

C 440932
E 1304224
10/10/2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
FÁLBA BERNADETE RAMOS DOS ANJOS

PURIFICAÇÃO E ESTUDOS FARMACOLÓGICOS
DE UMA NOVA NEUROTOXINA PROTÉICA DA
PELE DE *Leptodactylus pentadactylus*

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Farmacologia da Universidade Federal do
Ceará, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

ORIENTADOR:
Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho

FORTALEZA
2000

UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
Nº. R 1324764	
04 / 09	12000

OK

A619

Anjos, Fálba Bernadete Ramos dos

Purificação e estudos farmacológicos de uma nova neurotoxina protéica da pele de *Leptodactylus Pentadactylus*. _ Fortaleza, 1999. : il. 150f.

Orientador: Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho.

Dissertação (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.

1. Toxicologia – Anfíbios 2. Toxina Protéica 3. Anfíbios 4. Neurotoxina.

I Título.

CDD 615.942

Tese submetida como parte de requisitos necessários à obtenção do grau de doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca do Centro de Saúde da referida Universidade.

FÁLBA BERNADETE RAMOS DOS ANJOS

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em 25/02/2000

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Bruno Andrade Cardi

Prof.^a Dr.^a Veralice Meireles Sales de Bruin

Prof. Dr. Ésp^{er} A. Cavalheiro

Prof.^a Dr.^a Gisela Costa Camarao

Aos meus pais, tia e irmãos por terem
entendido as minhas ausências, sem
nenhuma cobrança

“Vinde a mim todos os que estais cansados e oprimidos, e eu os aliviarei. “Mt 11,28.

“Mesmo quando parece que todas as portas estão fechadas, está aberta a porta de Deus que não atribui tarefa que não consigamos realizar “. Massacro Taniguchi

AGRADECIMENTOS

Ao professor Krishnamurti de Moraes Carvalho, por ter me aceitado em seu laboratório, pela orientação precisa e constante.

As professoras Gisela Costa Camarão e Rita Maria Dantas, pela atenção e auxílio nos momentos de dificuldade.

Aos professores Otoni Cardoso do Vale, George Chaves Jimenes, Rosa Cristina Santiago, pelo incentivo, sugestões e atenção sempre dispensada.

Às professoras Glória Idalina Boente Pinto Duarte, Adrenalina Noronha Coelho de Souza e Rita Suzette, pelo apoio tão necessário quando estamos fora de casa.

Aos professores Bruno Andrade Cardi e Veralice Medeiros Sales de Bruin, por terem aceitado o convite para participar da banca.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial, ao professor Manassés Claudino Fonteles, pela competência e pela convivência profissional e humana.

À secretaria do curso de Pós-Graduação Sílvia Maria Azevedo de Lima e sua assessora Beatriz Maria Néri Oliveira, pela paciência e amizade e assistência prestada.

Aos colegas de Curso especialmente Adriana, Alex Pinto, Alex Havt, Francisco Albano, Augusta, Carlos, Helder, Nilberto, Maíra, Gerly Anne, Ilana, Elisete, Laura, Rômulo, Cliéder, Jânia e demais colegas, pelo excelente convívio, confiança e momentos de alegria.

Às técnicas Maria Silvandira França (UFC) e rosa germana da Silva Oliveira (UECE), pela colaboração constante e dedicação ao aluno em formação.

Aos colegas de laboratório Marinete, Angelina, Cláudio, Mirian, Valéria, Daniele, Lygia, Denise, Aronai, Inês, Janaína, Nádia, Soraia, Leon Solane, Roberta, Eduardo Cole, Elaine, Raquel, pela convivência amistosa e por tornarem o ambiente de trabalho tão agradável.

Aos amigos e irmão Alfredo, Mila, Iana, Pedro, Alice, Iberê, Andréa, pelo carinho, colaboração constante nas horas difíceis e por diminuírem a distancia de casa.

Aos amigos Ana Maria, Rejane Conti, Eulina Nery, Eugênia Barza, Carla Fragoso, Denise Gomes, Sebastião Rocha, Euclides Maurício, Manuel Adrião, por provarem que a diferença entre a distancia e a amizade é somente os quilômetros.

Ao Laboratório de Produtos Naturais, em especial ao professor Vietla Satyanarayana Rao e a técnica Nísia Rodrigues, pela ajuda em experimentos e atenção dispensada.

Ao Laboratório de Fisiologia do Aparelho Respiratório, especialmente ao professor Ruy Capaz e a técnica Maria da Conceição Alves da Silva, pela valiosa colaboração nos experimentos e acolhida em seu laboratório.

Ao laboratório de Informática, em especial aos professores Alberto Melo Soares e Cláudia do Ó pessoa e a técnica em computação Cláudia Geresa Santiago pela assistência e presteza no atendimento.

Ao laboratório de Neurobiologia Experimental da UNIFESP, especialmente aos professores Éspér A cavalheiro, Maria José Fernandes, Maria das Graças Nafhah-Mazzacoratti, Débora Amado pela orientação nos estudos do SNC, atenção e consideração dispensada.

Aos colegas de laboratório da UNIFESP, Fúlvio, Ricardo, Neide, Antônio, Sandra, Arida, Reinaldo, Suely, Emídio e demais colegas pela atenção, Consideração e colaboração constante.

Ao instituto Adolfo Lutz, especialmente a pesquisadora Suely Nonogaky, pela colaboração nos experimentos de imuno-histoquímica.

À Faculté de Medicine de L'Université de Montreal, em especial ao professor Guy Boileau e a professora Andréa Ruchon pela colaboração nos estudos do seqüenciamento parcial da Toxina.

Ao professor Carlos Maurílio pela amizade e correção ortográfica.

Às bibliotecárias Eliane Moura Vieira Silva, Maria Josineide Goes, Norma de Carvalho Linhares de demais funcionários, pela colaboração na normatização das referências bibliográficas e simpatia.

E finalmente a todos que direta e indiretamente contribuíram para o engrandecimento deste trabalho.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação nas pessoas dos Professores Ronaldo Ribeiro e Armênio Aguiar dos Santos, pelas facilidades concedidas.

À coordenação do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da Bolsa de Estudo.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
3.2.1.1 Extração do veneno de <i>Leptodactylus pentadactylus</i>	63
3.5.1.2 Aparelho estereotáxico para uso em ratos e camundongos	72
3.5.1.3 Cirurgia estereotáxica em camundongo	72
3.5.1.5 Animal com capacete acoplado ao sistema de registro	73
4.1.1 Cromatografia de troca-iônica DEAE-Celulose	79
4.2.1 Eletroforese em placa de gel poliacrilamida	81
4.2.2.1 Eletrencefalograma registrado no HPC e CTX de camundongos acordados	88
4.2.2.2 Eletrencefalograma registrado no HPC e CTX de ratos acordados	90
4.2.2.3 eletrencefalograma registrado no HPC e CTX de camundongos acordados pré-tratados com diazepam mais a toxina (250 µg/kg)	92
4.2.2.4 eletrencefalograma registrado no HPC e CTX de camundongos acordados pré-tratados com diazepam mais a toxina (500 µg/kg)	94
4.2.2.5 eletrencefalograma registrado no HPC e CTX de camundongos acordados pré-tratados com fenobarbital mais a toxina (250 µg/kg)	96
4.2.2.6 eletrencefalograma registrado no HPC e CTX de camundongos acordados pré-tratados com fenobarbital mais a toxina (500 µg/kg)	98

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
3.4.1 Avaliação física e observação dos animais no estudo de toxicidade	
<i>L. pentadactylus</i>	67
3.6 Hidrofobicidade dos resíduos	74
4.3.1 Respostas experimentais da avaliação física e observação dos animais no estudo de toxicidade	80
4.5.2.1 Análise da hidrofobicidade dos aminoácidos presentes na seqüência interna I	100
4.5.2.2 Análise da hidrofobicidade dos aminoácidos presentes na seqüência interna II	101
4.5.2.3 Análise da hidrofobicidade dos aminoácidos presentes na seqüência N-terminal	102

ÍNDICE

Página

Lista de figuras

Lista de tabelas

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Visão geral sobre as toxinas	26
1.2 Toxinas nos anfíbios.....	29
1.3 As neurotoxinas animais.....	49
1.4 Os anfíbios e o meio ambiente	52
2. OBJETIVOS	56
2.1 Geral	56
2.2 Específicos.....	56
3. MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1 Materiais	57
3.1.1 Animais	57
3.1.2 Substâncias e reagentes	58
3.1.3 Aparelhos	58
3.1.4 Materiais diversos	60
3.2 Métodos	60
3.2.1 Obtenção do veneno estudado.....	60

3.2.1.1	Processo utilizando adrenalina	61
3.2.1.2	Homogeneizado da pele.....	61
3.2.2	Purificação do material bruto	61
3.2.2.1	Cromatografia de troca-iônica em coluna DEAE-Celulose	61
3.2.2.2	Dessalificação da amostra	62
3.3	Crêterios de pureza	63
3.2.3.1	Eletroforese em gel poliacrilamida.....	63
3.2.3.2	Atividade farmacológica das fra�es da eletroforese em gel poliacrilamida.....	64
3.2.3.3	Estudo da atividade da toxina após incubaq�o com enzimas proteolíticas	64
3.4	Estudo farmacológicos.....	65
3.2.4.1	Toxicidade aguda (DL ₅₀).....	65
3.2.4.2	Estudo da dose efetiva convulsivante (DE ₅₀)	65
3.2.4.3	Estudos de outros efeitos farmacológicos agudos <i>in vivo</i>	65
3.5	Ensaio biológicos.....	68
3.2.5.1	eletrencefalograma.....	68
3.2.5.1.1	Prepara�o para registro eletroencefalográfico	68
3.2.5.1.2	Procedimento cirúrgico e implanta�o de eletrodos para registro eletroencefalográfico.....	68
3.2.5.1.3	Período pós-operatório	70
3.2.5.1.4	Análise comportamental dos animais monitorados com os eletrodos intracerebrais	70
3.2.5.1.5	Atividade elétrica cerebral.....	71
3.6	Determina�o da seq�ncia N-terminal dos aminoácidos da toxina purificada	73
3.7	Imuno-histoquímica para c-fos	75
4. RESULTADOS	76
4.1	Purifica�o do material bruto	76
4.1.1	Cromatografia de troca-iônica em DEAE-Celulose.....	76
4.1.2	Dessalifica�o da amostra.....	77

4.2 Critérios de pureza.....	77
4.2.1 Eletroforese em gel poliacrilamida	77
4.2.2 Determinação da concentração de proteínas.....	78
4.3 Estudos farmacológicos.....	79
4.3.1 Efeitos farmacológicos, toxicidade aguda (DL ₅₀) e dose efetiva convulsivante (DE ₅₀).....	79
4.4 Ensaios biológicos	82
4.4.1 Alterações comportamentais	82
4.4.2 Alterações eletrencefalográficas	83
4.5 Análise de aminoácidos.....	99
4.5.1 Seqüenciamento N-terminal obtidos a partir da amostra de toxinas.....	99
4.5.2 Análise simplificada das principais propriedades dos aminoácidos associados às seqüências internas I, seqüências II, N-terminal	99
5. DISCUSSÃO	103
6. CONCLUSÃO.....	115
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

ABSTRACT

The species *Leptodactylus pentadactylus* is an amphibian from the order anura, of the genre *Leptodactylus* which was found in the Indian, North and South American. A toxin was extracted from its skin secretion by column chromatography DEAE-Cellulose and it presents convulsant activity by intravenous injections (i.v.) in rat and mice. The fraction containing the purified toxin was eluted with 100 mM NaCl, desalted, lyophilized and the resulting yellow-colored storage powder was kept at – 25 °C. Its purity was evidenced in 6% polyacrilamide gel electrophoresis without SDS where was revealed only one major protein band; in presence of 10 % 2-mercaptoethanol and 1 % SDS; also only one protein band, corresponding to a molecular weight of 65 KD was identified. After the purification, it was obtained ~ 100 mg of pure toxin from 1g of whole lyophilized venom. The toxin was inactivated at 100 °C for 5 min or after incubation with trypsin and chymotrypsin. In acute toxicity tests in male mice in doses between 10 to 2000 µg/kg by i.v., caused symptoms such as jumping, increased locomotor activity, waling, defecation, tonic-clonic convulsions and death. The LD₅₀ and

ED₅₀ calculated was $560 \pm 128 \mu\text{g/kg}$ and $230 \pm 230\mu\text{g/kg}$, respectively. The use of anticonvulsivants such as diazepam (10 mg/kg; i.m.) and fenobarbital (50 mg/kg; i.m.) in the rats before the use toxin (500 $\mu\text{g/kg}$), blocked the convulsions but not the death of these animals. The electrencephalographic recordings confirmed the convulsions of these animals injected with the toxin. It was determined two intern sequences (LEU-LYS-PRO-GLY-ILE-ALA-THR-ASP-GLU-LEU-HIS) and [GLU (GLY)-HIS-PRO-GLU-ASP-ALA-LEU-HIS-TYR (VAL-TYR, -, ASP)] and a N-terminal (ASP-ALA-GLU-HIS-HIS-PRO-ARG-GLN-ILE-GLY-GLU-ILE-LEU-VAL-LEU-ILE-GLY-GLU-ARG-TYR). The data show that, until this date, α -leptoxin was one of the most potent animal toxins known and that it was first the proteic neurotoxin from amphibian skin with its partial sequence determined.

LISTA DE ABREVIACÕES

Ach – Acetilcolina

ALA – Alanina

AMPc – Adenosina cíclica 3,5 monofosfato

ARG – Arginina

ASP – Aspartato

BSA – Albumina bovina

Ca⁺⁺ - Cálcio

Cl⁻ - Cloro

CTX – Córtex

DE₅₀ – Dose efetiva

DL₅₀ – Dose letal

DNA – Ácido desoxirribonucléico

e.v. – Endovenosa

EEG – Eletroencefalografia

GABA – Ácido γ -aminobutírico

GLN – Glutamina

GLU – Glutamato

GLY – Glicina

HIS – Histidina

HPC – Hipocampo

i.p. – Intraperitoneal

ILE – Isoleucina

INS – Insulina

K⁺ - Potássio

LEU – Leucina

LYS – Lisina

Na⁺ - Sódio

NaCl – Cloreto de sódio

pH – Potencial de íons hidrogênio

PM – Peso molecular

PRO – Prolina

RB – Rendimento bruto

RZ – Razão

s.c. – Subcutânea

SNC – Sistema nervoso central

THR – Treonina

TTX – Tetrodotoxina

TYR – Tirosina

V.O – Via oral

VAL – Valina

OBSERVAÇÃO: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam desta relação, encontra-se descritas como convenções adotadas.

RESUMO

A espécie *Leptodactylus pentadactylus* é um anfíbio da ordem anura, pertencente ao gênero *Leptodactylus* encontrada na Índia, América do Norte e do Sul. Da sua pele foi extraída uma toxina por cromatografia de troca-iônica em DEAE-Celulose, com atividade biológica convulsivante em ratos e camundongos por via endovenosa (e.v.), identificada na fração eluída com 100 mM de NaCl, que após a liofilização foi armazenada a -25 °C, sob a forma de pó granular de coloração amarelada. A pureza desta toxina, foi evidenciada em eletroforese a 6% sem SDS, onde foi revelada uma banda única protéica, em presença de SDS a 6%, apresentou também uma única banda majoritária de peso molecular (PM) aproximado de 65 KD. A determinação da concentração de proteína do veneno bruto, apresentou um rendimento bruto médio (RB) a partir de 1g de veneno liofilizado de cerca de 2,59 mg da toxina purificada, ou seja, 0,26 % (p:p). Esta proteína diante do aquecimento e tratamento proteolítico com tripsina e quimotripsina, sofreu inativação. Em teste de toxicidade aguda em camundongos machos, a DL₅₀ e DE₅₀

encontrada foram respectivamente $560 \pm 128 \mu\text{g/kg}$ e $230 \pm 109 \mu\text{g/kg}$. Os estudos comportamentais realizados tanto em ratos como em camundongos na dose de $500 \mu\text{g/kg}$ (e.v), com a toxina, mostraram alterações como saltos, aumento da atividade locomotora, cambaleamento, defecação, comportamento exploratório, tremores da mandíbula, convulsão tônico-clônico, seguida por morte. Estes efeitos foram também observados com o uso de anticonvulsivantes como diazepam (10 mg/kg ; i.m.) e fenobarbital (50 mg/kg ; i.m.) nos ratos antes da administração da toxina. Estes fatos foram evidenciados nos registros encefalográficos quando os animais receberam a toxina e os anticonvulsivantes. Foram identificadas duas seqüências internas I (LEU-LYS-PRO-GLY-ILE-ALA-THR-ASP-GLU-LEU-HIS) e II [GLU(GLY),HIS-PRO-GLU-ASP-ALA-LEU-HIS-TYR(VAL)-TYR-ASP], e uma seqüência N-terminal (ASP-ALA-GLU-HIS-HIS-PRO-ARG-GLN-ILE-GLY-GLU-ILE-LEU-VAL-LEU-ILE-GLY-GLU-ARG-TYR). Em relação aos índices de hidrofobicidade apresentados foi observado que a seqüência interna II é a mais hidrofóbica. Estes dados mostram que até a presente data a α -leptoxina é uma das mais potentes toxinas animais conhecidas e, a primeira neurotoxina protéica da pele de anfíbios purificada e com a seqüência parcial determinada.

1 INTRODUÇÃO

Uma ligeira avaliação na história referente à evolução das espécies mostra que os anfíbios constituem, bem provavelmente, os primeiros Tetrápodos terrestres derivados de um ancestral com características semelhantes aos peixes ósseos, que no período devoniano há quase quatro milhões de anos, saíram do mar à procura de alimento e acabaram conquistando o ambiente terrestre. Neste cenário, gradativas adaptações foram sendo desenvolvidas, subestabelecendo acontecimentos de incomensuráveis grandezas para a história natural e evolução filogenética dos animais terrestres (Santos, 1955, Forey, 1984, Storer e al., 1984, Lazarus & Attila, 1993).

A classe dos anfíbios é constituída de três ordens, de acordo com a classificação de Nobre (1931)¹. A primeira, Gimnofionios (Gmnophiona), chamados também por ápodos, está representada por animais sem membros, com aspecto vermiforme e de vida subterrânea. Alguns dos seus representantes podem apresentar-se por vezes cegos, sendo então denominados por minhocão ou cobra-cega. As segundas,

¹ SANTOS, E. *Anfíbios e répteis do Brasil (vida e costumes)* 2. Ed. Rio de Janeiro:F. Briguiet & Cia, 1955. 262 p.

representadas pelo caudata ou urodelo, são aqueles que contêm cauda, além de quatro patas (raramente duas), corpo alongado com formato angüiliforme (peixes ápodes da família Malacopterígios). Deste último grupo, encontram-se 165 espécies que são popularmente conhecidas como tritões e salamandras, existindo apenas uma única espécie representante deste grupo no Brasil. Na terceira ordem conhecida como anura, estão os batráquios ou salientia. Estes animais são de corpo curto, truncado, provido de quatro membros, onde os posteriores são geralmente mais longos. Todos os membros desse grupo parecem ser desprovidos de brânquias e cauda, assim que atingem a fase final da metamorfose. Em certas espécies desse grupo não são visualizados os dentes e em outras a língua. A ordem anura é a mais rica em diversidade e número de espécies, com aproximadamente 1.200 espécies conhecidas, representadas pelas rãs, sapos e pererecas (Santos, 1955).

Considerados verdadeiros fósseis vivos, estes organismos guardam ainda algumas características herdadas dos seus ancestrais. Podem ser encontrados numa ampla variedade de ambientes, podendo inclusive alojar-se entre as raízes proeminentes das árvores. São geralmente cosmopolitas e distribuem-se em todos os continentes, com exceção das regiões árticas e antárticas (Santos, 1955, Storer et al., 1984, Clarke, 1997). Alguns destes organismos resistentes a baixas temperaturas, apresentam formas de reprodução, compatíveis com a necessidade de adaptação dos órgãos, como também das funções fisiológicas a esta condição climática; particularmente, o sistema endócrino, que tem um papel fundamental no processo adaptativo (Fontaine, 1984, Clarke, 1997).

No Brasil são tidos como batráquios os Engistomatídeos, formado por 7 gêneros e 12 espécies, e os Leptodactilídeos com cerca de 16 espécies. Geralmente os representantes destes grupos podem ser encontrados em açudes pouco profundos, à beira de lagoas, nas águas estagnadas, escondidas entre as ervas das margens ou em lugares úmidos. Durante as secas prolongadas, estes animais podem ser encontrados em covas ou debaixo das pedras, a fim de preservar o mínimo de umidade de sua pele, protegendo-se assim da evapotranspiração excessiva que os levaria fatalmente à morte (Santos, 1955).

O gênero *Leptodactylus* caracteriza-se por organismos que apresentam artelhos (dedos) desenvolvidos os quais geralmente terminam em discos mais ou menos definidos morfológicamente, sendo as últimas falanges dispostas em forma de T (Santos, 1955). A distribuição das rãs deste gênero vai desde a região ocidental da Índia, até por quase todo o continente americano. A espécie *L. gracilis* por exemplo, pode ser visualizada em várias regiões brasileiras como nos estados de Santa Catarina, São Paulo e Minas Gerais, conservando as mesmas características, embora com pequenas variações em relação àquelas encontradas em outros espécimes habitantes dos países vizinhos, como Argentina e Uruguai. A espécie *L. mystacimus*, pode ser encontrada em terra umedecida ou sobre folhas apodrecidas em muitas regiões do Brasil e no Paraguai (Santos, 1955, Izecksohn, 1976).

As espécies nativas do Brasil, como por exemplo, *Leptodactylus ocellatus*, apresentam contorno ovóide, às vezes de pigmentação parda; possuindo pseudo ocelos lombares, com intuito de dissimular-se através de mimetismo, no meio em que habitam. Apresentam hábito alimentar

típico do tipo “caça viva”, incluindo em sua dieta alimentar vários tipos de insetos, aracnídeos, etc (Santos, 1955).

Ainda sobre *Leptodactylus*, estudos revelaram a existência de mais cinco novas espécies habitantes das regiões centro e sudeste do Brasil. Destas, duas espécies em São Paulo (*L. furnarius* e *L. jolyi*), duas em Minas Gerais (*L. cunicularius* e *L. camaquira*) e uma espécie encontrada em Goiás (*L. tapiti*). Observações mostraram que estes organismos variavam entre si quanto ao tamanho, coaxar, como também *habitat* (Sazima & Bokermann, 1978).

Estudos realizados com *L. pentadactylus*, evidenciaram que estes animais podem variar o comportamento exploratório em função da qualidade de luz ambiental, escolhendo *habitat* onde predomina a luz na faixa espectral do azul provavelmente, prevalecendo-se desta condição para melhorarem as suas estratégias de camuflagem frente ao seu meio ambiente. É estranho que tão pouca observação exista à respeito da espécie *L. pentadactylus*, esta que comumente é encontrada adaptada nos brejos da região nordeste do Brasil (Kiecliter & Goytia, 1995).

De qualquer forma, apesar da aparência inofensiva, a pele dos anfíbios esconde defesas químicas que do ponto de vista biológico, ajudam na sobrevivência individual do espécime. Assumindo também um caráter preventivo contra infecção de origem bacteriana ou microbiana (Lutz, 1966, Daly e al., 1987, Blaustein & Wake, 1995). Estes mesmos autores acreditam que algumas destas substâncias podem ter importante papel no comportamento sexual atrativo entre espécimes de um mesmo grupo.

