. Desv.**, v. 3, n.17, p. 30-36, 2000.

PRATES, I; ANTONIAZZI, M. M; SCIANI, J. M; PIMENTA, D. C; TOLEDO, L. F; HADDAD, C. F. B; JARED, C. Skin glands, poison and mimicry in Dendrobatid and Leptodactylid Amphibians. **J. Morph.**, v. 273, p. 279-290, 2012.

RETALLACK, G. J. Woodland hypothesis for Devonian tetrapod evolution. **J. Geol.**, v. 119, n. 3, p. 235-258, 2011.

RINALDI A. C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 6, p. 799-804, 2002.

SAPORITO, R. A; DONNELLY, M. A; NORTON, R. A; GARRAFFO, H. M; SPANDE, T. F; DALY, J. W. Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. **PNAS**, v. 105, n. 45, p. 17587-1796, 2008.

SAZIMA, I; CARDOSO, A. J. Notas sobre a distribuição de *Corythomantis greeningi* Boulenger 1896 e *Aparasphenodon brunoi* Miranda-Ribeiro, 1920 (Amphibia, Hylidae). Iheringia, **Sér. Zool. Porto Alegre** v. 55, p. 3-7, 1986.

SCHWARTZ, C. A; CASTRO, M. S; JÚNIOR, O. R. P; MACIEL, N. M.; SCHWARTZ, E. N. F.; SEBBEN, A. Princípios bioativos da pele de anfíbios: panorama atual e perspectivas. In: Nascimento, L. B.; Oliveira, M. E (Eds). **Herpetologia no Brasil II**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia, p. 146-168, 2007.

SCIANI, J. M. **Estudos toxinológicos do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter***. 2012. 143 f. Dissertação de Doutorado, IPT/Butantan, São Paulo – SP, 2012.

SCIANI, J. M; ANGELI, C. B; ANTONIAZZI, M. M; JARED, C; PIMENTA, D. C. Differences and similarities among parotoid macrogland secretions in South American toads: A preliminary biochemical delineation. **Scienc. W. Jour.**, v. 2013, p. 1-9, 2013a.

SCIANI, J. M; DE-SA-JUNIOR, P. L; FERREIRA, A. K; PEREIRA, A; ANTONIAZZI, M. M; JARED, C; PIMENTA, D. C. Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. **Biomed. Prev. Nutri.**, v. 3, p. 10–18, 2013b.

SEBBEN, A. **Estudos das propriedades físico-químicas e farmacológicas de princípios bio-ativos da secreção cutânea de *Odoltopllrynus cultripes* Reinhardt e Lutken, 1862 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae)**. 1989. Tese de Doutorado, não publicada, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

SEBBEN, A; SCHWARTZ, C. A; CRUZ, J. S. A Defesa química nos Anfíbios. **Ciênc. Hoj.**, v. 15, n. 87, p. 25-34, 1993.

SEIBERT, E. A; LILLYWHITE, H. B; WASSERSUG, R. J. Cranial co-ossification in frogs: relationship to rate of evaporative water loss. **Physiol. Zool.**, v. 47, p. 26-265, 1974.

SILVA, P. T. A. **Atividade antinociceptiva em dores agudas de um novo fator extraído da secreção cutânea de *Rhinella jimi***. 2009. 103 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Ceará, 2009.

SMITH, P. K; KROHN, R.I; HERMANSON, G. T; MALLIA, A. K; GARTNER, F. H; PROVENZANO, M. D; FUJIMOTO, E. K; GOEKE, N. M; OLSON, B. J; KLENK, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analyt. Bioch.**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1993.

STEBBINS, R. C; COHEN, N. W. **A Natural History of Amphibians**. Princeton University Press, New Jersey. p. 332, 1995.

SUDENE. Dados pluviométricos mensais do Nordeste, Rio Grande do Norte, Série Pluviométrica nº 4, SUDENE Ed., Recife, Brasil, 1990.

TEMPONE, A. G; MELHEM, M; PRADO, F. O; MOTOLE, G; HIRAMOTO, R; ANTONIAZZI, M. M; HADDAD, C. F. B; JARED, C. Amphibian secretion for drug discovery studies: a search for new antiparasitic and antifungal compounds. **Lett. Drug Des. Discov.**, v. 4, p. 67-73, 2007.

TEMPONE, A; PIMENTA, D; LEBRUN, I; SARTORELLI, P; TANIWAKI, N; ANTONIAZZI, M. M; JARED, C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon**, v. 52, p. 13-21, 2008.

TERRENI, A; NOSI, D; GREVEN, H; DELFINO, G. Development of serous cutaneous glands in *Scinax nasica* (Anura, Hylidae): patterns of poisons biosynthesis and maturation with larval glands in specimens of other families. **Tiss. Cell**, v. 35, n. 4, p. 247-287, 2003.

TOLEDO, R. C; JARED C; BRUNNER JR, A. Morphology of the large granular alveoli of the parotoid glands in toad (*Bufo ictericus*) before and after compression. **Toxicon**, v. 30, p. 745-755, 1992.

TOLEDO, R. C; JARED, C. The calcified dermal layer in anurans. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 104, p. 443-448, 1993a.

TOLEDO, R. C; JARED, C. A contribution to the study of the cutaneous calcified layer in the anurans. **Rev. Bras. Biol.** v. 53, p. 619-624, 1993b.

TOLEDO, R. C; JARED, C. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 105A, p. 593-608, 1993c.

TOLEDO, R. C; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibians venoms. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 111, n. 1, 1-29, 1995.

TOLEDO, L. F; SAZIMA, I; HADDAD, C. F. B. Behavioural defences of anurans: an overview. **Ethol. Ecol. Evol**, v. 23, n. 1, p. 1-25, 2011.

TRACY, C. R; CHRISTIAN, K. A; TRACY, R. Not just small, wet, and cold: effects of body size and skin resistance on thermoregulation and arboreality of frogs. **Ecology**, v. 91, n. 5, p. 1477–1484, 2010.

TRUEB, L. Evolutionary relationships of *casque-head* tree frogs with co-ossified skulls (Family Hylidae). **Univ. Kansas Publ., Mus. Nat. Hist.** v. 18, p. 547–716, 1970.

VITOR, A. O. **Atividade antinociceptiva de um componente bioativo presente no veneno do sapo *Rhinella jimi* sobre dor neuropática experimental.** 2009. 119 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza – CE, 2009.

WARBURG, M. R. **Ecophysiology of amphibians inhabiting xeric environments.** Springer-Verlag, Berlin, 1997.

ZARDOYA, R; MEYER, A. On the origin of and phylogenetic relationships among living amphibians. **PNAS**, v. 98, p. 7380-7383, 2001.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389-395, 2002.

ZUG, G. R. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles.** Academic Press Inc; San Diego. 1993.