Os anfíbios de maneira geral secretam substâncias na sua pele o qual é úmida, delicada, fina, rica em glândulas disseminadas por todo o

corpo, cujo valor biológico é indiscutível (Lutz, 1966, Toledo, 1986, Blaustein & Wake, 1995). Tais substâncias interferem nas funções fisiológicas como respiração, dessecação e proliferação de microorganismos na superfície do corpo dos mesmos (Toledo & Jared, 1989, Clarke, 1997).

A pele que é altamente vascularizada, contém dois tipos de glândulas mucosas e granulosas. Nestes organismos, as glândulas mucosas que são extremamente hidrófilas, realizam trocas gasosas entre a pele e o meio, do tipo facilitado, não descartando também o possível papel defensivo do muco o qual por sua natureza viscosa, dificultaria a apreensão dos anfíbios por seus predadores (Jaussi & Kunz, 1978, Storer e al., 1984, Toledo & Jared, 1989, Lazarus & Attila, 1993).

As glândulas granulosas secretam veneno, ou seja, uma secreção espessa, esbranquiçada, espumante e com substâncias que lhes conferem o efeito tóxico (Jaussi & Kunz, 1978, Storer e al., 1984, Lazarus & Attila, 1993). As toxinas presentes na pele são liberadas diante das ameaças dos predadores, desanimando-os ou desenvolvendo atividades citotóxicas que podem causar até a morte dos seus agressores (Jaussi & Kunz, 1978). Na secreção granular já foram encontrados compostos altamente tóxicos das mais diferentes categorias, entre eles peptídeos, proteínas, derivados guanidínicos, aminas biogênicas, esteróides, alcalóides e outros (Quay, 1972, Storer et al, 1984, Daly et al. 1987, Lazarus & Attila, 1993, Daly, 1995).

Muitas investidas foram feitas no estudo da pele dos anfíbios, as primeiras datando de 1917 onde Flury, relatou que os efeitos das secreções da pele nos animais poderiam ser evidenciados tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Mais tarde, novas descobertas sobre os peptídeos

bioativos, originários da pele de anfíbios, foram evidenciados em pelo menos cem espécies no mundo todo (Daly et al., 1987). Os estudos prosseguiram com Ersparmer's (1971) a partir da pele de sapo e de glândulas de polvo, onde uma substância similar à serotonina encontrada em mamíferos, as enteraminas, influenciaram a busca de novos compostos como a fisaemina de *Physalaemus fuscumaculatus* (uma rã argentina) e bradiginina de *Phyllomedusa e Rana*. Foi identificado também um polipeptídeo hemoliticamente ativo de *Bombina variegata* e outros como histionicotoxina, gefirotoxina, pulmiliotoxina A e B, tetrodotoxina, batracotoxina sendo este último, um potente alcalóide usado nas flechas dos índios colombianos. A epibatidina extraída da pele de *Epipedobates tricolor* tem efeito semelhante a morfina, parecendo ser até duzentas vezes mais potente que a mesma (Lazarus & Attila, 1993, Kellar, 1995).

Os anfíbios podem produzir uma ampla diversidade de toxinas as quais podem atuar sobre uma grande variedade de estruturas moleculares, incluindo diferentes canais iônicos e enzimas, podendo promover o bloqueio de algumas vias fisiológicas importantes de presas e/ou predadores, imobilizando-os rapidamente, podendo levá-los à morte (Jaeger & Gergits, 1979, Solé-Cava & Kelocom, 1988, Servent et al, 1991).

1.1 VISÃO GERAL SOBRE AS TOXINAS

Pesquisas toxicológicas com produtos naturais vêm sendo intensificadas nos últimos anos. Numerosos compostos de valiosa ação

biológica têm recebido bastante atenção, tanto em animais como em vegetais.

Substâncias venenosas ocorrem com frequência na natureza, principalmente nos vegetais, que sujeitos ao ataque dos predadores, produzem substâncias aleloquímicas, prestando-se como defesa contra herbívoros. As plantas contêm uma diversidade de substâncias como terpenos, alcalóides, esteróides, saponinas, metabólitos secundários, flavonas, resinas, que desempenham importante papel neste mecanismo (Swain, 1977, Gottlieb, 1987, Daly, 1995).

Em animais, os venenos também funcionam como substâncias tóxicas e podem ser originados de celenterados, moluscos, artrópodes, destacando insetos, aranhas, escorpiões. Cobras, peixes, anfíbios como também bactérias, dinoflagelados além de outros microorganismos, podem produzir toxinas (Solé-Cava & Kelocom, 1988, Daly, 1995, Hopkins et al., 1997, Asakawa et al., 1997).

Entre os animais mais estudados, as cobras e escorpiões mereceram maiores destaques dados sua importância nos casos de acidentes com animais peçonhentos. Várias toxinas das serpentes têm qualidades incomuns auxiliando na digestão das presas, as diversas enzimas têm características e em relação ao substrato disponível, atividades diferentes (Zeller, 1951, Villela et al., 1966, Mahler & Cordes, 1966, Ménez, 1987).

Das serpentes sabe-se que a proporção e as características específicas da composição do seu veneno, rico em substâncias farmacologicamente ativas, são diferentes entre si, contribuindo na abundância das ações, quando liberadas durante o processo de envenenamento (Martins, 1997, Havt, 1999).

Dos escorpiões, o veneno de muitas espécies foi bastante investigado, tanto em sua composição, modo de ação como quanto a reação nociva. Da espécie *Tityus trivittatus charreyroni*, foram identificadas 6 produtos de secreção do qual, dois eram de natureza comum aos mucopolissacarídeos; outros eram ácidos, ou de natureza protéica (Danni et al, 1976).

Registros também existem sobre as secreções defensivas originários de invertebrados marinhos; composta geralmente de sapogeninas terpenóides e esteróides, TTX, além de uma variedade de toxinas do tipo poliéter alcalóides (Solé-Cava & Kelocom, 1988, Servent et al., 1991, Daly, 1995). Nos vertebrados e invertebrados terrestres, estas substâncias biológicas acima descritos também podem ter um papel protetor (Toledo, 1986, Daly, 1995).

A pele dos anfíbios com as diversas substâncias nela presentes, é tida como mais nociva do que tóxica, no entanto, passa a ser considerada venenosa, quando em altas dosagens (Daly, 1995). Salamandras e sapos são enquadrados como nocivos a séculos e hoje já se sabe o perigo que as secreções por eles produzidas representa além do valor filogenético incontestável (Daly, 1995).

Os anfíbios ao contrário da maioria dos vertebrados, têm aspectos desagradáveis, não despertando nenhuma simpatia e causando até repugnância naqueles que os admiram (Santos, 1955). Sua conformação anti-estética e seu corpo recoberto de excrescência postulosas, expele líquidos defensivos levando-os a um total desinteresse por parte dos espectadores da natureza (Santos, 1955).

A investigação desde o *habitat* à natureza química destes animais, permitiu descobrir a dinâmica pela vida escondida nos mais amplos

ecossistemas, revelando a verdadeira riqueza defensiva e de grande valor científico.

1.2 TOXINAS NOS ANFÍBIOS

Dados publicados sobre as glândulas da pele nos vertebrados vêm sendo investigados há décadas. A posição anatômica precisa no dorso dos animais, guarda características citogenética, fisiológica e filogenética de grande significância (Quay, 1972)

Um dos representantes desta classe são aqueles pertencentes à ordem urodela, conhecidos como salamandras e tritões. Sua secreção apresenta um componente guanidínico de elevada toxicidade, TTX e alcalóides esteróides, como a samandarina (Toledo & Jared, 1989).

O gênero das salamandras apresenta um caráter em comum que é a presença de alcalóides na família *Cryptbranchidae*, é o alcalóide *cryptbranchus* (Daly e al., 1986). Secreções nocivas foram identificadas em outros gêneros das salamandras como *Ambystoma*, *Ryacosiredon*, *Amphiuma*, *Eurycea*, *Plehodon*, *Notophtalmus*, *Taricha*, *Triturus* (Daly, 1987).

A TTX e compostos correlatos, foram achados nos ovos de algumas espécies de salamandras e rãs. Em *Taricha* a TTX está presente nos ovários, músculos e sangue. Este gênero que se distribui na Europa, Ásia e América do Norte, mas especificamente, na Califórnia (Mosher et al., 1964, Kao, 1966, Wakely et al., 1966).

O histórico sobre a TTX mostra que ela é produzida também nos órgãos internos dos peixes sopradores dos mares do sul da China e particularmente no Japão. Conhecidos vulgarmente como fugu, diante de

uma ameaça, estes transformam-se numa esfera espinhosa que agridem aqueles que os molestam (Kao, 1966, Catterall, 1988, Miller, 1989).

Comenta-se que a ingestão do peixe sem o devido preparo causa entorpecimento e formigamento dos lábios, língua e mucosa bucal, e outras regiões que com ela mantiverem contato (Toledo & Jared, 1989). A sintomatologia se acentua nos pacientes examinados que assumem a forma paralisada, seus olhos tornam-se fixos numa direção, a respiração difícil acompanhada da dilatação das narinas, face pálida, lábio pálido, distúrbios gastrointestinais, perda da consciência e pulso (Kao, 1966).

Estudos ao nível celular foram realizados enfocando a ação da TTX nos tecidos, bloqueando a condução do impulso nervoso. Sua eficiência no bloqueio é bastante superior ao da cocaína, pois não permanece em contato com o tecido referido (Toledo & Jared, 1989).

Catterall (1988), relata que este composto é um dos mais potentes e seletivos agentes que atuam nos canais de sódio (Na^+) sensíveis a voltagem, de tecidos excitáveis. Os derivados guanidínicos heterocíclicos na TTX, agem especificamente como inibidores do transporte de íons nestes canais. E estes ao penetrarem nas células se alojam ficando o restante da molécula realizando bloqueio externo, associando-se ou dissociando-se independentemente do canal estar ou não aberto (Catterall, 1988, Miller, 1989).

As toxinas não protéicas receberam maior atenção dos químicos dada sua ação letal. A TTX foi uma das mais investigadas (Solé-Cava & Kelocom, 1988). A letalidade desta toxina foi evidenciada no homem, cães, gatos, porcos, pássaros e outras espécies, cuja DL_{50} estimada graficamente em camundongos foi de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e em cães foi de 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, intravenosamente ou 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ subcutaneamente ou

intramuscularmente. Estudos realizados com cianeto de Na^+ mostraram uma DL_{50} de 10 mg/kg, em termos comparativos a toxina é 1,250 vezes mais letal em camundongos que o cianeto (Kao, 1966, Toledo & Jared, 1989).

Como significado de evolução convergente, a referida toxina é produzida também por salamandras venenosas que causa enfraquecimento dos músculos voluntários, inibição da secreção de ácido gástrico, hipotensão, toxicidade nos sistemas neuromuscular, cardiovascular e respiratório. Distingue-se três tipos samandarina, samandarona e samandaridina, onde esta última em doses letais, leva a paralisia respiratória e morte sem lesão cardíaca, convulsão, hipertensão e funciona como anestésico local (Catterall, 1988, Miller, 1989, Toledo & Jared, 1989).

O estudo das respostas antipredatórias dos anfíbios vem sendo muito investigado nas salamandras, não somente do ponto de vista farmacológico e fisiológico, mais também comportamental que contribui indiretamente na compreensão destas respostas. A secreção cutânea da família *Plethodontidae*, além da alta toxicidade tem também função adesiva contra o inimigo. Situações experimentais simulando o ataque de pequenas serpentes *Thamnophis* ingerindo salamandras *Batrachoseps*, revelaram que as serpentes tornaram-se imobilizadas com esta secreção. O corpo do animal ficou todo revestido, permanecendo colado, e paralelamente a isto ocorreu penetração da substância na boca, os movimentos do predador foram atingidos, e a presa tornou-se assim um alvo inatingível (Arnold, 1982).

As literaturas apontam que estes compostos presentes nas salamandras, servem para protegê-las e são encontrados na cauda de

alguns espécimes (Kao, 1966, Daly et al., 1987). Outro fator relevante é o brilho típico evidente, não somente nelas, mas na maioria dos animais, que são detectados pelo predador como uma visualização da coloração aposemática, funcionando como alerta de perigo que estes representam ou fingem representar, livrando-os de um possível ataque. Vale ressaltar que sua intensidade depende da dieta por eles adotados, esta variação tem uma relação direta com a estação, determinando a concentração de acordo com a necessidade e estado de maturação (Brandon & Huheey, 1981, Daly et al., 1987, Lazarus & Attila, 1993).

Na ordem anuras, numerosas foram as pesquisas realizadas, listando desde a reprodução até mentiras e exageros (Santos, 1955). Da sua pele, sabe-se da riqueza da sua constituição e poder biológico por ela exercida (Clarke, 1997). A origem e função dos venenos e substâncias nocivas em anfíbios são até então pouco conhecidas (Daly, 1995).

Toledo & Jared (1989), referem-se que a maior concentração de substância está na pele, contudo, no sangue e nos ovários estas são encontradas em menor proporção. Relatam ainda que o veneno é formado de esteróides e amins biogênicas, e algumas espécies podem apresentar mucopolissacarídeos ácidos e ácido ascórbico. Mas tarde, Daly (1995), discriminou em seu trabalho, que as amins seriam serotonina, histamina e tiramina e seus derivados, detectados tanto em rãs com em sapos.

As secreções de tais substâncias são produzidas desde as glândulas parotóides os quais são em sua maioria longas e finas saliências, dispostas ao longo da margem dorso-lateral do animal por trás dos olhos. Até as outras glândulas disseminadas sobre o corpo

tendem a se localizar e formar massas em certos pontos (Santos, 1955, Lutz, 1966, Chen & Kovaríková, 1967, Toledo & Jared, 1989).

Vários estudos foram realizados por Vital Brasil e J. Vellard os quais verificaram no veneno de sapos do gênero *Bufo* semelhanças entre si, mas que diferia do veneno das cobras. Segundo eles todos os animais eram sensíveis a ação do veneno até mesmo o sapo que não resistiu quando recebeu uma dose 200 a 300 vezes menor do que fornece (Santos, 1955). O veneno penetra nas mucosas agindo rapidamente, levando a uma série de desordens, agitação, náuseas, vômitos, hipersecreção, paralisia entrecortada de convulsão tônico e morte. Ressalta ainda o autor que o envenenamento só ocorre por via oral ou por meio das mucosas.

Há indicações também que os chineses usavam o veneno preparado de sapo, Chu'ân su, no combate a sinusite, dor-de-dente e inflamações locais. Sobre seu sangue, foi publicado no livro "De Venenis" na Europa, que este poderia ser usado no tratamento de dificuldade respiratória (Chen & Kovaríková, 1967).

Dos sapos comuns na Europa, foram isoladas substâncias farmacologicamente ativas (Chen & Koraríková, 1967). De *Bufo marinus*, Abel & Macht *apud* Chen & Koraríková (1967), isolaram bufagina e epinefrina, em seguida de *B. bufo bufo*, Wieland & Weil *opus citatum* isolaram bufotalina e bufotoxina e do "Chu'ân su", Chen et al. *ibidem*, isolaram cinobufagina e cinobufotoxina, que segundo Meyer *opus citatum*, detectou neste composto a presença de substâncias cardioativas.

Os esteróides cardioativos despertam interesse dos pesquisadores que os classificaram em cardiotônicos e não cardiotônicos. O efeito

cardiotônico foi evidenciado nas bufogeninas ou bufaginas e bufadienólides e nas bufotoxinas, o qual foram detectadas em maior concentrações. Os esteróides não cardiotônicos encontrados no veneno foram colesterol γ -sitosterol e ergosterol (Chen & Kovaríková, 1967, Toledo & Jared, 1989).

Alguns dos principais esteróides cardiotoxicos foram identificados nos venenos de *Bufo*, como arebufogenina (*B. arenurum*, *B. crucifer*, *B. ictericus*), bufalina (*B. parcamente*), bufotalina (*B. bufo*), gamabufotoxina (*B. formosus*), marinobufigenina (*B. crucifer*, *B. ictericus*, *B. marinus*), vulgarobufotoxina (*B. bufo*), dentre outros (Toledo & Jared, 1989).

As estruturas químicas das diversas bufaginas diferem de uma para outra e sua atividade sobre o coração é variável. Dentre as toxinas estudadas, algumas mostraram DL_{50} de extrema potência em ensaios feitos em gatos, cujas médias calculadas foram para arenobufagina $0,08 \pm 0,01$, bufotalina $0,13 \pm 0,01$, cinofagina $0,20 \pm 0,02$, marinobufagina $1,49 \pm 0,09$, acetilbufotalina $0,60 \pm 0,00$, viridobufagina $0,11 \pm 0,01$ mg/kg e outras. As bufaginas no coração são menos cumulativas que a digitoxina. Ações cardiotônicas semelhantes que os glicosídeos cardíacos exercem no tecidos respiratórios, metabolismo dos carboidratos, equilíbrio iônico, proteínas contráteis, podem ser aplicáveis a elas. Experimentos em rãs tratadas com as cinobufaginas, mostraram inquietação e convulsões, talvez originadas da medula espinhal (Chen & Kovaríková, 1967).

Em estudos neurológicos também com gatos, foram observadas convulsões em presença de acetil cinobufagina, marinobufagina, derivado acetil e bufotalina (Chen & Kovaríková, 1967). O outro grupo,

as bufotoxinas têm ação central sobre o coração assemelhando-se aos glicosídeos cardíacos e bufaginas, entretanto de potência menor (Chen & Kovaríková, 1967, Toledo & Jared, 1989).

Baseando-se nas investigações sobre o veneno de sapos, as aminas biogênicas igualmente presentes neles, são derivados feniletilamínicos e triptamínicos (Toledo & Jared, 1989). Em *B. marinus*, foi evidenciado que este seria fonte extramedular de uma potente amina simpatomimética em grandes quantidades nas glândulas parótidas, conhecida como epinefrina e também por sua ação vasopressora (Chen & Kovaríková, 1967). Apesar de nem todas as espécies produzi-las, no gênero *Bufo*, são achadas também em *B. bufo gargarizans*, *B. regularis*, *B. arenarum*, *B. formosus*, *B. blombergi* e *B. peltocephalus* nesta glândula (Chen & Kovaríková, 1967). Sobre o organismo tem efeito espasmódico, emético e convulsivante em doses elevadas e no homem causa hemorragias cerebrais e arritmias cardíacas (Toledo & Jared, 1989).

Outra amina também foi descoberta em *B. marinus* sob condições experimentais chamada de norepinefrina; Esta foi ensaiada na pressão arterial de ratos, no estudo com membrana nictante e na extração cromatográfica, onde foi obtida cerca de 2-5 % de matéria (Chen & Kovaríková, 1967).

Além de catecolaminas nos anfíbios, outros compostos como indolealquilaminas foram identificadas (Ersparmer, 1971). Estas foram divididas em três grandes grupos de aminas aromáticas, as indolealquilaminas na maioria das espécies e derivados N-metilados, incluindo bufotenina e bufotenidina presentes nas salamandras, rãs e sapos; imidiazolealquilaminas e histamina, visto somente em

leptodactylide e rãs hylide e hidroxifenilalquilaminas abrangendo lepodactylina das rãs lepodactylide (Märki & Witkop, 1963, Clarke, 1997).

Derivados de indolaquilamina entre eles bufoteninas, 0-meilbufotenina, bufoviridina, bufotionina e deidrobufotenina, têm propriedades alucinógenas e hipertensivas vasoconstrictora e por vezes convulsivantes (Clarke, 1997). Uma particularidade de uma destas propriedades referidas e unicamente isolada de *B. alvarius*, encontra-se concentrada nas glândulas parotóides e coxais, que é a substância alucinógena, 0-metilbufotenina (Ersparmer et al., 1967).

Em *B. bufo* e *B. viridis*, os mucopolissacarídeos foram revelados através de ensaios bioquímicos das glândulas parotóides. Sulfatos de condroitina A e C, estão presentes em *B. bufo* e *B. viridis* respectivamente e foi proposto que sua viscosidade poderia interferir no processo de retenção de água na secreção. Neles e em *Rana esculenta*, *Triturus cristatus* e *Salamandra maculosa*, identificou-se catalase com comparável envolvimento no metabolismo do veneno (Toledo & Jared, 1989).

A importância farmacológica e bioquímica de outras espécies tem denotado substância de altíssima toxicidade. A família *Dendrobatidae* é abundante em alcalóides esteróides (Toledo & Jared, 1989).

O menosprezo por parte dos descrentes e o respeito por parte dos habitantes das florestas, fizeram com que os índios do Chocó na Colômbia fossem em busca da rã kokoi, *Phyllobates bicolor* para a caça. Os índios daquela região na realidade haviam encontrado um potente alcalóide que causava dor picante, se em contato com as mãos, despertando o interesse deles que procuraram ter acesso a essa secreção

por meios das plantas locais e assim, empregavam-nas nas pontas das flechas para o envenenamento (Märki & Witkop, 1963). Esta secreção leitosa e abundante, jorra especificamente das suas costas e seu efeito em camundongos, rãs e coelhos é paralisação dos músculos, sistema nervoso central, atingindo mais o centro respiratório e coração (Märki & Witkop, 1963).

A toxicidade desse alcalóide em coelhos ou rãs é quase 100 vezes mais sensível que em camundongos, e em rãs e sapos esta letalidade foi evidenciada somente em doses altas. Em camundongos a dose letal foi perto de 10-15 mg/kg, em coelhos 0,1 mg/kg e sapos ou rãs acima de 200 mg/kg, cujo valor da DL_{50} do extrato bruto encontrada em camundongos, foi de $570 \pm 40 \mu\text{g/kg}$ subcutaneamente e $2,7 \pm 0,2 \mu\text{g/kg}$ por via endovenosa em ratos (Märki & Witkop, 1963). O contato com pequenas quantidades do veneno de *Phyllobates terribilis* com a face, dá impressão de queimadura conseqüente da penetração da toxina nos folículos pilosos, sendo considerada uma das mais violentas já conhecidas (Toledo & Jared, 1989).

A família *Dendrobatidae* é uma das mais mencionadas por sua toxicidade. A espécie *Dendrobates auratus* prestou-se como alimento da serpente *Thamnophis sirtatis*, e aproximadamente 89,6 % delas não foram ingeridas, enquanto de *B. americanus* sobreviveu somente 3,4 % da população. O veneno de *D. auratus* causou na serpente convulsão, perda do equilíbrio e enrolamento do corpo, e com a outra espécie citada nada foi constatado (Toledo & Jared, 1989, Daly et al., 1994).

Os dados sobre o extrato da pele de *D. auratus*, mostrou três diferentes classes de alcalóides nas espécies estudadas nas regiões da América Central (Daly et al., 1992). Uma parte da população de

aminas pesquisadas continham os alcalóides histrionicotoxinas, pumiliotoxina-A e decahidroquinolinas, a segunda; histrionicotoxinas, pumiliotoxina-A e uma indolizidina e a terceira, histrionicotoxina, homopumiliotoxina, uma decahidroquinolina, e uma variedade de indolizidinas e pirrolizidinas, e isto talvez seja resultado de fatores genéticos, ambientais, determinantes alimentares, simbiose com microorganismos os quais traçam o perfil dos alcalóides (Daly et al., 1992).

Em experimentos realizados com espécies *D. aurarus* em cativeiro, foi evidenciado a ausência da produção de alcalóides. Com a finalização dos ensaios, conclui-se que fatores ambientais são essenciais para o acúmulo de alcalóides e mesmo com variados tratamentos com os mesmos, não resultou em aumento dos níveis de alcalóides (Daly et al., 1994). Cerca de 300 alcalóides foram examinados e caracterizados no extrato de *Dendrobates*, representando 18 classes estruturais, e várias classes continuam desconhecidas. A ausência de alcalóides foi detectada também nos gêneros *Epipedobates* e *Phyllobates*, quando em cativeiro (Daly, 1995).

A classe da pumiliotoxina-A, freqüentemente encontrada na pele de todos os anfíbios que têm alcalóides lipofílicos exceto nas salamandras que apresentam unicamente samandarinas. Estas classes de alcalóides contêm toxinas ativas com ação nos canais de Na^+ e possivelmente cálcio (Ca^{++}), propiciando defesa contra o predador (Daly, 1995).

Do gênero *Dendrobates*, as pumilotoxinas, histrionicotoxinas e as gefirotoxinas são alcalóides piperidínicos que operam em um canal associado ao receptor para acetilcolina (Ach) na junção neuromuscular,

que situada na membrana celular do músculo abre, possibilitando a entrada de Na^+ e potássio (K^+), no ato do acoplamento da Ach com o receptor. Para as histrionicotoxinas e gefirotoxinas, a ação constatada foi de bloqueio da passagem dos íons, em associação com o canal e o receptor da Ach, não havendo assim contração muscular (Toledo & Jared, 1989). Quanto a pumiliotoxina-B, esta age talvez sobre os canais facilitando a saída de íons Ca^{++} do retículo endoplasmático e retardando a sua recuperação para a organela, tornando a contração muscular intensificada e prolongada (Toledo & Jared, 1989).

As atividades farmacológicas do extrato de *Pseudophryne coriacea*, uma espécie nativa da Austrália, confirmou mais uma vez a ação do alcalóide no sistema cardiovascular. Evidências experimentais mostraram que na pressão arterial e no coração de coelhos, os efeitos foram do tipo dose dependente. A hipotensão indicou ter um componente colinérgico envolvido, devido a sua inibição por atropina e o motivo da não elevação da pressão arterial, talvez tenham alguma relação com catecolaminas liberadas pelos terminais nervosos adrenérgicos da vasculatura (Severini et al., 1992). Essa rã produziu no coração uma série de desordens no ritmo, cuja implicação pode se dever tanto a liberação da Ach, quanto do efeito direto sobre o miocárdio e todas essas ações talvez se devam ao envolvimento resultantes do mecanismo da toxina, envolvendo direto e indireto dos canais de Na^+ (Severini et al., 1992).

O gênero *Dendrobates* desponta como possuidor de uma grande diversidade de alcalóides na pele, assim como em outras famílias estes foram também identificados na secreção cutânea, destacando-se então as espécies *Melanophryniscus moreirae*, *Pseudophryne semimarmorata* e

Mantella aurantiaca, espécies da família *Bufo* e *Myobatrachidae* e *Ranidae*, também em seu veneno foi identificado pumiliotoxina (Toledo & Jared, 1989).

Pertencente a este grupo a batracotoxina, um alcalóide de anfíbios, que provoca aumento da liberação espontânea do transmissor, contração muscular em preparações neuromusculares e estimulação da produção de adenosina cíclica 3,5 monofosfato (AMPC) no cérebro, mostrou existir uma ligação destas ações com a despolarização da membrana celular, graças ao aumento da permeabilidade das membranas excitáveis aos íons Na^+ (Narahashi, 1974, Toledo & Jared, 1989). Esta toxina tem ação intensa nos tecidos cardíacos, muscular e neural, onde experimentalmente mostrou-se competente em alterar a ativação e inativação do canal de Na^+ , ligando-se em seu sítio receptor, repercutindo no animal sobre a forma de dispnéia, perturbações na coordenação e no equilíbrio do animal, convulsão clônica e arritmias cardíacas (Albuquerque et al., 1971, Catterall, 1980, Toledo & Jared, 1989).

Em outras famílias de anuros também foram encontradas essas aminas biogênicas na pele, como nas espécies da família *Leptodactylidae* que apresentam serotonina, histamina, leptodactilina (Toledo & Jared, 1989). Num estudo sistemático das aminas biogênicas ativas no extrato de *Leptodactylus pentadactylus labyrinthicus* coletada em Missões na Argentina, foram encontradas grandes quantidades de histamina e imidazolealquilamina foram detectadas (Erspamer et al., 1963). Em cromatografias do extrato de *Leptodactylus*, foram identificadas imidazolealquilaminas como histamina; 4 (2-metilaminoetil)-imidazole; 4 (2-dimetilaminoetil)-imidazola; , 4,5,6,7- tetrahydroimidazo-[5,4, -c]

piridina e 6-metil-4,5,6,7-tetrahidroimidazo-[5, 4,-c] piridina (Erspamer et al., 1963). Estudos com histamina, N'metilhistamina e N'N'-dimetilhistamina, apresentaram um potente efeito no íleo de cobaia, e em análise quantitativa feita com cinco espécimes capturadas em setembro de 1961, foi evidenciado que o conteúdo de imidazolealquilaminas na pele seca foi histamina 360-400, N'metilhistamina 250-300, N'N'-dimetilhistamina, 100-200, espinaceamina 60-70, 6-metilespinaceamina 200-220 µg de base livre/g de tecido seco (Erspamer et al., 1963).

Investigações com espécimes do gênero *Rana*, mostraram que havia uma maior concentração de serotonina na pele daqueles que tinham hábito semiterrestre e terrestre, isto quando comparada com espécies aquáticas que tinham poucas ou nenhuma serotonina. A razão disto poderia estar vinculada ao tipo de vida destes animais, pois aqueles terrestres estariam mais susceptíveis a ação dos predadores do que os aquáticos, que estariam naturalmente protegidos devido ao meio onde vivem, enfatizando o papel defensivo da serotonina (Toledo & Jared, 1989).

Em linhas gerais muitas destas aminas encontradas em anuros não *Bufo* e *Rana*, apresentam atividades farmacológicas e são bastantes conhecidas como leptodactilina que bloqueiam a transmissão sináptica neuromuscular, com efeitos semelhantes ao curare; histamina com ação hipotensora e provoca relaxamento nos músculos dos vasos sanguíneos mais delgados, contração da musculatura lisa dos brônquios e intestino, e aumento da permeabilidade vascular, são estimulante das secreções biliar e gástrica. Mas, em oposição a isto, em animais roedores e coelhos, esta assume uma ação constritora nos vasos sanguíneos maiores. A contração torna-se intensa nos músculos atrial e ventricular intervindo

no fluxo do Ca^{++} , podendo ligar-se aos receptores que participam da ativação da bomba protônica nas membranas das células parietais do estômago, e também participar nas reações de hipersensibilidade, impulsos sensoriais cutâneos que provocam prurido e dor (Toledo & Jared, 1989).

Os alcalóides elaborados pelos anfíbios representam defesas químicas que teriam alguma relação com as colorações vivas “de aviso”, toxicidade e gosto desagradável para predadores potenciais (Toledo & Jared, 1989). Publicações mais recentes, indicaram que quase todos estes alcalóides são derivados de insetos e miriápodes (Clarke, 1997).

Outro composto numeroso nos anfíbios é os peptídeos que podem ser classificados em vários grupos, entretanto possuem analogias com peptídeos de diversos órgãos de mamíferos, servindo de guia para investigação da provável ocorrência idêntica e similaridade molecular nos tecidos gastrointestinais e tecidos neurais. Estes exercem papel do tipo hormônio gastrointestinal, autacóides, neurotransmissores e fatores de liberação (Toledo & Jared, 1989, Bevins & Zasloff, 1990, Simmaco et al., 1991). Dentre outros modos de ações destacam-se também como possuidor de atividade microbiana, hemolítica, propriedades citotóxicas, reguladores de um receptor específico, liberação de histamina *in vitro* e atividade quimiotóxica que facilita a atração entre macrófagos (Bevins & Zasloff, 1990, Lazarus & Attila, 1993, Daly et al., 1992).

Literaturas investigadas por Toledo & Jared (1989), listam alguns destes peptídeos, por exemplo *Bombina variegata* produz bombinina; *Eleutherodactylus* e *Leptodactylus*, carnosina; *L. pentadactylus*, *Hyla caerulea*, *Xenopus laevis*, ceruleína, *Crinia geogiana*, “crinia”

angiotensina; *Rana pipens*, pipininas e rohdeinatensina, porém em *Phyllomedusa*, *P. bicolor*, *P. rohdei*, *P. sauvagei*, são encontradas dermofina, filoceruleína, filomedusina, filocinina, rohdei-litorina, sauvagina, triptofilinas, etc.

Em *L. pentadactylus labyrinthicus*, na América do Sul e *Xenopus laevis* da África do Sul, apresentaram em sua pele um polipeptídeo conhecido como caeruleina, e em grupos de *L. pentadactylus labyrinthicus*, estes variam de 10 a 500-600 µg/g de tecido. Caeruleina ou caeruleina-like foram encontradas na pele de *Leptodactylus*, assim como também 5-hidroxiindola alquilamina e imidazola alquilamina, e em outras espécies deste mesmo gênero 5-hidroxiindola alquilamina e caeruleina-like poderiam estar ausente. A presença da caeruleina e caeruleina-like, poderiam ser em função da participação no processo secretório da pele ou na troca de água e eletrólitos através da pele ou ambos (Anastasi et al., 1970, Bevins & Zasloff, 1990).

Estudos mais aprofundados com *Xenopus laevis*, mostraram que na secreção das glândulas dérmica e granular tinham alta concentração de caeruleina que apresentaram similaridade com o peptídeo gastrina-like e colecistocinina. A liberação de caeruleina da pele poderia ser uma conseqüência da liberação, especificamente, evocada por estímulos adrenérgicos, e, que através de um mecanismo holócrino todo o conteúdo poderia ser expulso na superfície da pele, e essa sincronia resultaria em restabelecimento do estoque do peptídeo (Dockray & Hopkins, 1975, Bevins & Zasloff, 1990).

Experimentos minuciosos com frações de um peptídeo isolado de *Bombina variegata*, mostraram tanto uma ação antimicrobiana como hemolítica. Nas frações estudadas havia um peptídeo responsável por

estes efeitos denominado de bombinina (Simmaco et al., 1991). Neste gênero ainda, da espécie *B. bombina*, foi isolada outro peptídeo constituído de 14 aminoácidos, designado de tetradecapeptídeo, chamado de bombesina com vários efeitos em mamíferos, como indução da hipotermia, estímulo do crescimento e replicação do ácido desorribonucléico (DNA), estimulação da liberação de muitos hormônios gastrointestinais, e homologia com peptídeo liberador de gastrina de 27 aminoácidos de mamíferos (Spindel et al., 1990). A altasina isolada do gênero *Alytes* da família *Discoglossidae*, também um tetradecapeptídeo, que tem ações semelhantes a outras exercidas pela bombesina quanto ao de provocar hipotensão, funcionar como estimulante da musculatura lisa do útero e intestino, e das secreções gástrica e pancreática (Toledo & Jared, 1989).

Na pele de *Rana temporaria*, foi encontrado nonapeptídeo altamente concentrado conhecido como bradiginina, igualmente àquele isolado do veneno da cobra *Bothrops jararaca* na forma pura. Esta age reduzindo sensivelmente a pressão sistólica e diastólica, e devido a sua ação dicotômica, por um lado causa vasodilatação das arteríolas sistêmicas e por outro pode gerar contrações das grandes artérias e maioria das veias; no músculo liso extravascular os efeitos são os mais diversos; em útero de rata a musculatura contraiu e no duodeno relaxou com a presença da bradiginina (Rocha e Silva & Rothschild, 1974, Toledo & Jared, 1989).

Outra classe de peptídeo os tripeptídeos foi encontrada na pele de *Rana pipiens*, *R. catesbeiana* e *Xenopus laevis* que, quando comparados com os de mamíferos, agiam como hormônio liberador da tireotrofina, contudo de função desconhecida. Há suspeita de que estes façam parte

daquele grupo de toxina com função defensiva ou talvez atuem como neuromodulador (Toledo & Jared, 1989). A caeruleína tida como decapeptídeo, em cães, coelhos e no homem, leva a uma hipotensão, como também foi visto com a fisalemina, efeitos similares na pressão arterial de cães e coelhos. (Toledo & Jared, 1989)

Com ação parecida aos peptídeos já citados, a hilambatina da família *Rhacophoridae*, a uperoleína que estimula o intestino grosso de coelhos e tem ação sialógena no rato. Um potente agente opióide é exercido pelas dermofinas que trazem em sua constituição D-alanina. Em secreção de *Xenopus laevis* foram identificados 30 compostos, dos quais 25 deles são peptídeos, como as xenopsinas que aumentam o fluxo sanguíneo para as supra-renais, pâncreas e íleo de cães; estimula a eliminação de insulina (INS) e glucagon (Toledo & Jared, 1989).

As seguintes toxinas foram descobertas tais como zetequitoxina com poder hipotensor, levando a arritmias e parada ventricular, típica da pele de *Atolopus zeteki*. Neste gênero ainda identificou-se a presença de TTX; chiriquitoxina nos ovos de *A chiriquiensis* com ação neurotóxica. No sudeste do Brasil, foi encontrado um composto correlato a TTX, a efipiotoxina de *Brachycephalus ephippium*, farmacologicamente age paralisando os membros posteriores de seus agressores, letargia, alteram o ritmo respiratório e causa convulsão clônica (Toledo & Jared, 1989). Uma miscelânea de compostos foi ainda identificada na pele dos anfíbios. Um deles é a catalase isolada de *Rana esculenta*, ácido γ -aminobutírico (GABA) em *Hylambates maculatus*, lectinas em *X. laevis*, sendo este último provavelmente tóxico e com considerável concentração nas glândulas mucosas e granulares (Toledo & Jared, 1989).

Os anfíbios elaboram ainda em sua secreção defesas químicas de procedência protéica e como as demais substâncias, exercem efeito nos sistemas vitais daqueles que os atacam, resguardando estes animais das intempéries do meio.

Pouco estudadas quanto ao aspecto farmacológico essas proteínas em anuros foram isoladas e clonadas, como descrevem Lazarus & Attila (1993). Eles em seu artigo iniciam a relação com as proteínas granulares (Berger & Kreil, 1989, Probst et al., 1990, Hauser & Hoffman, 1992), β -galactosídeo ligado a lecitina (Bols et al., 1986, Marschal et al., 1992), fator de crescimento xP2 (Hauser et al., 1992), enzimas hospedeiras (Michl & Pastuszyn, 1964, Mollay et al., 1986, Mizuno et al., 1987, Ohsuye et al., 1988, Iwasaki et al., 1991), endopeptidase (Michl & Pastuszyn, 1964, Csordás & Michl, 1969, Gibson et al., 1986, Giovannini et al., 1987, de Moraes Carvalho et al., 1992), expeptidases (Michl & Pastuszyn, 1964, Csordás & Michl, 1969, Mollay et al., 1986, Kreil, 1990).

Lazarus & Attila (1993), refere-se no mesmo artigo a uma categoria de proteínas com efeito nocivo, estudada tanto em anuros quanto em caudata. O primeiro trabalho realizado na década de 60, objetivava esclarecer decisivamente a composição da secreção da pele dos anfíbios da Europa especificamente na subfamília *Bufo*idae. Inicialmente foram as famílias *Ranidae* e *Discoglossidae* e dessa última, as espécies *Bombina bombina*, *B. variegata* (Michl & Kaiser, 1963). Devido a ampla distribuição neste continente de um tipo de sapo comum na região da Bohemia, Tchecoslováquia, bem como a sua letalidade e escassas informações a seu respeito, a espécie *Pelobates fuscus* foi

objeto de estudo em 1927, quando Gessner, sob condições experimentais mostrou a secreção do animal *in vitro* (Lábler et al., 1968).

As investigações prosseguiram focalizando a hemólise a qual mediante aquecimento a 90° foi abolida, e também em animais de outros gêneros e nele próprio este apresentou sua potência letal (Lábler et al., 1968). Os ensaios continuaram com a finalidade de examinar se havia presença de serotonina e seus derivados na pele, e na busca da descoberta e indícios do possível mecanismo de ação envolvido na hemólise. Essas tentativas foram frustradas, pois as mesmas estavam ausentes no tecido cutâneo deles (Ersparmer, 1954). Sobre o veneno desta mesma espécie, dados revelaram também sua toxicidade demasiada em camundongos na dose de 0,02 µg/g por via endovenosa. Tratava-se então, de uma proteína cujo PM era de 35,000, onde a fração bruta provocou hemorragia e hemólise, descartando que seu mecanismo tóxico envolvia o sistema cardiovascular (Lábler et al., 1968).

Mais tarde, a secreção cutânea de *B. variegata pachypus* foi estudada mediante a suspeita de que as proteínas existentes no veneno poderiam apresentar atividade anti-microbiana. A comprovação deste fato ocorreu quando foi testada a ação biológica do veneno com *Bacillus megaterium* ATCC 04/3003, *B. subtilis* ATCC 6633, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aurea* ATCC 0209. As cepas mais sensíveis foram *S. aureus* e *B. subtilis*, onde a inibição do crescimento foi em diluições de 1:8 e 1:4 respectivamente, bem como, ocorreu inibição do diâmetro do halo com as mesmas diluições, que se compararam com a da penicilina G na solução de 4 µg/ml. Ensaio bioquímicos revelaram que se tratava de uma proteína sensível

termoestável, de baixo PM estimado em 6,700, que difere dos peptídeos isolados do próprio veneno e com a mesma ação (Barbeiro et al., 1987).

Em caudata foi identificada a maior toxina protéica isolada em *Triturus cristatus*, conhecido como salamandra aquática de crista. Diante do perigo ou de microorganismo patógenos, as salamandras liberam um produto espumante, esbranquiçado, temível por seus agressores desencorajando-os, tendo com tornando possível convivência entre eles no mesmo ambiente (Jaussi & Kunz, 1978). Do teor total de proteínas existentes na mistura bruta, cerca de 45 mg foi de proteína tóxica, sendo considerada o maior componente do veneno. O PM estimado desta toxina foi de 160 KD, com subunidades entre 40 a 50 KD. Farmacologicamente os efeitos do material bruto e da toxina purificada observados *in vivo* no período de 0 a 24 horas foram convulsão tônica, morte por espasmos e debilidade dos músculos respiratórios, e de 24 a 96 horas perda do pêlo, destruição dos tecidos estruturais como muscular, gorduroso e conectivo. Em situações *in vitro*, de 0 a 24 horas, causou hemólise em eritrócitos humano e com o aumento da observação danos na parede celular do *Bacillus megatherium* (Jaussi & Kunz, 1978).

As espécies *Pseudotriton ruber* e *P. montanus diastictus* também caudata foram alvo de estudos. Essas salamandras vermelhas, pertencentes a família *Plethodontidae* com cerca de 200 espécies, produziam seu veneno o qual levava a redução do paladar daqueles que os molestavam (Brandon & Huheey, 1981). Um aspecto também considerado foi a semelhança da salamandra *P. ruber* com a largatixa vermelha *Notophalmus viridescens*. Evidenciou-se na largatixa uma extremidade letal e TTX emética, tornando-a mortal (Howard & Brodie,

1971, 1973). A similaridade de aparência e cor entre as duas espécies, mostraram a existência de um mimetismo do tipo Batesian (Howard & Brodie, 1971, 1973, Pough, 1974).

A pele das salamandras caracterizam-se pela nocividade e abundância de pseudotritontoxina de eficácia igualável a TTX descrita nas salamandras da América do Norte. Os sintomas da pseudotritontoxina em camundongo foram de hiperextensão da pata traseira, abaixamento das costas, irritabilidade, hipotermia, quiescência, debilidade prolongada, coma e morte, baseado na DL_{50} realizada entre 12 a 18 horas (Brandon & Huheey, 1981). Concentrada muito mais no dorso do corpo do que na barriga, intestino, fígado e ovário, essa toxina apresentou um alto PM que lhe assegurou um certo destaque entre os venenos dos anfíbios, e até mesmo com relação a TTX que é de baixo PM e tão letal quanto a sua toxina. Sua estrema ligação com outras espécies tais como *N. viridescens*, *P. montanus diastictus*, *Gyrinophilus porphiticus*, demonstrou haver uma relação de intragabilidade entre eles. A identificação de toxina nas duas espécies de salamandras indicou sua nocividade a predadores, e que a variação geográfica, simetria, tamanho, etc podem denotar, dependendo do número e tipo, o grau de abundância da secreção, constituindo pistas fundamentais ao predador, fazendo com eles ou se arrisquem ou desistam e vão a procura de presas alternativas (Brandon & Huheey, 1981).

1.3 AS NEUROTOXINAS ANIMAIS

As neurotoxinas foram bastante estudadas, e o seu modo de ação envolve a participação de diversos canais. A toxina das anêmonas, TTX, saxitoxina (STX), δ -conotoxinas, etc, atuam nos canais de Na^+ ; apanina,

R 1324764/00

agitoxina, margatoxina, noxiutoxina, etc, nos canais de K^+ ; ω -conotoxinas, ω -agatoxinas, agelenina, maitotoxina, dentre outros, nos canais de Ca^{++} e nos canais de Cl^- , a clorotoxina (Barchi, 1982, Catterall, 1988, Adams, 1996, Sauviat, 1997). As neurotoxinas ainda exercem efeito ao nível pré-sináptico, como β -bungarotoxina, ciotoxina, notexina, agkistrodotoxina; exocitose de proteínas, como toxina *botulinum*, ω -latrotoxina, α -latro-insectotoxina e outros, e nos receptores para glutamato como ácido quisquálico, ácido domoico, ácido kainico, e outros (Adams, 1996).

Vale registrar que muitas tentativas para a elucidação do mecanismo natural de ação das neurotoxinas, foram intensificadas com estudos em animais marinhos devido as suas propriedades biológicas em potencial, onde se buscava tirar maiores proveitos dos seus princípios ativos, e isto se deu com a aplicação de técnicas bioquímicas altamente satisfatórias (Wu & Narahashi, 1988). A descoberta por exemplo de toxinas como a TTX e substâncias correlatas, potentes por sua toxicidade em diversos componentes podem ser difundidos de maneira uniforme. Atrelado a isto, possuem algumas funções fisiológicas com caráter protetor como visto em *Clevelandia ios*, *Acanthogobius flavimanus*, *Gillichthys mirabilis*, que continham substâncias semelhantes a TTX de ação no axônio da rã touro (Elam et al., 1977).

A evolução dessas toxinas protéicas, assim como as seqüências de enzimas digestivas e hormônios, significam diferentes níveis de desenvolvimento evolutivo. Todos os estágios de evolução da função digestiva desempenhada por sistemas enzimáticos, informações adicionais sobre o veneno das glândulas das cobras, mostram que sua evolução partiu do trato digestivo, levando a hipótese de que um certo

número de enzimas digestivas, alguns hormônios e toxinas de veneno das cobras, derivem de um número muito pequeno de ancestrais (Ivanov & Ivanov, 1978).

Estudos sobre a origem comum da INS e toxinas do veneno de cobra, por histoquímica e radioimunoquímica, estabeleceram que as glândulas submaxilares de camundongos e ratos, continham INS-like. Como aprofundamento das investigações através de métodos usando-se anticorpos (Ac) fluorescentes, detectou-se sintetização e/ou acúmulo destas substâncias nas secreções das células glandulares dos ductos salivares, mostrando a preservação INS-like nas glândulas salivares (Ivanov & Ivanov, 1978).

Ivanov & Ivanov (1978), relatam ainda estes autores, que as glândulas de veneno das cobras são modificações das glândulas salivares, estabelecendo um paralelismo entre mudanças anatômica e morfológica e mudança estrutural e funcional com o ancestral molecular, culminando com a formação da toxina, assumindo assim que as proteínas constituem uma superfamília de alto nível, isto é, uma hipersuperfamília. Estes autores prosseguiram comentando sobre os estágios de evolução dos organismos que apresentam entre si, similaridades como por exemplo viscotoxinas (*V. álbum*) das plantas com a neurotoxina do veneno de escorpião (*A australis hector*), sugerindo haver um ancestral comum não somente entre elas, mas comum a outras, como a pró-INS, ancestral este que por ser bastante antigo, existiu antes mesmo da divergência entre os vegetais e animais, a quase 1.500 milhões de anos atrás. Em seu artigo ainda trazem uma provável seqüência evolutiva das toxinas: carditoxinas→neurotoxinas grandes e pequenas das cobras (Ivanov & Ivanov, 1978).

Ivanov (1980), acrescenta a esses achados, que a referida hipersuperfamília apresenta em seu grupo toxinas raras, sendo inerente as toxinas um grau de preservação da periodicidade cuja expressão ainda é obscura, persistindo tanto na toxina da cobra como de escorpião. Isto sugerindo haver traços de preservação com um pequeno peptídeo antigo, de onde evoluiu toda esta grande família, contudo com diferentes níveis de evolução, mostrando uma ligação com o ancestral das serinas proteases e pró-INS a mais de 1.500 milhões de anos e assim, a ordem de evolução seria: serina→protease→pró-INS→proteínas tóxicas (Ivanov, 1980)

1.4 OS ANFÍBIOS E O MEIO AMBIENTE

O perigo ronda estes animais, ameaça a sua existência e provoca desequilíbrio em todos os aspectos, promovendo uma reação em cadeia levando não só o meio ambiente ao caos como ocorrendo perdas na descobertas de novos compostos que possam ajudar a ciência.

Os anfíbios em muitas partes do mundo estão diminuindo e até em alguns casos desaparecendo do seu *habitat* completamente nativo. Isto vem caracterizando-se como um fenômeno global desde de 1990 (Blaustein & Wake, 1995). Considerados como controle de qualidade da saúde do planeta, porque estão em íntimo contato com elementos naturais que os cercam, como por exemplo nos estágios larval, onde as rãs vivem na água e quando adulta na terra; a delicadeza de sua pele auxiliando na respiração; a exposição de seus ovos ao sol, água e luz; seu hábito alimentar que pode variar de herbívoros (larva) a carnívoro (adultos) (Blaustein & Wake, 1995, Shi et al., 1996).

O bom estado de seu desenvolvimento repercute como anda o seu ecossistema, sendo os fatores ambientais responsáveis diretos pelo declínio dos mesmos. Várias investidas foram feitas para descobrirem-se as causas da extinção. Uma delas foi a depredação da estratosfera de ozônio, outro seria o aumento da radiação ultravioleta que rompendo a camada de ozônio, substitui a absorção dos raios solares pela radiação, indo atingir os seus ovos. As causas detectadas foram danos no DNA, resultando em perda da fertilização como observado nas espécies de *Rana cascade* e *B. boreas*. Essa radiação no homem poderia ser percebida pela supressão do sistema imune, com o aparecimento de catarata e câncer de pele. (Wake, 1991, Blaustein et al., 1994, Blaustein & Wake, 1995).

Este tipo de lesão ao nível de DNA poderia quebrar as bandas e assim formar novas estruturas o qual em certas algas, plantas, peixes, marsupiais e anfíbios seriam revertidos, graças a uma enzima removedora de estruturas danosas, a fotoliase que funciona como um dispositivo natural disponível nestas emergências. Em outros estudos realizados ainda sobre esta enzima, indicou que sua presença nos ovos de anfíbios, estaria gerando diminuição das populações, como visto em *Hyla regilla* e *Ambystoma gracile*, pois ocorre diminuição da produção desta enzima (Wake, 1991, Blaustein et al., 1994, Blaustein & Wake, 1995).

A destruição também pode se dever a presença de fungos em lagos e açudes como *Saprolegnia*, que age contaminando essas águas onde há cultivo de peixes, como salmão e truta, bem como ovos de anfíbios que com deficiência no sistema imune, acabam não resistindo à infecção. A radiação ainda vai reduzir populações como nas florestas da Costa Rica

e Austrália, especificamente aqueles que vivem sob as folhagens densas. O aviso de depredação também pode ser detectado com a modificação do *habitat* atingindo até outros animais. A poluição do tipo chuva ácida, neve, fungicidas, herbicidas, inseticidas, químicas industriais interferem na reprodução e desenvolvimento dos anfíbios; compostos sintéticos que simulam os hormônios naturais, em pássaros, peixes e répteis reduziram o esperma e diminuíram a genitália masculina (Wake, 1991, Blaustein & Wake, 1995).

É lamentável que populações inteiras de anfíbios foram e continuam sendo extintas ou em conseqüência de doenças causadas pela bactéria *Aeromonas hydrophila*, que por ser altamente contagiosa levou a morte de sapos, rãs e salamandras; ou por introdução de peixes no meio onde vivem, como *Rana muscosa*, a rã amarela da Califórnia; ou precipitação ácida como *Ambystoma tigrinum*, a salamandra tigre da América do Norte; ou chuva ácida como *B. periglenes*, o sapo da Costa Rica; ou por radiação ultravioleta como *B. boreas*, o sapo do oeste da América do Norte e finalmente por causas desconhecidas como *Taudactylus acutirostris*, a rã da chuva do focinho pontudo, *B. bufo*, o sapo comum na Europa, *Atelopus varius*, a rã arlequim da Costa Rica, *Nyctimystes dayi*, a rã da árvore da Austrália, *B. calamita*, o sapo da Grã Bretanha e *Rheobatrachus silus*, a rã do riacho gástrico da Austrália, possivelmente extinta (Blaustein & Wake, 1995).

A vulnerabilidade dos anfíbios que no reino animal são uns dos mais representativos, vem sendo causa de grande preocupação por parte dos estudiosos, mobilizando esforços para tentar conter esta agressão não somente ambiental, mas também científica.

Até a presente data, somente três proteínas tóxicas em anfíbios foram isoladas como anteriormente referendadas. Da espécie, objetivo de nossa pesquisa, foi estudada em seu veneno, um fator ansiolítico que testado por via intraperitoneal em ratos e camundongos apresentou efeito tranqüilizante e comportamento social diferente (Nery, 1998); uma fração peptídica testada em ratos, produziu intenso edema de pata e degranulação de mastócitos (Mota, 1999).

Visamos neste trabalho, estudar a presença de proteínas tóxicas produzidas na pele de *L. pentadactylus*, baseando-nos no fato de serem poucas as formações sobre esta espécie, como também de serem escassas as publicações sobre essas macromoléculas nocivas na pele desses anfíbios.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Purificar e realizar os estudos farmacológicos e eletrencefalográficos e determinar a seqüência parcial de uma nova neurotoxina da pele de *Leptodactylus pentadactylus*.

2.2 Específicos

- Purificar até a homogeneidade e em escala preparativa uma nova neurotoxina da pele de *L. pentadactylus* ;
- Realizar os estudos toxicológicos agudos, como DL₅₀, DE₅₀ e alterações comportamentais da toxina pura em ratos e camundongos;
- Estudar as alterações eletroencefalográficas em ratos da toxina purificada, na ausência e presença de drogas anticonvulsinantes;
- Determinar as seqüências parciais (internas I e II e o N-Terminal) da toxina pura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) adultos, machos com peso variando entre 200 a 250g; e camundongos (*Mus musculus*), machos, pesando de 20 a 30g. Rãs adultas, da espécie *Leptodactylus pentadactylus*, capturados no município de São Gonçalo – CE, foram utilizadas como fonte de matéria prima para obtenção dos extratos empregados neste programa de estudo.

Os animais (ratos e camundongos) empregados nesse trabalho foram oriundos do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do CCS-UFC ou Biotério Centrais da Escola Paulista de

Medicina - UNIFESP. Esses animais foram mantidos em condições apropriadas de laboratório com controle de ciclo de luminosidade 12/12 horas (claro-escuro), temperatura média de 21°C, e alimentação específica com água *ad libitum*.

3.1.2 Substâncias e reagentes

Tris-(hidroximetil) aminometano (Reagen, Brasil), ácido clorídrico (Synth, Brasil), cloreto de sódio (Reagen, Brasil), albumina bovina (Sigma, USA), natriumazid (azida) Merck, (Brasil), adrenalina (Sigma, USA), ácido acético (Isofor, Brasil), sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemical, Suécia), dietilaminoetilcelulose (Pharmacia Fine Chemical, Suécia), glicerina ou glicerol (Grupo Química, Brasil), azul de bromofenol (Merck, Brasil), cromassie brilliant blue G (B-1131, Alemanha), mercaptoetanol (Merck, Brasil) etc.

3.1.3 Aparelhos

Agitador

Phoenix AP56, Brasil

Balança analítica

Marte-AM550, Brasil

Balança de precisão

Mettler-Balance, USA

Banho-maria

Thermostat U10, Brasil

Bomba de Fluxo

Milton Roy Company, USA

Bombas para HPLC

Milton Roy, USA

Broca

Dremel - 395 Tipo A, USA

Câmara fria - Frost free

Metalfrio, Brasil

Centrifuga refrigerada

Annita I, Eslovenia

Cronômetro

Leônidas Trackmater, Alemanha

Cubetas de vidro

100-QU, USA

Detector de fluorescência

Shimadzu RF10AXL, Japão

Eletrencefalógrafo

Nikon - KOHDEN, Japão

Espectrofotômetro

Beckmann- modelo G 2400, Alemanha

Liofilizador

Edwards - Modulyo, Inglaterra

Líquidificador

Walita – Modelo BETA, Brasil

Mesa esterotáxica

Nikon - FDX, Japão

Multímetro

Hioki - 3007, USA

pHmetro

Micronal, Brasil

Pipetas automáticas

Gilson, França

Termômetro

ASPIN 09654.10, Brasil

3.1.4 Materiais diversos

Arame para solda

Fame, Brasil

Eletrodo bipolar (0,12mm)

Mazem, França

Eletrodo monopolar

Mazem, França

Ração animal

Produtor, Brasil

Parafusos de aço

RBA, Brasil

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção do veneno estudado

Para a preparação do material bruto, foram realizadas cinco extrações do veneno: 05/97, 06/97, 05/98, 06/98, 07/99, utilizando-se dois processos conforme mostrados a seguir:

3.2.1.1 Processo utilizando adrenalina

As rãs inicialmente eram submetidas à lavagem com água bidestilada, e em seguida receberam alíquotas de 1 ml de solução de adrenalina a 100 µg/ml em ácido clorídrico 0,01N, por via subcutânea, geralmente na região dorsal do animal. Após 20 minutos, esses animais eram manipulados, a fim de aumentar o nível de estresse, resultando em liberação de secreção das glândulas do corpo (Figura 3.2.1.1). Esse processo era executado tomando-se como referência a metodologia descrita por Nery (1998).

3.2.1.2 Homogeneizado da pele

Peles de rãs foram retiradas e imediatamente homogeneizadas em água bidestilada (1.3; p: v). O homogeneizado foi centrifugado a 5000g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante obtido liofilizado, logo após, sendo a seguir armazenado a - 25 °C em alíquotas de 500 mg.

O cálculo do rendimento percentual do processo extrativo foi efetuado pela razão entre a massa em miligramas de proteína purificada, pela massa em miligramas de proteínas totais do extrato bruto, multiplicado por cem.

3.2.2 Purificação do material bruto

3.2.2.1 Cromatografia de troca-iônica em coluna DEAE-Celulose

Um volume de 10 ml do veneno bruto liofilizado, ressuspendido em Tris HCl, 0,05 N, pH 7,5 (1:10; p:v), foi centrifugado a 5000 g,

durante 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante dessa amostra, foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna (30x2,6 cm) de DEAE-Celulose equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM, com fluxo de 60 l/h a temperatura de 4 °C. Após aplicação da amostra, a coluna foi desenvolvida com concentrações crescentes, passo a passo (steps) de NaCl de 50mM, 100mM, 200mM e 500mM contidas no mesmo tampão (Medeiros, 1997).



Figura 3.2.1.1 Extração do veneno de *Leptodactylus pentadactylus* administração subcutânea de 1 ml de solução de adrenalina a 100 µg em ácido clorídrico 0,01N.

3.2.2.2 Dessalificação da amostra

A metodologia utilizada para este ensaio foi semelhante a descrita em The World of pharmacia biotech (1995). A fração eluída com 100mM de NaCl da cromatografia em DEAE-Celulose, foi dessalificada por meio de uma coluna PD-10 em Sephadex G-10. Aliquotas de 05

ml/tubo foram coletadas e as leituras foram feitas em espectrofotômetro (230nm) e liofilizadas para em seguida serem estocadas a - 25°C. A atividade tóxica após a ressuspensão da fração purificada em salina, foi evidenciada por via endovenosa (e.v., veia peniana) em camundongos e ratos, e os sinais biológicos foram avaliados, segundo metodologia de Loomis & Hayes (1996).

3.3 CRITÉRIOS DE PUREZA

3.3.1 Eletroforese em gel poliacrilamida

A metodologia empregada nesse trabalho foi semelhante à utilizada por Medeiros (1997) embora com ligeiras adaptações, onde amostras da fração correspondente a 100 mM da coluna de troca-iônica DEAE-Celulose, a que melhor respondeu biologicamente; foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% em condições desnaturante e não desnaturante. Para a eletroforese desnaturante, as amostras foram preparadas com aquecimento a 90 °C por cinco minutos, na presença de 2-mercaptoetanol a 10 % e dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1 %. Para a eletroforese não desnaturante o processo foi repetido sem SDS e 2-mercaptoetanol e sem tratamento térmico. As proteínas usadas como padrão para peso molecular foram: anidrase carbônica (29 KD), ovalbumina (45 KD), albumina bovina (66 KD), fosforilase B (97 KD), β -galactose (116 KD) e miosina (205 KD). Para a visualização das bandas de proteínas, foi utilizada a coloração de Coomassie Brilliant Blue (CBB).

3.3.2 Atividade farmacológica das frações da eletroforese em gel policramida

As toxinas foram aplicadas em poços do gel de poliacrilamida não desnaturante. Dez poços do gel foram cortados horizontalmente em tiras de 3 mm de espessura; a seguir esses fragmentos foram macerados e deixados em repouso durante a noite em 2ml de água bidestilada. No dia seguinte, as frações foram centrifugadas e injetadas em alíquotas de 30 μ l e.v. em camundongos. Uma porção do gel foi cortada verticalmente e submetida a coloração por Coomassie Brilliant Blue para identificação da localização da banda de proteína da toxina purificada.

3.3.3 Estudo da atividade da toxina após incubação com enzimas proteolíticas

A toxina (100 μ l) foi incubada durante o período de 30 minutos com 100 μ l de tripsina (1 mg/ml) a 37 °C. A toxina foi também incubada com 100 μ l de quimotripsina (1 mg/ml) sob as mesmas condições experimentais. Após este procedimento as misturas foram aplicadas em poços do gel de poliacrilamida não desnaturante, e o experimento seguiu como descrito no item 3.3.2.

3.4 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS

3.4.1 Toxicidade aguda (DL₅₀)

Camundongos (*Mus musculus*) recebiam via e.v. (veia peniana), doses crescentes (10 a 2000 µg/kg) da toxina protéica purificada. Os animais foram divididos em grupo (n = 10), mantidos em jejum por 12 a 14 horas, com água *ad libitum*. O grupo controle recebia solução salina, num volume igual àquele empregado para os animais tratados com toxina. Os animais foram mantidos livres e sob observação acurada, onde os parâmetros biológicos eram registrados de acordo com tabela sugerida por Loomis & Hayes, 1996 (Tabela 3.4.1).

3.4.2 Estudo da dose efetiva convulsivante (DE₅₀)

A determinação da DE₅₀, foi efetuada segundo a metodologia proposta por Loomis & Hayes (1996), onde grupos de 10 camundongos machos, pesando de 20 a 30 gramas, recebiam por via endovenosa (veia peniana) doses crescentes (10 a 1500 µg/kg) da toxina. Os animais do grupo controle eram mantidos sob a mesma condição, só que recebendo solução salina ao invés da toxina.

3.4.3 Estudo de outros efeitos farmacológicos agudos *in vivo*

Os vários efeitos farmacológicos foram observados com doses entre 10 a 100 µg/kg (e.v.; veia peniana), de acordo com os parâmetros

descritos por Loomis & Hayes (1996), que se encontram descritos na Tabela 3.4.1.

TABELA 3.4.1 – AVALIAÇÃO FÍSICA E OBSERVAÇÃO DOS ANIMAIS NO ESTUDO DA TOXICIDADE REALIZADO COM A TOXINA EXTRAÍDA DA PELE DE *L. pentadactylus*.

PARAMETROS OBSERVADOS	
ATIVIDADES GERAIS	REAÇÃO BIZARRA
Locomotiva diminuída	Movimento de circo (acrobática)
Locomotiva aumentada	Caminhada
Saltando	Valsando
	Fuçando
FONAÇÃO	INTERAÇÃO SOCIAL
Diminuída	Comportamento exploratório diminuído
Aumentada	Comportamento exploratório aumentado
Normal	
CAUDA ANORMAL	SENSIBILIDADE AO TOQUE
Cauda rígida	Diminuída
Cauda Straub	Aumentada
Cauda flexível	
SALIVAÇÃO	CONVULSÕES
	Convulsões tônicas
	Convulsões clônicas
TREMORES	Subconvulsões
	Movimentos subconvulsivos
APNEIA	
CIONOSE	

Estes parâmetros experimentais foram obtidos conforme a metodologia descrita no texto (Loomis & Hayes, 1996). O tempo de observação compreendeu: 0, 30, 60, 120, 180 minutos, chegando até 72 horas.

Os animais (n = 5) usados neste teste foram camundongos machos, pesando em torno de 25 a 30 g. A via de administração usada foi e.v. (veia peniana), onde a toxina foi administrada em doses crescentes de 10-2000 µg/kg (DL₅₀) e 10-1500 µg/kg (DE₅₀)

3.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.5.1 Eletrencefalografia (EEG)

3.5.1.1 Preparação para registro eletrencefalográfico

Ratos e camundongos machos escolhidos ao acaso foram submetidos à anestesia, com: pentobarbital (0,97 g), hidrato de cloral (4,25 g), sulfato de magnésio (2,16 g), propilenoglicol (42,8 ml), álcool 90 % (11,5 ml) e água destilada q.s.p. O volume da dose aplicada em cada animal foi de 4 ml/kg, via intraperitoneal. E os parâmetros biológicos observados foram aqueles descritos por Loomis & Hayes (1996).

3.5.1.2 Procedimento cirúrgico e implantação dos eletrodos para registro eletrencefalográfico

Depois de serem anestesiados, os animais foram submetidos a tricotomia da região superior da cabeça e fixados ventralmente a mesa cirúrgica. Barras intra-auriculares foram introduzidas nos meatos externos auditivos e os incisivos superiores eram fixados (Figura 3.5.1.2).

A retirada da pele da região craniana, foi efetuada através de corte longitudinal, com rebatimento lateral. Foi removido o periósteo e algumas ranhuras foram realizadas para em seguida ocorrer fixação dos eletrodos.

Eletrodos bipolares (níquel-cromo de 0,15 mm), os mais profundos, foram introduzidos dorsalmente na região do hipocampo. Esses eletrodos eram formados por dois filamentos de níquel-cromo de 0,15 mm de diâmetro e revestidos por uma camada de verniz ao longo de sua dimensão. A região de contato com os tecidos biológicos era ligeiramente desgastada a fim de promover o contato elétrico. O local da implantação do eletrodo no hipocampo, foi determinado por meio de demarcação estereotáxica, e a tábua óssea foi delimitada, de acordo com as coordenadas do atlas estereotáxico (Paxinos & Watson, 1982): antero-posterior -2,8, lateral 1,9 e profundidade 3,6 mm. A perfuração da tábua óssea foi feita por meio de uma broca (Modelo 395, Dremel) para posicionamento permanente dos eletrodos em ambos os hemisférios.

Os parafusos de aço, em número de 3, foram implantados no crânio, de forma que dois ficavam simétricos à sutura mediana na região occipital, para registro eletrocortical e o outro posicionado na região do seio frontal, servindo como eletrodo de referência.

Todos os eletrodos foram conectados a um microconector de 5 saídas, que se fixava ao crânio com cimento acrílico, usado para fixação do capacete na cabeça do animal e para o isolamento do sistema. A pele foi suturada na região posterior, com exposição da parte superior do capacete segundo a metodologia descrita por Cooley & Vanderwole (1990).

3.5.1.3 Período pós-operatório

Os animais foram colocados em gaiolas individuais após a cirurgia e foram submetidos a observação no Biotério do Laboratório de Neurologia Experimental da UNIFESP (Figura 3.5.1.3).

Após o período de recuperação de uma semana, os animais foram reconduzidos ao Laboratório, para os procedimentos de experimentação subseqüentes.

3.5.1.4 Análise comportamental dos animais monitorados com os eletrodos intracerebrais

As manifestações evidenciadas (Tabela 3.5.1), durante tratamento agudo com a toxina (500 µg/kg; e.v.), e com o uso de anticonvulsivantes tais como: diazepam (10 mg/kg; i.m.) e fenobarbital (50 mg/kg; i.m.), no período de aproximadamente 30 minutos, antes da administração da toxina foram simultâneos ao registro eletrencefalográfico, onde os componentes desses grupos morreram após os procedimentos experimentais.

O acompanhamento dos animais que sobreviveram a ação da toxina (250 µg/kg; e.v.) frente aos anticonvulsivantes acima citados, era realizado todos os dias, por um período de uma semana.

3.5.1.5 Atividade elétrica cerebral

O registro eletrencefalográfico basal (padrão), foi obtido 10 minutos antes da administração da toxina em todos os animais desta etapa do protocolo experimental (Figura 3.5.1.5).

O registro da atividade eletrencefalográfica cortical e do hipocampo foi procedido, mantendo-se o equipamento calibrado com os seguintes parâmetros: sensibilidade (amplitude): 100 mV/cm; varredura: 10 mm/seg; constante de tempo: 0,3 seg; filtro passa baixa: 30 ciclos/seg. No papel onde ocorria o traçado eram anotados a identificação do animal, substância e dose utilizada, bem como, tempo de aplicação da droga.

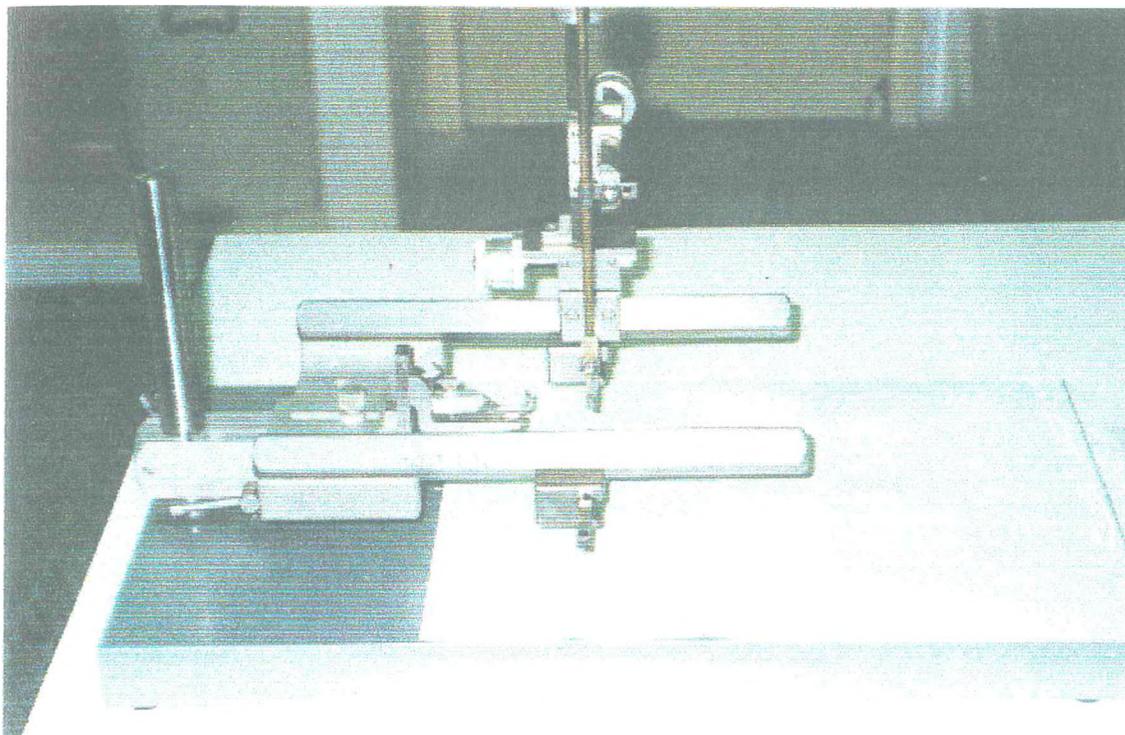


Figura 3.5.1.2. Aparelho estereotáxico para uso em ratos e camundongos; mostrando o apoio para a cabeça, suporte para eletrodos, barras para a fixação dos animais.



Figura 3.5.1.3 – Cirurgia realizada em exteriorótica concluída em camundongos, para posterior registro no eletrencefalógrafo.

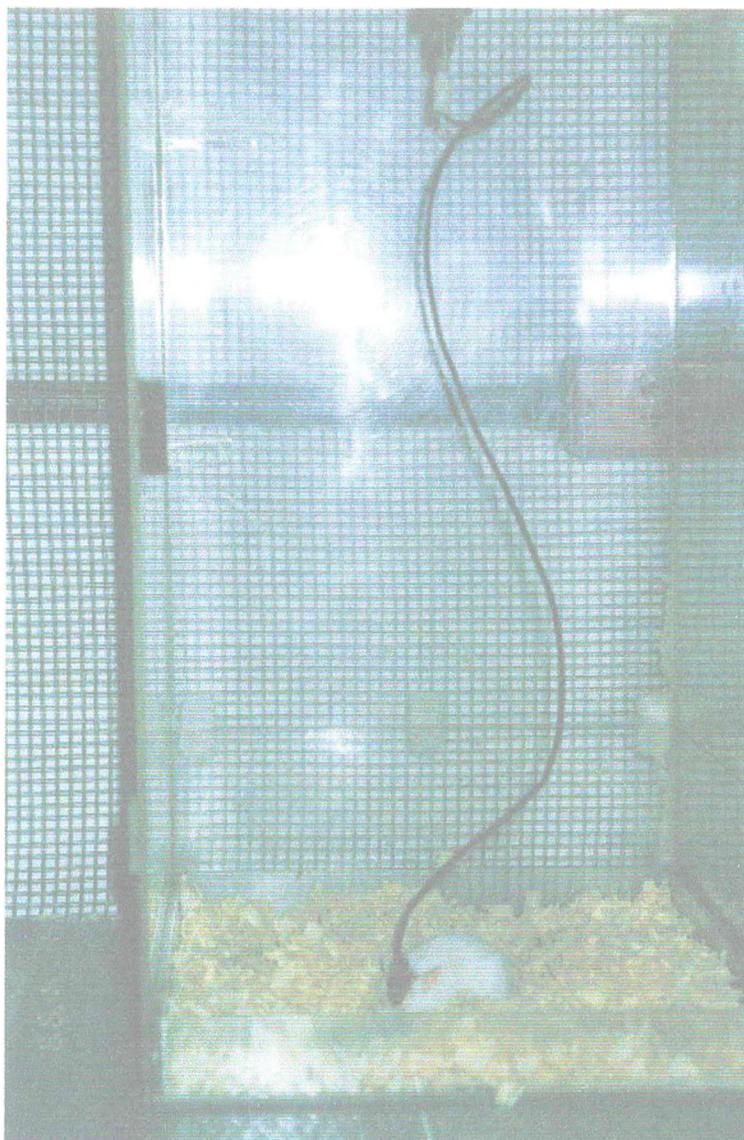


Figura 3.5.1.5 - Animal com capacete acoplado ao sistema de registro, pronto para iniciar a experimentação.

3.6 DETERMINAÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS INTERNAS (I E II) E N-terminal DOS AMINOÁCIDOS DA TOXINA PURIFICADA

O seqüenciamento de aminoácidos da toxina purificada foi efetuada pelo Service de Sequence de Peptides de L'Etat du Quebec, Canadá, segundo a metodologia descrita em Matsudaira (1987).

As características de hidrofobicidade e distribuição de cadeia, foram extraídas de Eisenberg et al. (1982).

TABELA 3.6 – HIDROFOBICIDADE DOS RESÍDUOS

AMINOÁCIDOS	ENERGIA LIVRE DE TRANSFERÊNCIA (Kj/mol)
ILE	3,1
PHE	2,5
VAL	2,3
LEU	2,2
TRP	1,5
MET	1,1
ALA	1,0
GLY	0,67
CYS	0,17
TYR	0,08
PRO	-0,29
THR	-0,75
SER	-1,1
HIS	-1,7
GLU	-2,6
ASN	-2,7
GLN	-2,9
ASP	-3,0
LYS	-4,6
ARG	-7,5

Fonte: Eisenberg et al. (1982). Hydrophobic moments in protein structure. *Faraday Symp Chem. Soc.*, 17, p. 109-120.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos empregados na análise dos resultados foram os da distribuição t (Teste t de student) sendo utilizados para a avaliação da significância dos resultados entre os grupos experimentais. Foi considerada significativa a hipótese de nulidade $<0,05$ (Vieira, 1983).

4 RESULTADOS

4.1 PURIFICAÇÃO DO MATERIAL BRUTO

4.1.1 Cromatografia de troca-iônica em DEAE-Celulose

A pele foi retirada, cortada em pequenos pedaços e homogeneizada em água bidestilada a 4 °C (1: 3; p : v), através de um liqüidificador com palhetas girando aproximadamente por 6000 vezes/minuto, durante 1 minuto e meio. O homogeneizado foi centrifugado a 5000 g por 30 minutos, sendo o sobrenadante liofilizado e armazenado a -25°C em pequenas alíquotas.

Após a cromatografia em coluna de DEAE-celulose (Figura 4.1.1), alíquotas de 100 µl das diversas frações obtidas foram injetadas e.v. em camundongos e ratos. Aquelas frações eluídas com 100 mM de NaCl causaram convulsões e foram em seguida liofilizadas, resultando em

resíduos sólidos de coloração, variando de amarelo a marrom, sem cheiro.

Alíquotas de 100 mM do tampão TRIS- HCl, pH 7,5 contendo 100 mM de NaCl foram injetadas (e.v. – veia peniana) e os animais não apresentaram nenhuma atividade farmacológica visível.

4.1.2. Dessalificação e estocagem da amostra purificada

A fração ativa eluída com 100 mM de NaCl em cromatografia DEAE-Celulose, foi depois dessalificada e liofilizada. A amostra que ficou sob a forma de um pó granular, solto, de coloração amarelada, foi estocada a -25 °C, cujo os efeitos farmacológicos foram preservados durante mais de um ano.

4.2 CRITÉRIOS DE PUREZA

4.2.1 Eletroforese em gel poliacrilamida

Na eletroforese a 6 % sem SDS da fração 100 mM, foi identificada uma única banda de proteína que apresentou atividade convulsivante quando eluída do gel (Figura 4.2.1-A). Na eletroforese a 6 % com SDS, foi identificada uma banda majoritária de peso molecular (PM) estimado em 65 KD, quando comparado ao padrão de alto PM (Figura 4.2.1-B).

4.2.2 Determinação da concentração de proteínas

De 779,79 g de pele retirada de 46 rãs, foram obtidas 22 g de veneno bruto liofilizado. O rendimento bruto (RB) médio do veneno a partir de 1 g do veneno liofilizado, foi de aproximadamente 2,59 mg da toxina purificada, isto é, em termos percentuais 0,26 % (p:p).

O caráter protéico da toxina foi confirmado pela inativação mediante o calor (aquecimento a 100 °C por 5 minutos), e por tratamento proteolítico com tripsina e quimotripsina.

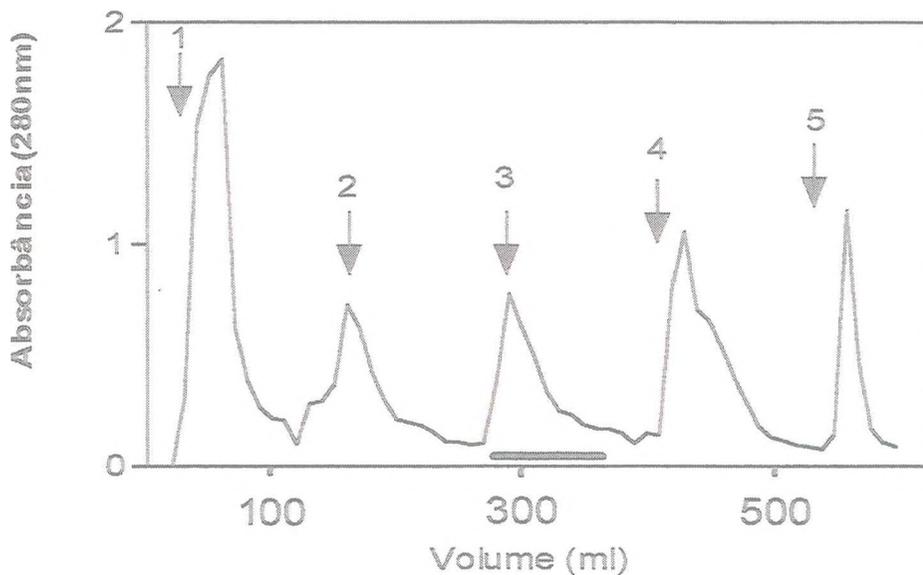


FIGURA 4.1.1. Cromatografia de troca-iônica DEAE-Celulose. Após o desenvolvimento da cromatografia com tampão Tris-HCl 0,05 N, pH 7,5, em concentrações crescentes de NaCl, de 50 mM (\downarrow^2), 100 mM (\downarrow^3), 200 mM (\downarrow^4) e 500 mM (\downarrow^5), obtiveram-se diversos picos de proteínas. A barra (—) significa a fração com atividade biológica, com volume de eluição aproximadamente 300 ml. O eixo das abscissas representa o volume de eluição (ml), no eixo das ordenadas absorbância (nm), as leituras feitas em espectrofotômetro num comprimento de onda de 280 nm.

4.3 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS

4.3.1 Efeitos farmacológicos, toxicidade aguda (DL_{50}) e dose efetiva convulsivante (DE_{50})

Os efeitos observados durante o período de 72 horas após administração da toxina com doses crescentes (10 a 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$; e.v.), foram exoftalmia, salivação, ereção da cauda, flacidez corporal, dentre outros como pode ser observado na tabela 4.3.1. Esses efeitos foram máximos entre 30 a 60 minutos e diminuindo nas horas seguintes, findando totalmente após 24 horas. O aumento das doses (150 a 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$; e.v.), causou convulsão tônico-clônica, apnéia e morte, num intervalo de tempo entre 1 a 5 minutos.

O percentual de mortalidade dos animais durante o procedimento experimental, foi baseado na consulta da tabela de probitos. Os dados indicaram que o uso da toxina purificada produziu morte nas doses de 150 a 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

A DL_{50} encontrada no experimento, foi na dose de 560 ± 128 $\mu\text{g}/\text{kg}$, indicando que o uso da toxina produziu convulsão e levou à morte, no período que compreendeu 1 a 50 minutos.

Utilizando-se doses variando entre 150 e 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, pôde-se assim constatar que a DE_{50} convulsivante encontra-se em torno de 230 ± 109 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

TABELA 4.3.1 – RESPOSTAS EXPERIMENTAIS DA AVALIAÇÃO FÍSICA E OBSERVAÇÃO DOS ANIMAIS NO ESTUDO DE TOXICIDADE, REALIZADOS COM A TOXINA EXTRAÍDA DA PELE DE *L. pentadactylus*.

PARÂMETROS OBSERVADOS	DOSES ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RESPOSTAS
ATIVIDADES	10 a 150	Atividade locomotora aumentada Saltando
REAÇÃO BIZARRA		Movimento de circo (atividade acrobática) Caminhada sem objetivo Valsando (cambaleando)
SENSIBILIDADE AO TOQUE		Sensibilidade aumentada
INTERAÇÃO SOCIAL CAUDA ANORMAL RESPOSTA SOMÁTICA		Comportamento exploratório aumentando Cauda rígida Lambendo pêlos Friccionando o nariz
TREMORES		Tremores na arcada dentária
EXOFALMIA		
DEFECAÇÃO SALIVAÇÃO (após convulsão)		Defecação aumentada
COMPORTAMENTO DE FUGA ESPASMOS GENERALIZADOS CLONIAS DA CABEÇA CONVULSÕES	150 a 2000	Movimentos críticos não convulsivantes Convulsões tônico-clônicas Espasmos generalizados
APNÉIA MORTE		

Estes parâmetros experimentais foram obtidos conforme a metodologia descrita no texto (Loomis & Hayes, 1996). O tempo de observação compreendeu: 0, 30, 60, 120, 180 minutos, chegando até 72 horas. Os animais ($n = 5$) usados neste teste foram camundongos machos, pesando em torno de 25 a 30 g. A via de administração usada foi e.v. (veia peniana), onde a toxina foi administrada em doses crescentes de 10-2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (DL_{50}) e 10-1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (DE_{50})

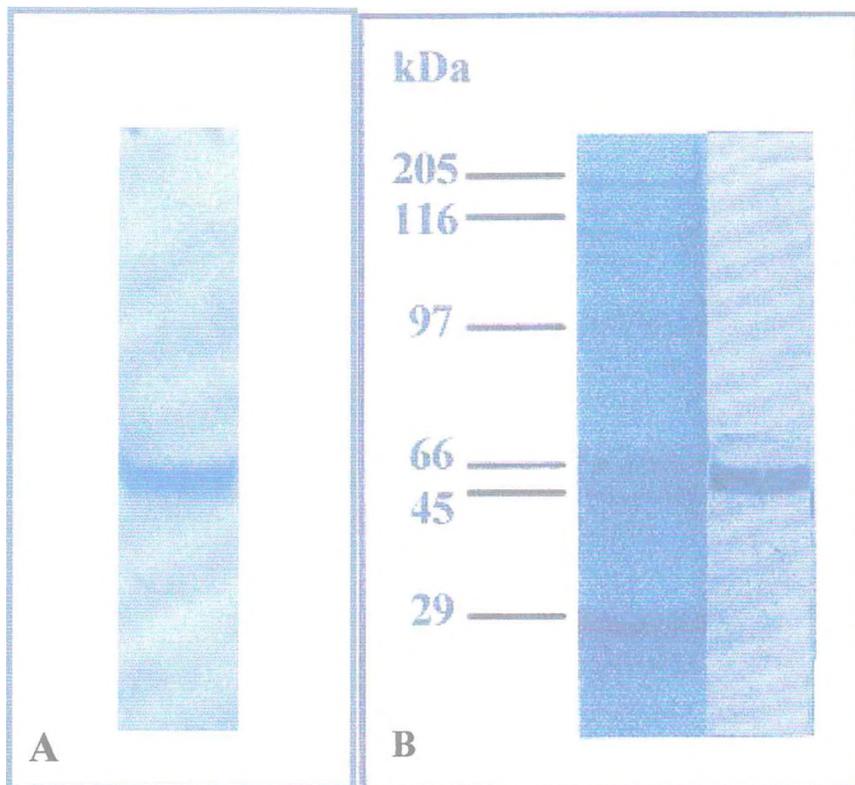


FIGURA 4.2.1 A e B. Eletroforese em placa de gel poliacrilamida em condições desnaturante e não desnaturante da toxina extraída da pele de *L. pentadactylus*. O "pool" obtido das frações eluídas da cromatografia DEAE -Celulose e submetidas a eletroforese na presença de SDS a 6 % e 2- mercaptoetanol.

(A) Eletroforese não desnaturante da toxina (50 μ l) purificada em gel de poliacrilamida a 6 %;

(B) Eletroforese desnaturante em presença de 10 % de β -mercaptoetanol e 1 % de SDS da toxina (50 μ l) purificada em gel de poliacrilamida a 6 %. As proteínas usadas como padrão para PM foram: anidrase carbônica (29 KD), ovalbumina (45 KD), albumina bovina (66 KD), fosforilase B (97 KD), β -galactose (116 KD) e miosina (205 KD). A visualização das bandas protéicas, foi através da coloração Coomassie Brilliant Blue (CCB).

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.4.1 Alterações comportamentais

As observações realizadas nos animais (ratos e camundongos) com eletrodos intracerebrais implantados, tratados com a toxina (500 µg/kg; e.v.), durante o tratamento agudo, mostraram um conjunto de comportamentos que iam desde piloereção, elevação do trem posterior, comportamento exploratório, movimentos mastigatórios, saltos aleatórios, tremores na mandíbula, dentre outros, mostrados na tabela 4.3.1.

Os animais manifestavam entre 1-5 minutos, após a aplicação da toxina, crises com manifestações motoras com clonias da cabeça, e autonômicas com piloereção e exoftalmia. Essas crises motoras se acentuavam com comportamento de fuga, taquipnéia intensa; sendo que depois estes ficavam prostrados, com espasmos generalizados, cabaleando, além de exibir convulsão tônico-clônica até a morte.

O comportamento dos ratos que receberam anticonvulsivantes, era o de sedação típica provocada por tais substâncias. As manifestações observadas com o uso de diazepam foram desde alterações da coordenação motora, até insensibilidade ao toque e sedação. Os efeitos causados pelo fenobarbital foram praticamente os mesmos que aqueles causados pelo diazepam, sendo em menor intensidade. Trinta minutos após a aplicação de diazepam na dose 10 mg/kg (i.m.), estes animais recebiam a toxina nas doses de 250 e 500 µg/kg. Com a primeira dose da toxina, estes organismos apresentaram movimentação da cabeça e do corpo, lambimento das patas, embora sem coordenação motora.

Posteriormente ficavam prostrados e adormeciam com posterior recuperação durante um período 72 horas de observação, e voltando a um estado de normalidade clínica. Quando a dose de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ era administrada no outro grupo, os sintomas observados foram: movimentos cambaleantes, prostração com extensão dos membros posteriores, espasmo, taquipnéia e morte sem convulsão.

O padrão de comportamento do grupo que recebeu fenobarbital na dose de 50 mg/kg (i.m.) e que também recebeu a toxina na dose de 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, foi movimentação do corpo, lambimento o corpo e em seguida das patas, balanceamento da cabeça, tremores na mandíbula, incoordenação dos movimentos e prostração. Os animais deste grupo recuperam também sua condição clínica anterior aos tratamentos como no grupo acima que recebeu a toxina na dose de 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Para o grupo que recebeu a toxina numa dose de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, os animais apresentavam sinais de movimentação do corpo, lambimento das patas, prostração, taquipnéia que era crescente ao longo do tempo, sendo que ao final estes animais começaram a se arrastar na tentativa de fuga, mas geralmente culminando em morte sem manifestação de crises convulsivas.

4.4.2 Alterações eletrencefalográficas

A atividade eletrencefalográfica do hipocampo foi constituída na maioria dos exames de um ritmo mais sincrônicos e mais amplo que a atividade captada ao nível do córtex, padrão este, que de uma maneira geral se repete em todo o experimento, havendo discretas variações de animal para animal.

O padrão da atividade eletrencefalográfica nos camundongos tratados com a toxina na dose de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (e.v.- veia peniana), no início do experimento, apresentava espículas com freqüência da ordem de 7 a 10 ciclos/seg no hipocampo e no córtex de 7 a 8 ciclos/seg; com uma amplitude de 80 μV no hipocampo e 30 μV no córtex. Após o tratamento com a toxina aos 3 minutos, ocorreu redução expressiva da amplitude no hipocampo para 40 μV o mesmo ocorrendo também no córtex, sendo que neste, com presença de espículas mais amplas. Houve uma lentificação do traçado com sensível redução da amplitude das ondas do eletrencefalograma e aos 10 minutos, apareceram descargas sincronizadas no hipocampo e córtex, caracterizando a expressão eletrográfica de crise convulsiva com posterior lentificação, tornando-se finalmente isoeletrico, com a morte cerebral aos 4 minutos dos animais avaliados (Figura 4.4.2.1).

Os ratos que iam receber a toxina na dose de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (e.v.), apresentaram inicialmente, uma freqüência de 8 ciclos/seg no hipocampo e de 9 a 13 ciclos/seg no córtex, com uma amplitude máxima de 100 μV . O traçado após a aplicação da toxina apresentou uma freqüência de 8 a 10 ciclos/seg no hipocampo e 7 a 11 ciclos/seg no córtex, mas com amplitude máxima de 190 μV . O registro gráfico apresentou espículas intercaladas por poliespículas nas duas regiões cerebrais avaliadas, caracterizando aumento da atividade eletrencefalográfica que geralmente culminava em configuração de registro característica para crise, 40 segundos após administração da toxina. A partir de então, o traçado mostrou-se lento, com redução significativa da amplitude de 190 para 70 μV , numa freqüência de 9 ciclos/seg no hipocampo e de 12 a 13 ciclos/seg no córtex, com

lentificação progressiva no hipocampo e córtex, bem como redução da amplitude, sendo observados algumas discretas espículas no córtex aos 3 minutos. A amplitude tornou a aumentar gradativamente c/ até haver outra vez o aparecimento de espículas e poliespículas: primeiro no hipocampo e depois no córtex, caracterizando uma segunda crise eletrencefalográfica no hipocampo aos 5 minutos, reduzindo a amplitude das espículas no córtex e hipocampo, tornando-se no final isoeletrico com morte cerebral do animal (Figura 4.4.2.2).

No registro dos ratos tratados com a toxina (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$; e.v.), a frequência dominante na atividade captada do hipocampo foi de 9 a 10 ciclos/seg e do córtex por cerca de 12 ciclos/seg. Trinta minutos após a injeção do diazepam, na dose de 10 mg/kg (i.m), foi evidenciada uma redução da amplitude dos potenciais eletrencefalográficos registrados no córtex, embora posteriormente, a amplitude retorne ao padrão inicial. Logo após a administração da toxina, ocorreu aparentemente, não foi notada modificação do padrão no traçado (Figura 4.4.2.3).

O registro dos ratos tratados com a toxina (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$; e.v.) mais diazepam na dose de 10 mg/kg (i.m.), revelou inicialmente, uma frequência no hipocampo de 10 ciclos/seg e no córtex de 12 ciclos/seg, sendo as ondas menos amplas no córtex. Trinta minutos após a administração do diazepam, a frequência no córtex e no hipocampo passou a ter mais ou menos 15 ciclos/seg. Um minuto, ocorreu após administração da toxina, depressão da atividade eletrencefalográfica, registrada no hipocampo e córtex. Imediatamente após ocorreu, o surgimento de espículas, no registro do hipocampo, seguido de uma atividade sincrônica de cerca de 6 ciclos/seg, com amplitude de 10 μV , durante cerca de 10 segundo no córtex só foi observada uma depressão

da atividade elétrica. Esta atividade elétrica, permaneceu com amplitude de 15 μV em ambas regiões do hipocampo e córtex, sendo que após 3 minutos, tanto o registro ao nível de córtex, quanto de hipocampo, tornou-se isoeletrico caracterizando a morte cerebral dos animais em estudo (Fig. 4.4.2.4).

Os animais tratados com a toxina (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$; e.v.) mais fenobarbital na dose de 50 mg/kg, apresentaram no início do registro freqüência de 13 a 17 ciclos/seg no hipocampo, e de 10 a 15 ciclos/seg no córtex; cuja amplitude máxima foi de 100 μV mostrando um sincronismo tanto no hipocampo, quanto no córtex. Seis minutos após a aplicação do fenobarbital começavam a surgir, mais no hipocampo que no córtex espículas e poliespículas, bem com ondas agudas com freqüência de 10 a 13 ciclos/seg, no hipocampo e de 11 a 12 ciclos/seg no córtex, com uma amplitude máxima de 80 μV . Trinta minutos após aplicação da toxina, foram verificadas espículas e poliespículas no registro do hipocampo e do córtex, com freqüência de 8 a 14 ciclos/seg no hipocampo e de 13 a 15 ciclos/seg no córtex (Figura 4.4.2.5).

Os ratos tratados com a toxina (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e.v.) mais fenobarbital na dose de 50 mg/kg (i.m.), revelaram a princípio, uma freqüência tanto no hipocampo como no córtex de 11 ciclos/seg, exibindo uma amplitude máxima de 50 μV . Sob a ação do fenobarbital, o hipocampo apresentou uma freqüência de 10 ciclos/seg e córtex de 11 ciclos/seg, com o aparecimento de espículas e poliespículas bastante freqüentes no hipocampo. Aos trinta minutos, a toxina foi aplicada, e após 1 minuto, o hipocampo e córtex apresentaram ambos uma freqüência de 10 a 11 ciclos/seg. Aos três minutos, a atividade elétrica no hipocampo foi de 9 ciclos/seg, enquanto no córtex foi de 12 ciclos/seg, com amplitude de

30 μ V. Foi identificada a presença de espículas com sensível redução da frequência da atividade eletrencefalográfica. Seguiu-se lentificação do traçado, com o aparecimento de espículas no perfil gráfico dos animais. O registro finalmente tornou-se isoeletrícos por volta dos cinco minutos, caracterizando a morte cerebral do animal (Figura 4.4.2.6).

Figura 4.4.2.1 Eletrencefalograma (EEG) registrado no hipocampo (HPC) e córtex de camundongos acordados e com eletrodos intracerebrais, tratados com a toxina (500 µg/kg; e.v.) (A) Registro basal (B) 10 minutos após a toxina (C) 4 minutos após a crise.

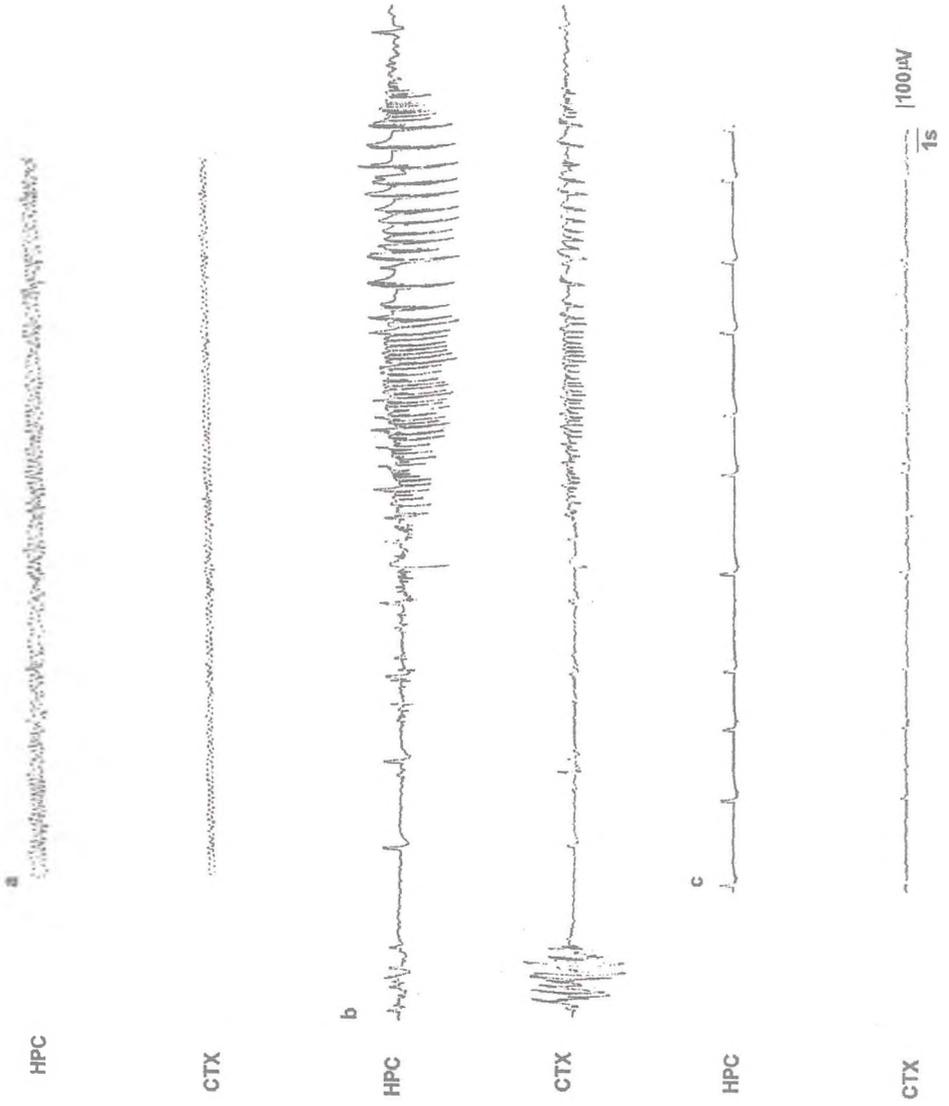


Figura 4.4.2.2 Eletrencefalograma (EEG) registrado no HPC e CTX de ratos acordados e com eletrodos intracerebrais, tratados com a toxina (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$; e.v.) (A) Registro basal (B) 40 segundos após a toxina (C) 3 minutos após a toxina, (D) 5 minutos após a crise.

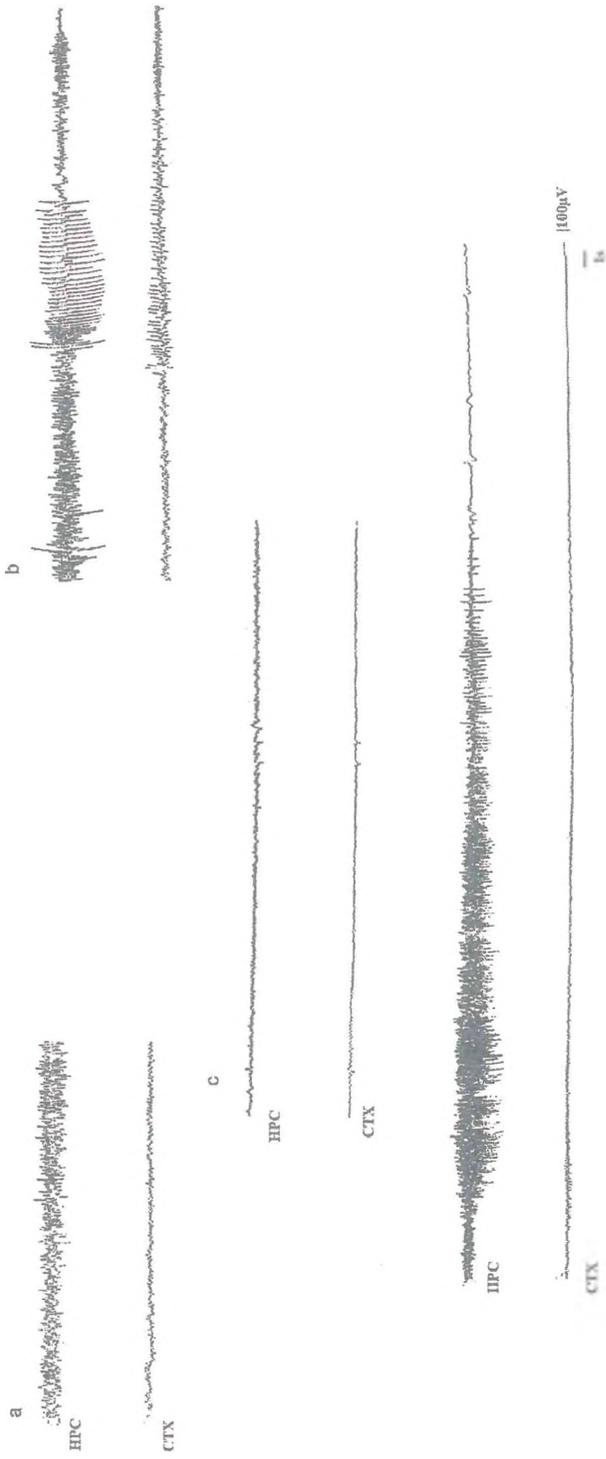


Figura 4.4.2.3 Eletrencefalograma (EEG) registrado no HPC e CTX de ratos acordados e com eletrodos intracerebrais, pré-tratados 30 minutos antes com diazepam (10 mg/kg; i.m.) e em seguida tratados com a toxina (250 µg/kg; e.v.) (A) Registro basal (B) 30 minutos após o diazepam (C) 2 minutos após a toxina, (D) 3 minutos após a toxina

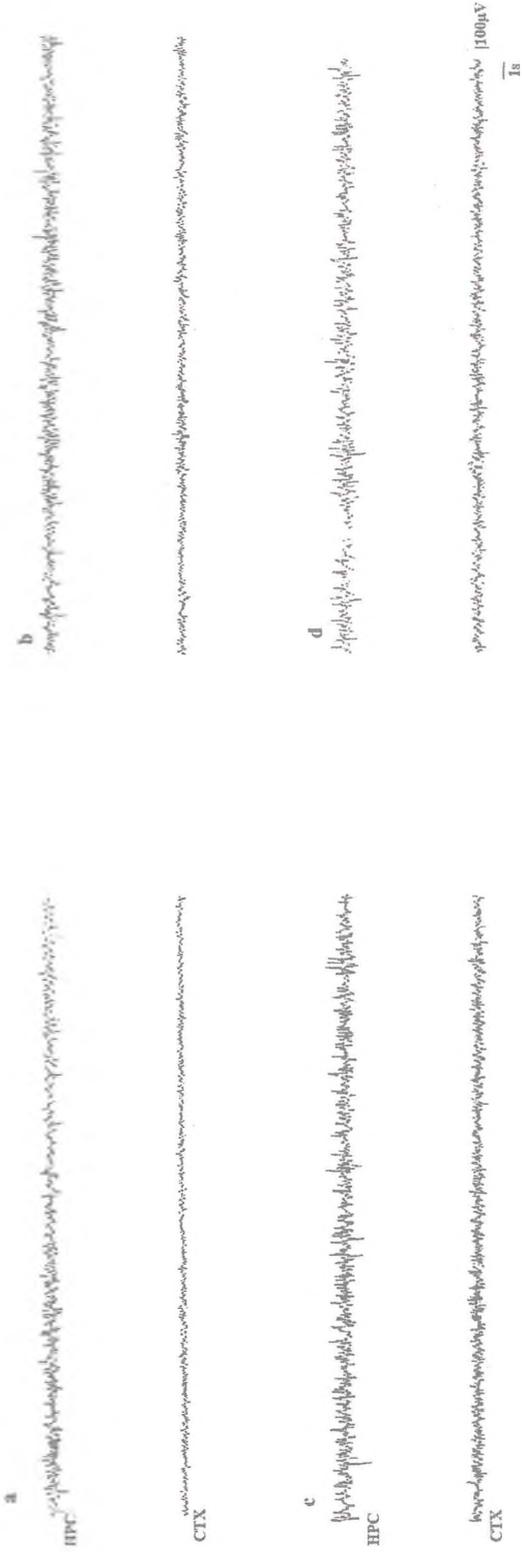


Figura 4.4.2.4 Eletrencefalograma (EEG) registrado no HPC e CTX de ratos acordados e com eletrodos intracerebrais, pré-tratados 30 minutos antes com diazepam (10 mg/kg; i.m.) e em seguida tratados com a toxina (500 µg/kg; e.v.) (A) Registro basal (B) 30 minutos após o diazepam (C) 1 minuto após a toxina, (D) 3 minutos após a toxina (E) morte cerebral.

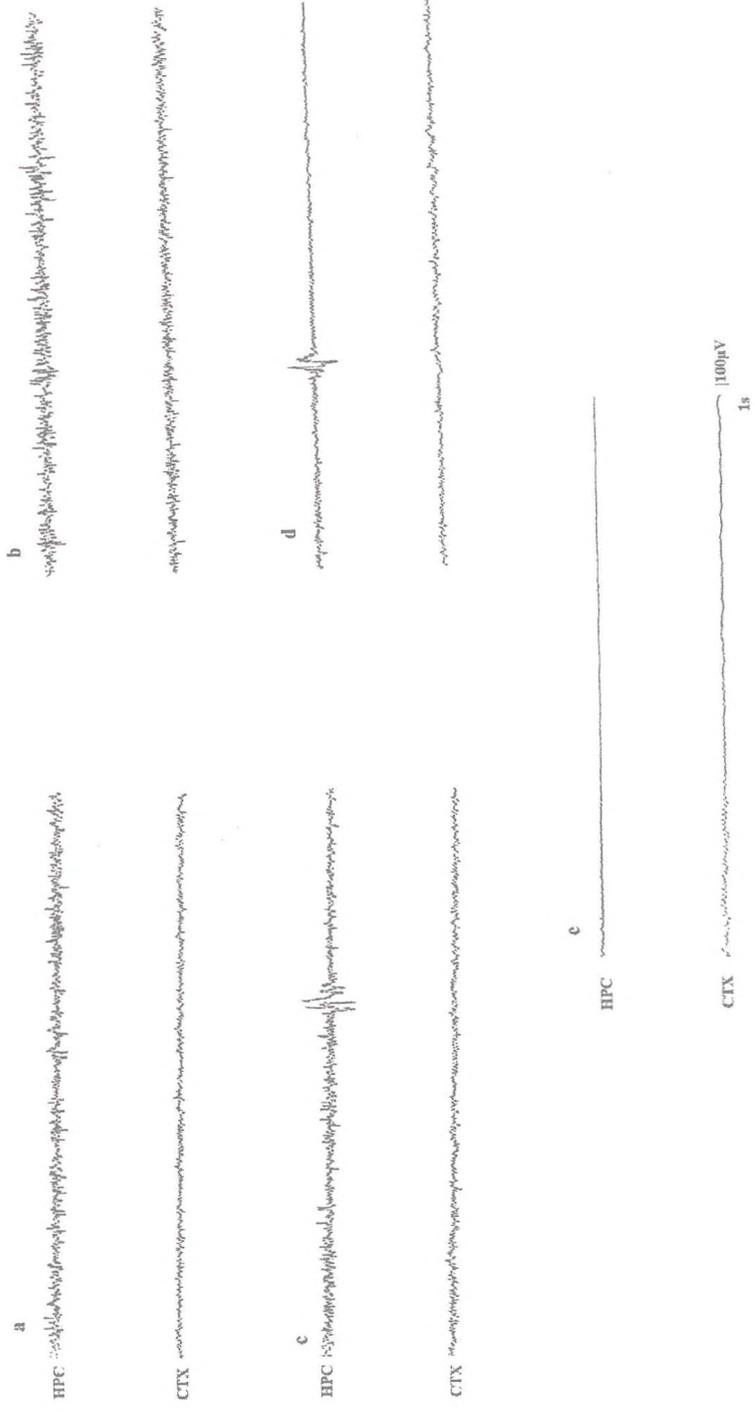


Figura 4.4.2.5 Eletrencefalograma (EEG) registrado no HPC e CTX de ratos acordados e com eletrodos intracerebrais, pré-tratados 30 minutos antes com fenobarbital (50 mg/kg; i.m.) e em seguida tratados com a toxina (250 µg/kg; e.v.) (A) Registro basal (B) 30 minutos após o fenobarbital (C) 3 minutos após a toxina, (D) retorno ao nível basal

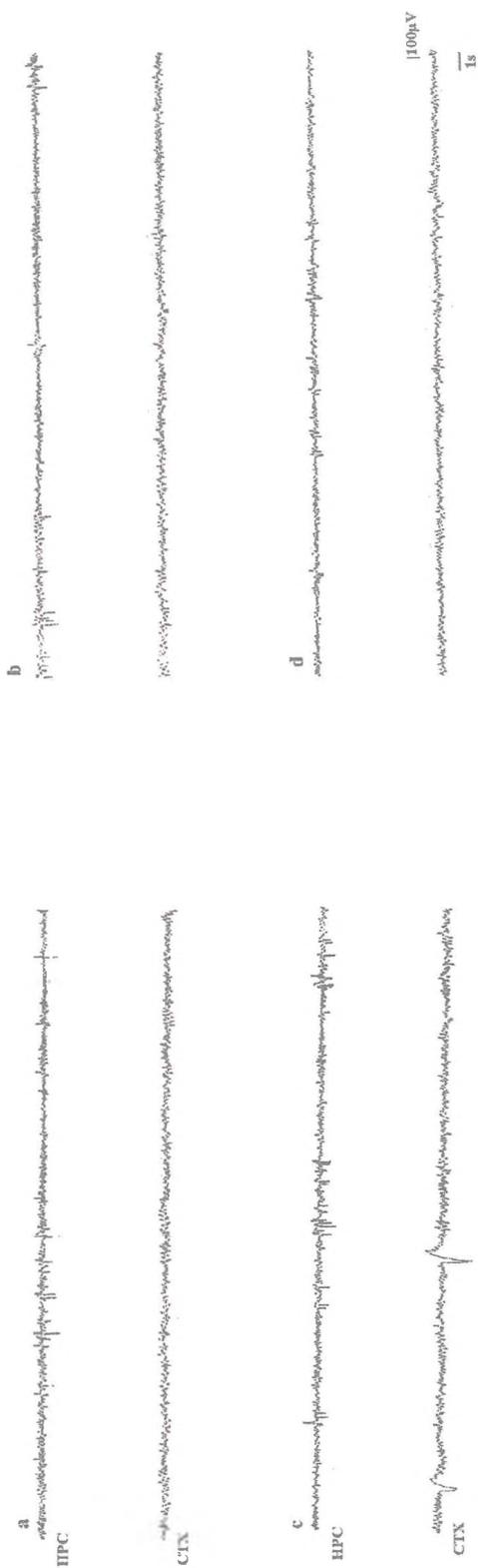
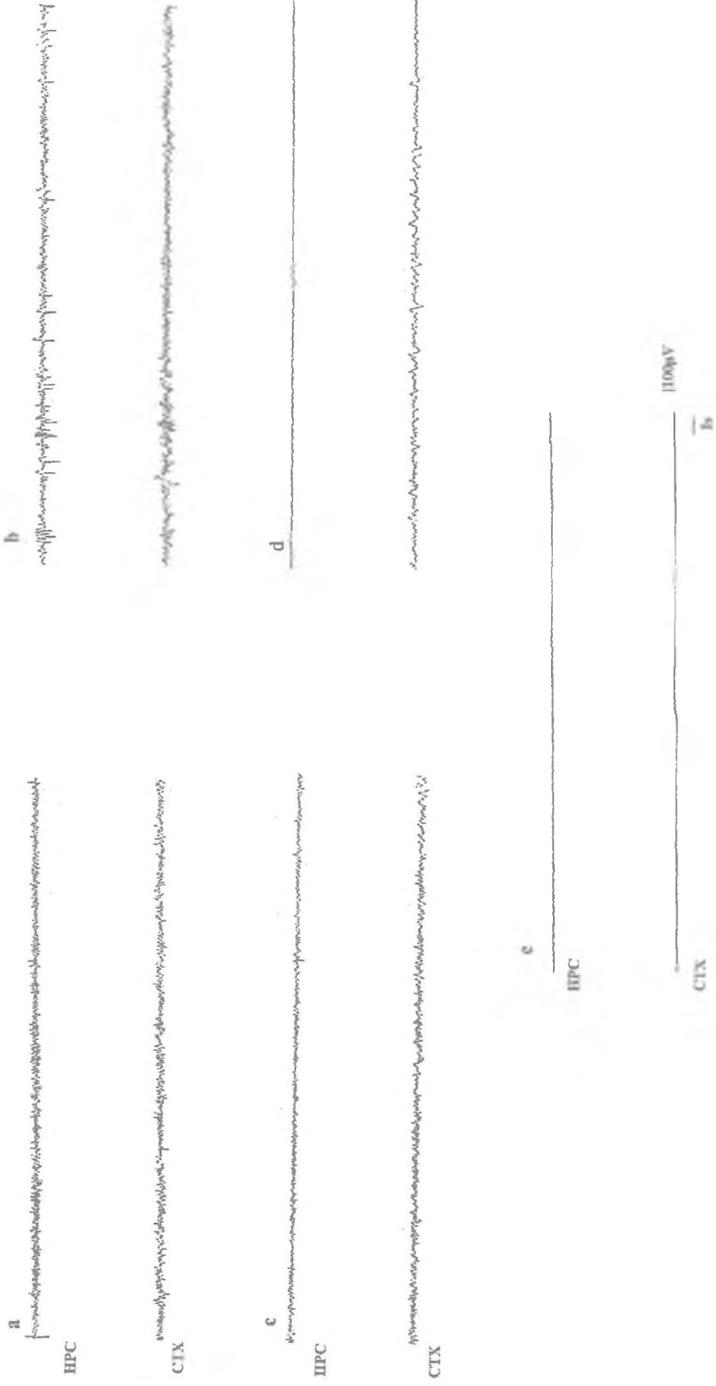


Figura 4.4.2.6 Eletrencefalograma (EEG) registrado no HPC e CTX de ratos acordados e com eletrodos intracerebrais, pré-tratados 30 minutos antes com féno-barbital (50 mg/kg; i.m.) e em seguida tratados com a toxina (500 µg/kg; e.v.) (A) Registro basal (B) 30 minutos após o fenobarbital (C) 1 minuto após a toxina, (D) 3 minutos após a toxina (E) 5 minutos após a toxina.



4.5 ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

4.5.1 Seqüenciamentos Internos I e II e o N-terminal obtidos a partir da amostra de toxinas

Após a análise realizada na fração 100 mM, foi evidenciada através do método Matsudaira (1987), apresentou duas seqüências internas e um N-terminal, como mostrado abaixo. Para seqüência interna:

I - 533, pico 72.576 min, da fração 20-73:

LEU_LYS_PRO_GLY_ILE_ALA_THR_ASP_GLU_LEU_HIS

II - 542, pico 65.836 min, da fração 20-66:

GLU (GLY)_HIS_PRO_GLU_ASP_ALA_LEU_HIS_TYR (VAL)_TYR,_
ASP.

O seqüenciamento N- terminal, encontrado foi :

ASP_ALA_GLU_HIS_HIS_PRO_ARG_GLN_ILE_GLY_GLU_ILE_
LEU_VAL_LEU_ILE_GLY_GLU_ARG_TYR.

4.5.2 Análise simplificada das principais propriedades dos aminoácidos associados às seqüências internas I, seqüência II, N-terminal

As características estruturais elétricas e a disposição de cadeia de cada aminoácido da seqüência interna I, seqüência interna II e N-terminal, bem como a hidrofobicidade correspondente pode ser verificada respectivamente nas tabelas 4.5.2.1, 4.5.2.2 e 4.5.2.3.

TABELA 4.5.2.1 – ANÁLISE DA HIDROFOBICIDADE DOS AMINOÁCIDOS PRESENTES NA SEQUÊNCIA INTERNA I.

SEQUÊNCIA INTERNA I	CARACTERÍSTICA ELÉTRICA E DE DISPOSIÇÃO DA CADEIA MOLECULAR	HIDROFOBICIDADE (KJ/mol)
LEU	Alifático não polar	2, 2
LYS	Carga geral positiva	-4, 6
PRO	Alifático não polar	-0, 29
GLY	Alifático não polar	0, 67
ILE	Alifático não polar	3, 1
ALA	Alifático não polar	1, 0
THR	Não carregado polar	-0, 75
ASP	Carga geral negativa	-3, 0
GLU	Carga geral negativa	-2, 6
LEU	Alifático não polar	2, 2
HIS	Carga geral positiva	-1, 7
Somatório		-5, 82

Obs.: A hidrofobicidade foi avaliada através da determinação da energia livre de transferência de um dado resíduo, de um solvente hidrofóbico para água, segundo tabela de Eisenberg et al., 1992. Valores negativos- hidrofília; valores positivos-hidrofobicidade, segundo Lehminger et al., 1995. A razão de hidrofobicidade entre o somatório e os índices de hidrofobicidade de sinal positivo e aqueles de sinal negativo foi de 0, 55 (RZ=0,55).

TABELA 4.5.2.2 – ANÁLISE DA HIDROFOBICIDADE DOS AMINOÁCIDOS PRESENTES NA SEQUÊNCIA INTERNA II.

SEQUÊNCIA INTERNA II	CARACTERÍSTICA ELÉTRICA E DE DISPOSIÇÃO DA CADEIA MOLECULAR	HIDROFOBICIDADE (KJ/mol)
GLU (GLY)	Carga geral negativa (Alifático não polar)	-2, 6 (0, 67)
HIS	Carga geral positiva	-1, 7
PRO	Alifático não polar	-0, 29
GLU	Carga geral negativa	-2, 8
ASP	Carga geral negativa	-3, 0
ALA	Alifático não polar	1, 0
LEU	Alifático não polar	-1, 7
HIS	Carga geral positiva	-1,7
TYR (VAL)	Aromático (Alifático não polar)	0, 08 (2, 3)
TYR	Aromático	0, 08
–	–	–
ASP	Carga geral negativa	-3, 0
Somatório		-11, 93

Obs.: A hidrofobicidade foi avaliada através da determinação da energia livre de transferência de um dado resíduo, de um solvente hidrofóbico para água, segundo tabela de Eisenberg et al., 1992. Valores negativos- hidrofília; valores positivos-hidrofobicidade, segundo Lehninger et al., 1995. A razão de hidrofobicidade entre o somatório e os índices de hidrofobicidade de sinal positivo e aqueles de sinal negativo foi de 0, 22 (RZ=0,22).

TABELA 4.5.2.3 – ANÁLISE DA HIDROFOBICIDADE DOS AMINOÁCIDOS PRESENTES NA SEQÜÊNCIA N-TERMINAL.

SEQÜÊNCIA N-terminal	CARACTERÍSTICA ELÉTRICA E DE DISPOSIÇÃO DA CADEIA MOLECULAR	HIDROFOBICIDADE (KJ/mol)
ASP	Carga geral negativa	-3, 0
ALA	Alifático não polar	1, 0
GLU	Carga geral negativa	-2, 6
HIS	Carga geral positiva	-1, 7
HIS	Carga geral positiva	-1, 7
PRO	Alifático não polar	-0, 29
ARG	Carga geral positiva	-7, 5
GLN	Polar não carregado	-2, 9
ILE	Alifático não polar	3, 1
GLY	Alifático não polar	0, 67
GLU	Carga geral negativa	-2, 6
ILE	Alifático não polar	3, 1
LEU	Alifático não polar	2, 2
VAL	Alifático não polar	2, 3
LEU	Alifático não polar	2, 2
ILE	Alifático não polar	3, 1
GLY	Alifático não polar	0, 67
GLU	Carga geral negativa	-2, 6
ARG	Carga geral positiva	-7,5
TYR	Aromático	0,08
Somatório		-13, 97

Obs.: A hidrofobicidade foi avaliada através da determinação da energia livre de transferência de um dado resíduo, de um solvente hidrofóbico para água, segundo tabela de Eisenberg et al., 1992. Valores negativos- hidrofilia; valores positivos-hidrofobicidade, segundo Lehninger et al., 1995. A razão de hidrofobicidade entre o somatório e os índices de hidrofobicidade de sinal positivo e aqueles de sinal negativo foi de 0, 56 (RZ=0,56).

5 DISCUSSÃO

Extensos estudos realizados sobre a secreção da pele dos anfíbios revelaram dentre outros aspectos, que muitos componentes do seu conteúdo apresentavam atividades tóxica, hoje bastante investigadas, tanto do ponto de vista estritamente químico, como farmacológico, o que gerou uma das áreas que vem despertando maior interesse pelos investigadores na atualidade.

Apesar do grande esforço desprendido pelos pesquisadores nesta área de estudo, muito há o que se estudar sobre estes animais que podem ser encontrados em muitos lugares do mundo, inclusive no Brasil.

A região nordeste do Brasil, pode não ser a que apresenta maior diversidade de anfíbios mas, certamente, contém alguns gêneros de

anuros que poderão, em breve, vir a ser um grande motivo de investigação científica para fins biotecnológico e econômico.

É possível que o gênero *Leptodactylus*, em especial a espécie *L. pentadactylus* objeto do presente trabalho, possa integrar este grupo tão seletivo de animais.

Em princípio, o processo de extração de substâncias da pele das rãs por nós estudados, não ofereceu grandes dificuldades; embora, objetivando um maior rendimento do processo extrativo e um menor desconforto dos espécimes estudados, foram utilizados com melhor opção, o processo de homogeneização da pele desses animais, ao invés do emprego de contínuas doses de adrenalina como fator estimulante.

Para se ter uma idéia do significado desta diferença, temos que o rendimento bruto (RB) encontrado a partir de 779,7 g da pele de 46 rãs da *L. pentadactylus*, foi de 2,59 mg de proteína purificada/rã, enquanto que o processo de indução pelo uso de adrenalina, geralmente dava um RB da ordem de 0,17 g de proteína purificada/rã. Dados podem também ser encontrados na literatura especializada (Märki & Witkop, 1963).

Uma vez obtido o material bruto, restava porém a escolha do processo de purificação que permitisse a obtenção das substâncias a serem testadas nos biensaíes, na melhor condição de purificação possível. Por esta razão, optou-se pela utilização da técnica de cromatografia por troca-iônica em coluna de DEAE-Celulose, tendo em vista que os principais trabalhos de purificação de toxinas, na atualidade, empregam com maior freqüência este tipo de técnica.

É interessante mencionar que por esse recurso de purificação assinalado, podem ser identificadas tanto proteínas de baixo PM, como proteínas de PM elevado.

Das várias frações obtidas pelo processo cromatográfico, a fração correspondente à concentração molar de 100 mM de NaCl, foi a que apresentou melhor atividade biológica com predominância de uma ação do tipo convulsivante, conservando suas características após o processo de dessalificação.

A análise dos resultados a partir do emprego da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, permitiu a identificação de uma banda majoritária, com um PM estimado de 65 KD.

É interessante observar que Lábler et al. (1968), trabalhando com a espécie *Pelobates fuscus*, encontrou uma toxina também de natureza protéica com PM de 35 KD, enquanto Jaussi & Kunk (1978) trabalhando com a espécie *Tricurus cristatus*, encontraram dois tipos de proteínas com 40 e 45 KD respectivamente, exibindo potente efeito tóxico. É curioso o fato de que apesar de se tratar de espécies de anfíbios distintos, os PM encontrados sejam parecidos; embora Brandon & Huheey em 1981, trabalhando com as espécies *Pseudotriton ruber* e *P. montanus*, identificaram uma toxina comum a ambas as espécies estudadas, com PM de 225 KD, alegando tratar-se da farmacologicamente conhecida TTX. Posteriormente foi verificado que esta toxina exibiu uma atividade bioquímica próxima da TTX, embora com peculiaridades características, sendo mais tarde denominada de PTTX.

As toxinas protéicas oriundas de anfíbios, parecem ser caracterizadas por proteínas de PM elevado. Embora, na realidade, apenas três toxinas protéicas tenham sido isoladas de anfíbios até o presente trabalho. Não há justificativa plausível para o fato de que, proteínas de valor científico tão importantes tenham ficado no esquecimento por um interstício de quase 20 anos.

Seja como for, tendo em vista o que foi dito acima sobre as toxinas de anfíbios até então isoladas, pode-se verificar que a toxina estudada neste trabalho, apresentava também um alto PM; o que reforça, mais uma vez, a idéia de que esta seja uma característica peculiar às toxinas protéicas de anfíbios.

A realização de testes enzimáticos, bem como, de tratamento térmico assinalaram que as ações evidenciadas pela aplicação da toxina nos bioensaios, podiam ser suprimidas; confirmando a natureza protéica do princípio ativo, associado aos efeitos biológicos observados. Estas características também foram observadas por Jaussi & Kunz (1978), embora os dados presentes no trabalho concordem com os dados de Lábler et al. (1968) e Brandon & Huheey (1981). Isto somente mediante a utilização de tratamento térmico.

Em linhas gerais, a fração de substância escolhida não perdia a atividade após o processo de liofilização, o que ajudou muito no cumprimento do protocolo experimental idealizado para esse trabalho.

Após a determinação da DL_{50} , verificou-se que a via de administração endovenosa, foi muito mais efetiva comparando-se com as vias subcutânea (s. c.) e via oral (v. o). É possível que isto tenha haver com a natureza bioquímica da toxina; pois, a administração por via oral por exemplo, subentende a ação de enzimas proteolíticas, bem como variações de potencial de íons hidrogênio (pH), que podem inativar as toxinas. Por outro lado, a administração s.c. poderia por sua vez despertar a ação de sistemas digestores, teciduais, podendo ter uma ação de inativação da toxina também.

É interessante assinalar que Märki & Witkop (1963) trabalhando com a rã kokoi, observaram que as toxinas obtidas apresentavam efeito

tanto na via s.c., como e.v., ainda que nenhum efeito tenha sido observado quando as toxinas eram administradas em camundongos por v.o. Lábler et al. (1968), por sua vez, verificaram que a administração das toxinas dos anfíbios *Pelobates fuscus* por v. o, não provocavam efeito de até mesmo uma massa de 300 µg de toxina administrada, se bem que a administração e.v. das mesmas, provocava espasmos e morte entre 10 e 30 minutos; já administração s.c. necessitava de uma dose de 100 a 200 vezes maior do que a dose efetiva. É interessante observar que estes autores não realizaram a dosagem de proteínas, sendo a potência das toxinas utilizadas calculadas na razão peso:peso.

Já Jaussi & Kunz (1978), trabalhando com a espécie *Triturus cristatus*, verificaram que a administração s.c. das toxinas obtida, causava convulsão além de dano celular nos animais testados. Em linhas gerais, frente ao que foi exposto acima, pode-se dizer que apesar de se tratar de uma mesma variedade de animal, o efeito de suas toxinas no organismo é característico e específico da espécie, ficando isto mais explicitamente definitivo quando comparamos os valores obtidos para DL₅₀ e DE₅₀ da toxina utilizada nesse trabalho, em relação as demais toxinas, assinalando que, bem provavelmente a toxina aqui encontrada é muito mais potente, uma vez que a DL₅₀ foi da ordem de 560 ± 128 µg/kg e uma DE₅₀ de 230 ± 109 µg/kg, comparando-se por exemplo com os valores obtidos por Jaussi & Kunz (1978), que obtiveram uma DL₅₀ de 3,8 mg/kg, para toxina purificada em Sephadex G-200; e uma DL₅₀ de 2,5 mg/kg, para toxina purificada em DEAE-Sephadex, quando trabalhava com a espécie *Triturus cristatus*.

Brandon & Huheey (1981) trabalhando com as três espécies *P. montanus diastictus*, *P. montanus* e *P. ruber*, encontraram

respectivamente os valores de DL₅₀ de 3, 850 mg/kg, 2, 200 mg/kg e 235 ± 110 mg/kg.

Levando-se em consideração os dados idealizados por Loomis & Hayes (1996), pode-se considerar a toxina utilizada neste trabalho como extremamente tóxica, uma vez que a dose necessária para provocar o efeito mínimo é bem inferior ao limite máximo por eles estabelecido, que é de 1 mg ou 1000 µg/kg. Sua potência, por esta razão pode ser comparada com a potência de várias toxinas de serpentes venenosa, ou seja, *Naja naja oxiana* (560 µg/kg), *Laticauda semifasciata* (850 µg/kg), *Naja haje annulifera* (5000 µg/kg), *Naja haje annuifera* (62000 µg/kg), etc (Low, 1979).

Conforme foi dito acima, verificou-se que a toxina encontrada nesse trabalho, pode produzir efeitos biológicos característicos e bem definidos em relação às toxinas encontradas pelos outros autores, e a sua elevada potência serviu de motivação para que os experimentos fossem conduzidos segundo os objetivos pretendidos por esse trabalho.

Voltando-se agora a atenção para os ensaios biológicos realizados nesse trabalho, verificou-se que os animais que receberam a toxina em diferentes dosagens, exibiram um amplo espectro de variações comportamentais, embora na sua maioria associadas mais especificamente, com alterações ao nível de sistema nervoso central (SNC).

A análise dos registros de eletrencefalografia (EEG), permitiu a observação de alterações significativas no padrão gráfico de espículas e poliespículas associadas as regiões do hipocampo e córtex dos animais estudados, caracterizando o quadro de alterações elétricas profundas nessas regiões, culminando com o surgimento daquilo que

caracteristicamente corresponde a crises convulsivas e, surgindo posteriormente a condição isoeétrica, caracterizando a morte cerebral naqueles animais que eram tratados com a toxina endovenosamente; o que pode ser tomado como uma evidência de que esta substância promove alterações profundas ao nível de SNC.

A administração de substâncias de ação convulsivante como diazepam e fenobarbital, nos animais sobre tratamento com a toxina na dose de 250 µg/kg, não surtiu efeito verificável sobre o padrão de alterações elétricas no hipocampo e córtex destes animais tratados; o que poderia se esperar, uma vez que esses animais, sob a ação da toxina na dose acima, não exibiram ação convulsivante, como também não morreram.

Por outro lado, a administração da toxina numa dose de 500 µg/kg nos animais, promovia alterações no registro eletrencefalográfico que caracterizavam uma ação convulsivante, como já mostrado acima, mas essas alterações poderiam ser suprimidas quando eram administradas as drogas diazepam e fenobarbital nas doses de 10 mg/kg (i.m.) e 50 mg/kg (i.m.) respectivamente. Neste caso, os animais geralmente morriam sem exibir convulsão.

Tendo em vista o que foi exposto acima, pode-se suspeitar que o mecanismo de ação da toxina estudada nesse trabalho, pode envolver alterações na cinética dos canais de Cl^- presentes nas regiões do hipocampo e córtex, bem como possivelmente correlacionados com alterações nos níveis de aminoácidos inibitórios nessas regiões especialmente o GABA.

É interessante mencionar que não há registros de toxina protéica extraída da pele de anfíbios, com ação neurotóxica caracterizada

eletrencefalograficamente. Apenas Jaussi & Kunz (1978), faz referência a um tipo de veneno extraído de *Triturus cristatus*, que quando administrado por s.c. causava convulsão acompanhada de dano celular; embora não tinham confirmação desses efeitos mediante registros eletrencefalográficos.

Para outras espécies, alguns autores (Barrio, 1961, Habermann & Cheng-Raude, 1975, Prado-Franceschi & Vital Brazil, 1981, Vital Brazil, 1972) têm feito referências a ação de substâncias tóxicas extraídas especialmente de serpentes com ação convulsivante sobre animais de laboratório. Ainda nesse propósito, pode-se destacar o trabalho de Mello & Cavalheiro (1989), que trabalhando com veneno da *Crotalus durissus terrificus* verificaram que a microinjeção da toxina bruta na região do hipocampo dorsal de rato, promovia alterações significativas no padrão de registro eletrencefalográfico para as regiões do córtex occipital e hipocampo, correspondentes a alterações no padrão normal comportamental dos animais de laboratório sobre tratamento, que incluíam movimentos circulares, padrões de comportamento do tipo WDS (“wet-dog” shakes), torção corporal e episódios crônicos isolados. A análise histológica efetuada por esses autores, revelou a presença de lesões na área de inoculação do veneno, bem como áreas distantes, correlacionando-se a severidade das respostas observadas.

De maneira geral, frente ao que foi mencionado acima, pode-se dizer que a produção de toxinas com efeitos convulsivantes não estão restritas apenas a organismos reptelianos, mas que a partir desse trabalho, espera-se que as toxinas de anfíbios venham receber maior atenção por parte dos pesquisadores.

A análise seqüencial possível de aminoácidos da toxina de *L. pentadactylus*, revelou pelo menos duas regiões de sequenciamento interno e uma região de sequenciamento N-terminal. A seqüência interna I, apresentou um índice de hidrofobicidade de -5,82, caracterizando-se com isso como altamente hidrofílica. A seqüência interna II, com índice de hidrofobicidade de -11,93, pareceu ser mais hidrofílica do que a seqüência interna I; embora, em relação a seqüência N-terminal, cujo índice de hidrofobicidade foi de -13,97, a sua condição de hidrofobicidade foi ligeiramente inferior. Em outras palavras, a região de menor hidrofobicidade parece ser a correspondente a seqüência interna I. Em contrapartida, olhando-se atentamente os índices de hidrofobicidade obtidos para ambas as seqüências, pode-se dizer que a seqüência interna II é a mais hidrofílica (RZ= 0, 22).

Observando-se a disposição dos aminoácidos nas três seqüências obtidas, pode-se verificar que nessas estruturas podem existir regiões fortemente carregadas do ponto de vista elétrico, se essas estruturas estiverem alojadas num ambiente biológico de pH aproximadamente igual a 7,0.

Observando-se a seqüência interna I, pode-se verificar que o grupamento ASP_GLU, confere nesta posição uma região facilmente hidrolizada por ácidos, podendo esta relacionada a um possível sítio catalítico doador ou receptor de próton.

Na seqüência interna II por sua vez, pode ser verificado um grupo semelhante interligado entre dois aminoácidos do tipo HIS, que podem acentuar o efeito de troca de próton com o meio; embora, nessa estrutura também haja um sequenciamento do tipo TYR_TYR, que também podem apresentar grande capacidade de troca de próton com o meio

biológico. É possível que estes grupamentos tenham um importante papel na definição dos efeitos que a toxina poderá exibir quando inoculada no tecido biológico.

Finalmente na seqüência N-terminal, podem ser identificados grupamentos HIS_HIS, como também uma trinca ASP_ALA_GLU, sendo esta região potencialmente capaz de trocar prótons com o meio biológico. É possível também que esta região apresente uma forte participação no delineamento das características de ação desta toxina. Ainda nesta seqüência de aminoácidos, pode ser identificada a presença de uma região não polar, com uma extensão de seis aminoácidos (ILE_LEU_VAL_LEU_ILE_GLY), podendo esta associar-se a porções hidrofóbicas de sítios receptores quando da interação da droga com os seus sítios alvos.

A comparação do sequenciamento de aminoácidos obtido para toxina desse trabalho, com o sequenciamento de aminoácidos extrapolados a partir da análise do sequenciamento de bases nucleotídicas de moléculas de DNAr do cromossomo das espécies *L. labyrinthicus* e *L. pentadactylus* conforme os dados do trabalho de Sá (1997); permitiu a verificação de que esta toxina, bem provavelmente não poderá ser transcrita a partir das informações gênicas a contidas neste cromossomo especificamente.

Em compensação, a comparação das seqüências de aminoácidos obtidas para toxina estudada nesse trabalho, com trechos de seqüências de aminoácidos de toxinas de várias espécies, segundo os trabalhos de Ivanov & Ivanov (1978) e Ivanov (1980), revelou a ocorrência de discretas homologias entre algumas estruturas de toxinas já estudadas perante a toxina de *L. pentadactylus*. Por exemplo, os aminoácidos

compreendidos entre as posições 17 e 22 da toxina Bombinina da espécie *Bombina* spp (LEU_LYS_GLY_LEU...ALA...LEU) (Csordas & Michl, 1970), parece ser semelhante a seqüência (LEU_LYS_PRO_GLY_ILE_ALA), da seqüência interna I da toxina *L. pentadactylus*. Já os aminoácidos alojados entre as posições 111 e 121 da fosfolipase A₂ de *Agkistrodon halys blomhoffi* (Samejima et al., 1975), pareceu ser ligeiramente semelhante a seqüência interna II. É curioso notar que a seqüência (ASP...TYR_VAL_TYR) também podem ser verificadas nos trechos da neurotoxina IA e I'A da espécie *Androctonus australis* Hector (Rochat et al., 1970).

A fosfolipase A₂ de *Apis mellifera* (HIS...GLU...ALA...TYR...LEU_VAL...GLY_GLU_ARG...GLY...ILE..VAL_GLU) (Shipolini et al., 1974), parece exibir em alguns trechos da sua estrutura, vários grupamentos semelhantes àqueles observado na seqüência N-terminal da toxina estudada nesse trabalho.

Diante do que foi visto acima, pode-se dizer que diferentes espécies de animais podem, até certo ponto, construir as suas estruturas moleculares; em especial as toxinas, usando uma mesma estratégia bioquímica, associada a uma seqüência informacional expressa em termos de sequenciamento de aminoácidos; principalmente se esses organismos estiverem orientados de forma ordenada na escala filogenética e de evolução das espécies.

As constantes de recombinações desse material biológico, bem como eventuais mutações localizadas, podem ter contribuído para modificar pontos específicos de uma seqüência de aminoácidos, mas, determinados aspectos da estrutura com respaldo funcional podem ter sido preservados.

Sendo assim é possível que os anfíbios modernos ainda conservem uma base estrutural molecular associada a suas toxinas de veneno, cujos vestígios possam ser encontrados em outras espécies, considerando-se a posição filogenética dos anfíbios em relação as demais espécies de organismos que hoje habitam a superfície terrestre.

Frente a tudo que foi dito acima, pode-se dizer então que a toxina de *L. pentadactylus*, parece ser uma potente neurotoxina cuja função biológica está por ser definida, embora sua ação pareça está associada a alterações de atividade nos canais de Cl⁻, possivelmente ligados a mudanças de aminoácidos inibitórios de ação central.

Diante das considerações tecidas anteriormente, bem como o fato de que bem provavelmente esta foi a primeira neurotoxina oriunda de anfíbios, estudada numa dimensão molecular, pensou-se em denominá-la de α -Leptoxina.

Espera-se portanto que a α -Leptoxina seja motivo de futuros trabalhos que venham a contribuir para elucidar o seu verdadeiro mecanismo de ação, e que venha a servir de parâmetro em modelos experimentais para avaliação da atividade neurológica em animais.

6 CONCLUSÕES

Os resultados comprovam que uma toxina protéica (α -Leptoxina) foi purificada da pele de *Leptodactylus pentadactylus*, apresentando atividade biológica convulsivante. Em eletroforese a 6% sem SDS, foi identificada uma única banda de proteína com atividade convulsivante. Na eletroforese a 6% com SDS, foi estimada a presença de uma banda majoritária com PM estimado de 65 KD. O RB médio do veneno foi de 2,59 mg de toxina purificada/g de veneno bruto liofilizado, correspondendo a 0,26 % (p:p).

A α -Leptoxina apresenta elevada toxicidade, cujos valores de DL₅₀ e DE₅₀ foram de $560 \pm 128 \mu\text{g/kg}$ e $230 \pm 109 \mu\text{g/kg}$ respectivamente. A toxina age ao nível de SNC, levando os animais à morte por convulsão; mesmo diante de drogas anticonvulsivantes clássicas como o diazepam e fenobarbital, sendo neste caso provocando morte dos animais sem registro de convulsão.

A análise dos aminoácidos da α -Leptoxina, mostrou que esta é constituída de duas seqüências internas designadas de I e II e de N-terminal, cuja região de menor hidrofobicidade foi a seqüência interna II. Estes dados sugerem que trata-se da primeira neurotoxina protéica purificada da pele de anfíbios. E, com a realização de estudos futuros possa se constituir numa poderosa ferramenta biológica para estudos do sistema nervoso.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. E. Neurotoxins. **Trends in Neurosci. Suppl**, p. 1-37, 1996.

AKTORIES, K., WEGNER, A. ADP-ribosylation of action by *clostridial toxins*. **J. Cell Biol.**, v. 109. p. 1385-1387, 1989.

ALBUQUERQUE, E. X., DALY, J. W., MYERS, C. W. Batrachotoxin: chemistry and pharmacological. **Science**, v. 172, p. 995-1002, 1971.

ANASTASI, A., BERTACINI, G., CEI, J. M., DE CARO, G., ERSPARMER, V., IMPICCIATORE, M., ROSEGHINI, M. Presence of caerulein in extracts of skin of *Leptodactylus pentadactylus labyrinthicus* and *Xenopus laevis*. **Br. J. Pharmacol.**, v.38, p. 221-228, 1970.

- ARNOLD, S. J. A quantitative approach to antipredator performance: salamander defense against snake attack. **Copeira**, v. 2, p. 247-253, 1982.
- ASAKAWA, M., NISHIMURA, F., MIYAZAWA, K., NOGUCHI, T. Occurrence of paralytic shellfish poison in the starfish *Asterias amurensis* in Kure Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. **Toxicon**, v. 35, p. 1081-1087, 1997.
- BADIO, B., DALY, J.W. Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist. **J. Pharmacol. And Exp. Ther**, v. 45, p. 563-569, 1994.
- BARBEIRO, C., DELFINO, G., MASTROMEI, G. A low molecular weight protein with antimicrobial activity in the cutaneous "venom" of the yellow – bellied toad (*Bombina variegata pachypus*). **Toxicon**, v. 25, n. 8, p. 899-909, 1987.
- BARCHI, R. L. Biochemical studies of the excitable membrane sodium channel. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 263, p. 69-101, 1982.
- BARRIO, A. Gryroxin, a nerv neurotoxin of *Crotalus durissus terrifus* venom. **Acta Physid Latinoam.**, V. 22, P. 224, 1961.

- BERGER, H, KREIL, G. The constituents of storage granules in the dermal glands of *Xenopus laevis*. Structure of a basic polypeptide deduced from cloned cDNA. **FEBS Lett.**, v. 249, p. 293-296, 1989.
- BEVINS, C. L., ZASLOFF, M. Peptides from frog skin. **Annu Rev. Biochem.**, v. 59, p. 395-414, 1990.
- BLAUSTEIN, A. R., HOFFMAN, P. D., HOKIT, D. G., KIESECKER, J. M., WALLS, S. C., HAYS, J. B. UV repair and resistance to solar UV – B in amphibian eggs: a link to population declines?. **Proc. Natl. Acad. Sc. USA**, v. 91, n. 5, p. 1791-1795, 1994.
- BLAUSTEIN, A. R., WAKE, D. B. The puzzle of declining amphibian populations. **Sci. Am.**, v. 272, n. 4, p.56-61, 1995.
- BOLS, N.C., ROBERSON, M.M., HAYWOOD-REID, P.L., CERRA, R.F, BARONDES, S.H. Secretion of a cytoplasmic lectin from *Xenopus laevis* skin. **J.Cell.Biol.**, v. 102, p. 492-499, 1986.
- BRANDON, R. A, HUHEEY, J. E. Toxicity in the *Plethodontid* Salamanders *Pseudotriton ruber* and *Pseudotriton montanus* (Amphibia, Caudata). **Toxicon**, v. 19, p. 25-31, 1981.

BURNETT, J. W., CALTON, G. J. *Venomous pelagic Coelenterates: chemistry, toxicology, immunology and treatment of their stings.* **Toxicon** v. 25, n. 6, p. 581-602, 1987.

CATTERALL, C. Y. Neurotoxins that act on voltage – sensitive sodium channels. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 20. p. 15-43, 1980.

CATTERALL, W. A . Structure and function of voltage-sensitive ion channels. **Science.** v . 242, p. 50-61, 1988.

CATTERALL, W. A., HARTSHORNE, R. P., BENESKI, D. A. Molecular properties of neurotoxin receptor sites associated with sodium channels from mammalian brain. **Toxicon**, v. 20, n. 1, p. 27-40, 1982.

CHEN, K. K., KOVARÍKOVA, A . Pharmacology and toxicology of toad venom. **J. Pharm. Sci.**, v. 56, n. 12, p. 1535-1541, 1967.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biol. Rev.**, v. 72. p. 365-379, 1997.

COOLEY, R. K., VANDERWOLF, C. H. **Stereotaxic surgery in the rat: a photographic series.** Wood Dale: Stoelting Company, 1990.

CSORDÁS, A, MICHL, H. Primary structure of two olipeptides of the toxin of *Bombina variegata* L. **Toxicon**, v. 7, p. 103-108, 1969.

CSORDÁS, A, MICHL, H. Isolierung an sttrukturaufklarung eines hämolytisch wirkenden polypeptides aus dem abwelvisekret europarscher Unken. **Mh. Chemie**, v. 101, p. 182, 1970.

DALY, J. W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 92, p. 9-13, 1995.

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 25, n. 10, p. 1023-1095, 1987.

DALY, J. W., SECUNDA, S. I., GARRAFFO, H. M., SPANDE, .T.F., WISNIESKI, A ., COVER Jr., J. F. An uptake system for dietary alkaloids in poisin frogs (*Dendrobatidae*). **Toxicon**, v. 32, n. 6, p. 657-663, 1994.

DALY, J. W., SECUNDA, S. I., GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., WISNIESKI, A., NISHIHITA, C., COVER Jr., J. F. Variability in alkaloid profiles in neotropical poison frogs (*Dendrobatidae*): genetic versus environmental determinants. **Toxicon**, v. 30, n. 8, p. 887-898, 1992.

DANNI, T. M. S., DARDENNE, M., LOURENÇO, W. R. Morphologie et histologie de la glande à venin de *Tityus trivittatus charreyroni* Vellard, 1932 (*Scorpiones, Buthidae*). **Rev. Bras. Biol.**, v. 36, n. 2, p. 297-303, 1976.

DE MORAIS CARVALHO, K, JOUDIQUO, C., BOUSSETA, H., LESENEY, A.-M, COHEN, P. A peptide-hormone-inactivating endopeptidase in *Xenopus laevis* skin secretion. **Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 89, p. 84-88, 1992.

DOCKRAY, G. J., HOPKINS, C. R. Caerulein secretion by dermal glands in *Xenopus laevis*. **J. Cell Biol.**, v. 64, p. 724-733, 1975.

DUCANCEL, F., MATRE, V., DUPONT, C., LAJEUNESSE, E., WOLLBERG, Z., BDOLAH, A., KOCHVAL, E., BOULAIN, J.-C., MÉNEZ, A. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding

precursors of sarafotoxins: evidence for an unusual “rosary-type” organization. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 5, p. 3052-3055, 1993.

ELAM, K. S., FUHRMAN, F. A. Neurotoxins from three species of California goby: *Clevelandia ios*, *Acanthogobius flavimanus* and *Gillichthys mirabilis*. **Toxicon**, v. 55, p. 45-49, 1977.

ERSPAMER, V. Biogenic amines and active polypeptides of amphibian skin. **Ann. Rev. Pharmacol.**, v. 2, p. 327-350, 1971.

ERSPAMER, V., VITALI, T., ROSEGHINI, M., CEI, J. M. 5 - methoxy and 5 – hidrodroxy – indoles in the skin of *Bufo alvarius*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 16, p. 1149-1164, 1967.

ERSPARMER, V. Pharmacology of indole alkylamines. **Pharmac. Rev.**, v. 6, p. 425-435, 1954.

ERSPARMER, V., VITALI, T., ROSEGHINIM, M., CEI, J. M. Ocurrence of new imidazolealkylamines (spinaceamine and 6 – methylspinaceamine) in skin extracts of *Leptodactylus pentadactylus labyrinthicus*. **Experientia**, v. 19, n. 7, p. 346-347, 1963.

FLIER, J., EDWARDS, M.W., DALY, J. W., MYERS, C. W.

Widespread occurrence in frogs and toads of skin compounds interacting with the ouabain site of Na^+ , K^+ -ATPase. **Science**, v. 208, p. 503-512, 1980.

FONTAINE, Y-A. Les hormones et l' evolution. **Recherche**, v. 15, n.

153, p. 310-320, 1984.

FOREY, P. L'origine des tétrapodes. **Recherche**, v. 15, n. 154, p. 476-

487, 1984.

FUHRMAN, F. A. Tetrodotoxin. **Sci. Am**, v. 217, n. 2, p. 60-71, 1967.

GIBSON, B.W., POULTER, L., WILLIAMS, D.H, MAGGIO, J.E.

Novel peptide fragments originating from PGL^a and the caerulein and xenopsin precursors from **Xenopus laevis**. **J. biol. Chem.**, v. 5341-5349, 1986.

GIOVANNINI, M., G., POULTER, L., GIBSON, B.W., WILLIAMS,

D.H. Biosynthesis and degradation of peptides derived from **Xenopus laevis** prohormones. **Biol. Chem. J.**, v. 243, p. 113-120, 1987.

GOTTLIEB, O R. Evolução química vegetal. **Ciência e Cultura**, v. 39, n. 4, p. 357-360, 1987.

HABERMANN, E., CHENG-RAUDE, D. Central neurotoxicity of apanim, crotamin, phospholipase. A and alpha-amanitin. *Toxicon*, v. 13, 9. 465, 1975.

HAUSER, F., HOFFMANN, W. P-domains as shuffled cysteine-rich modules integumentary mucin C.1 (F,M – C.1) from **Xenopus laevis**. *J. biol. Chem.*, v. 34, p. 24620-24624, 1992.

HAUSER, F., ROEBEN, C., HOFFMANN, W. xP2, a new member of P-domain peptide family of potential growth factors, is synthesized in **Xenopus laevis** skin. *J. biol. Chem.*, v. 267, p. 14451-14455, 1992.

HAVT, A. **Toxicidade aguda e alterações hematológicas e renais do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* em ratos**. Fortaleza. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará – UFC. 1999.

HIDALGO, P., MACKINNON, R. Revealing the architecture of a K^+ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. **Science**, v. 268, p. 307-310, 1995.

- HILLE, B. **Ionic channels of excitable membranes**. Sinauer: Sunderland. MA. 1984.
- HOPKINS, B., HODGSON, W. C., SUTHERLAND, S. K. An *in vitro* pharmacological examination of venom from the soldierfish *Gymnapistes marmoratus*. **Toxin**, v. 35, n. 7, p. 1101-1111, 1997.
- HOUSE, C. R. The role of glandular activity in the electrical response of amphibian skin to noradrenaline. **J. Physiol**, v. 202, n. 3, p. 631-644, 1969.
- HOWARD, R. R., BRODIE, E. D. Jr. A batesian mimetic complex in salamanders: responses of avian predators. **Herpetologia**, v. 29, p. 33-45, 1973.
- HOWARD, R. R., BRODIE, E. D. Jr. Experimental study of mimicry in salamanders involving *Notophthalmus viridescens viridescens* and *Pseudotriton ruber schencki*. **Nature Lond**, v. 233, p. 277-295, 1971.
- IVANOV, CH. P., IVANOV, O. CH. The evolution and ancestors of toxic proteins. **Toxicon**, v. 17, p. 205-220, 1978.

IVANOV, O CH., The evolutionary origin of toxic proteins. **Toxicon**, v. 19, p. 171-178, 1980.

IZECKSOHN, E. Uma nova espécie de *Leptodactylus*, do Estado do Rio de Janeiro, Brasil (*Amphibia*, Anura, *Leptodactylidae*). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 36, n. 2, p. 527-530, 1976.

IWASAKI, Y., KAWAHARA, T., SHIMOI, H, SUZUKI, K., GHISALBA, O., KANGAWA, K, MATSUO, H, NISHIKAWA, Y. Purification and cDNA cloning of Xenopus laevis Akin peptidylhydroxyglycine N-C lyase, catalyzing the second reaction of C-terminal α -amidation. **Eur. J. Biochem**, v. 201, p.551-559, 1991.

JAEGER, R. G., GERGITS, W. F. Intra-and interspecific communication in salamanders through chemical signals on the substrate. **Anim. Behav**, v. 27, p. 150-160, 1979.

JAUSSI, R., KUNZ, P. A . Isolation of the major toxic protein from the skin venom of the crested newt, *Triturus cristatus*. *Specialia*. v. 15, n. 4, p. 503-504, 1978.

KAO, C. Y. Tetrodotoxin, saxitoxin, and their significance in the study of excitation phenomena. **Pharmacol. Rev**, v. 18, p. 997-1049, 1966.

- KELLAR, K. J. Epibatidine: its pharmacological actions and utility for studying neuronal nicotinic receptors. **Neurotransmissions**, v. 11, n. 4, p. 1-5, 1995.
- KICLITER, E., GOYTIA, E. J. A comparison of spectral response functions of positive and negative phototaxis in two anuran amphibians, *Rana pipiens* and *Leptodactylus pentadactylus*. **Neuroscience Letters**, v. 185, p. 144-146, 1995.
- KREIL, G. Processing of precursors by dipeptidyl aminopeptidases: a case of molecular ticketing. **TIBS**, v. 15, p. 23-26, 1990.
- LÁBLER, L., KEILOVÁ, H., SORM, F., KORNALÍK, F., S'TÝBLOVÁ, Z. Toxic skin secretions of spadefoot toad *Pelobates fuscus*. **Toxicon**, v. 5, p. 247-251, 1968.
- LAZARUS, L. H., ATTILA, M. The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. **Progress in Neurobiology**, v. 41, p. 437-507, 1993.
- LIEBMAN, P. A., ENTINE, G. Visual pigments of frog and tadpole (*Rana pipiens*). **Vision Res**, v. 8, p. 761-775, 1968.

- LIM, C. K. Introduction to HPLC of small molecules. In: LIM, C. K. (ed.) HPLC of small molecules a practical approach IRL press, Oxford, Washington DC, 1986. p. 1-12.
- LOOMIS, T. A ., HAYES, A . W. **Loomis's: essentials of toxicology.** 4 ed. California: Academic Press. 1996. p. 282.
- LOW, B.W. The Three-dimensional structure of postsynaptic snake neurotoxins: consideration of structure and function. In: CHEN – YUAN, L (org.). **Snake Venonus.** New York: Springer, cap. 6, p. 213-257, 1979 (Handbook of experimental pharmacology, v. 52).
- LUTZ, B. Biological significance of cutaneous secretions in toads and frogs. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, n. 1, p. 55-59, 1966.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., M.M. **Princípios de Bioquímica.** 2 ed. São Paulo: Sarvier. 1996. p. 839.
- MAGLIOLA, L., JONES, A. W. Depolarization-stimulated $^{42}\text{K}^+$ efflux in rat aorta is calcium-and cellular volume-dependent. **Circulation Research**, v. 61, n. 1, p. 1-11, 1987.
- MAHLER, H. R., CORDES, E.. H. **Biological chemistry.** 2 ed. New York: Harper International Edition. 1966. p. 1009.

MÄRKI, F., WITKOP, B. The venom of the colobian arrow poison frog *Phyllobates bicolor*. **Experientia**. v. 19, n. 7, p. 329-338, 1963.

MARSCHALE, P., HERMANN, J., LEFFLER, H. BARONDES, S.H, COOPER, D.N.W. Sequence and specificity of a soluble lactose-binding lectin from *Xenopus laevis*. **Skim. J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 12942 – 12949, 1992.

MARTINS, A. M. C. **Alterações renais causadas pelo veneno da *Crotalus durissus cascavella* e bloqueio farmacológico com indometacina, dexametasona e nifedipina**. Fortaleza. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará – UFC. 1997.

MATSUDAIRA, P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 21, p. 10035-10038, 1987.

MEDEIROS, M. A. S. **Novos ensaios e estudos da endopeptidase neutra (EC.: 3. 4. 24. 11): influência do par de arginina P₂ e P₃ na degradação fisiológica dos peptídeos opióides que contêm encefalinas**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará – UFC. 1997.

- MELLO, L.E.A.M., CAVALHEIRO, E.A. Behavioural, electrencephalographic and neuropathological effects of the intrahippocampal injection of the venom of the south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 27, p. 189-199, 1989.
- MÉNEZ, A. Les venins des serpents. **Recherche**, v. 18, n. 190, p. 888-893, 1987.
- MILLER, C. Genetic manipulation of ion channels: a new approach to mechanism. **Neuron**, v. 2, p. 1195-1205, 1989.
- MICHL, H., KAISER, E. Chemie und biochemie der amphibiengifte. **Toxicon**, v. 1, p. 175-182, 1963.
- MICHL, H., PASTUSZYN, A. Vergleichende untersuchungen von amylasen. **Monatshefte F. Chem**, v. 95, p. 978-981, 1964.
- MIZUNO, K., OHSUYE, K., WADA, Y., FUCHIMURA, K., AKA, S., MATSUO, H. Cloning and sequence of cDNA encoding a peptide C-terminal α -amidating enzyme from *Xenopus laevis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 148, p. 546-552, 1987.

- MOLLAY, C., WICHTA, J. KREIL, G. Detection and partial characterization of an amidating enzyme in skin secretion of *Xenopus laevis*. **FEBS e LETT**, v. 202, p. 251-254, 1986b.
- MOLLAY, C., VILAS, V., HUTTICHER, A, KREIL, G. Isolation of a dipeptidyl aminopeptidase, a putative processing enzyme, from skin secretion of *Xenopus laevis*. **Eur. J. Biochem.**, v. 160, p. 31-35, 1986a.
- MOSHER, H. S., FURHRMAN, F. A., BUCHWALD, H. D., FISCHER, H. C. Tarichatoxin – tetrodotoxin: a potent neurotoxin. **Science**, v. 144, p. 1100-1109, 1964.
- MOTA, M. L. S. **Purificação e estudo farmacológico da atividade pró – inflamatória de um fator extraído da pele de *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará – UFC. 1999.
- NARAHASHI, T. Chemicals as tools in the study of excitable membranes. **Physiology Rev**, v. 54, p. 813-889, 1974.

- NERY, M. D. A. **Purificação e caracterização de um fator ansiolítico extraído da pele da *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará – UFC. 1998.
- NEURWIRTH, M., DALY, J. W., MYERS, C. W., TICE, L. W. Morphology of the granular secretory glands in skin of poison – dart frogs (*Dendrobatidae*). **Tissue Cell**, v. 11, p. 755-760, 1979.
- OHSUYE, K., KITANO, K., WADA, Y., FUCHIMMURA, K., TANAKA, S., MIZUNI, K, MATSUO, H. Cloning of cDNA encoding a new peptide C-terminal α -amidating enzyme having a putative membrane-spanning domain from *Xenopus laevis* skin. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 150, p. 1275-1281, 1988.
- PAXINOS, G., WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** 2 ed. Sydney: Academic Press, 1982.
- POUGH, F. H. Comments on the presumed mimicry of red efts (Notophtamus) by red salamanders (*Pseudotriton*). **Herpetologia**, v. 30, p. 24-38, 1974.

PRADO-FRANCESCHI, J, VITAL BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake **Crotalus durissus terrificus**. **Toxicon**, v. 19, p. 875, 1981.

PROBST, J.C., GERTZEN, E. -M., HOFFMANN, W. An integumentary mucin (FIM-B.1) from **Xenopus laevis** homologous with won willebrand factor. **Biochemistry**, v. 29, p. 6240-6244, 1990.

QUAY, W. B. Integument and the environment: glandular composition, function, and evolution. **Am. Zoologist**, v. 12, p. 95-108, 1972.

ROCHA E SILVA, M. **Fundamentos da farmacologia e suas aplicações à terapêutica**. v.2, 3 ed. São Paulo: EDART- São Paulo Livraria Editora LTDA. 1973. p. 413.

ROCHA E SILVA, M., ROTHSCHILD, H. A. A **bradykinin kinin anthology**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFE). 1974. p. 335.

ROCHAT, H., ROCHAT, C., MIRANDA, F., LISSITZKY, S, EDMAN, P. The aminoacid sequence of neurotoxin I of **Androctonus australis hector**. **Eur J. Biochem.**, v. 17, p. 262, 1970.

SAMEJIMA, Y., IWANAGA, S, SUZUKI, T. Complete amino acid sequence of snake venom phospholipase A2. **Toxicon**, v. 13, p. 119, 1975.

SANTOS , E. **Anfíbios e répteis do Brasil** (vida e costumes). 2 ed. Rio de Janeiro: F Briguiet & Cia. 1955. 262 p.

SAUVIAT, M-P. Effet des neurotoxines sur l'activité électrique et la contraction du muscle cardiaque. **C. R. Société de Biologie**, v. 191, n. 3, p. 451-471, 1997.

SAZIMA, I, BOKERMANN, W. C. A. Cinco novas espécies de *Leptodactylus* do centro e sudeste brasileiro (*Amphibia, Anura, Leptodactilidae*)¹. **Rev. Bras. de Biol.**, v. 38, n. 4, p. 889-912, 1978.

SERVENT, D., WINCKLER-DIETRICH, V., HU, H-Y, KESSLER, P. DREVET, P., BERTRAND, D., MÉNEZ, A. Only snake curaremimetic toxins with a fifth disulfide band have high affinity for the neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 39, p. 24279-24282, 1991.

SEVERINI, C., TITA, B., BOLLE, P. Pumiliotoxin-B-like alkaloid in extracts of alkaloid in extracts of the skin of the Australia myobatrachid frog *Pseudophryne coriacea*: effects on blood pressure and heart of the rabbit. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 317, p. 56-66, 1992.

SHI, Y.-B., STOLOW, M., PUZIANOWSKA-KUZNICKA, M., WONG, J. Les genes de la métamorphose. **Recherche**, v. 286, p. 58-64, 1996.

SHIPOLINI, R. A, DOONAN, S., VERNON, C.A. The disulphide bridges of phospholipase A2 from bee venom. **Eur. J. biochem.**, v. 48, p. 477, 1974.

SIMMACO, M., BARRA, D., CHIARINI, F., NOVIELLO, L., MELCHIORRI, P., KREIL, G., RICHTER, K. A family of bombinin – related peptides from the skin of *Bombina variegata*. **Eur. Journal Biochem.**, v. 199, n. 1, p. 217-222, 1991.

SOLÉ-CAVA, A. M., KELOCOM, A. Diálogo químico nos mares. **Ciência Hoje**, v. 8, n. 46, p. 18-29, 1988.

SPINDEL, E. R., GIBSON, B. W., REEVE, J. R., KELLY, M. Cloning of cDNAs encoding amphibian bombesin: evidence for the relationship between bombesin and gastrin – releasing peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 9813-9817, 1990.

STORER, T. I., USINGER, R. L., STEBBINS, R. C., NYBAKKER, J. W. **Zoologia geral**. Cap. 31. 6 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 1984. p. 618-641.

SWAIN, T. Secondary compounds as protective agents. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 28, p. 479-501, 1977.

THE WORLD of pharmacia biotech' 95: molecular biology, cell biology, chromatography, electrophoresis and spectrophotometry. Uppsala: Pharmacia Biotech, 1995. cap. 15, p. 325.

TOLEDO, R. C. Breve apreciação sobre a secreção cutânea dos anfíbios. **Ciência e Cultura**, v. 38, n. 2, p. 279-284, 1986.

TOLEDO, R. C., JARED, C. Considerações sobre o veneno dos anfíbios. **Ciência e Cultura**, v. 41, n. 3, p. 250-258, 1989.

VELÁZQUEZ, B. **Terapéutica com sus fundamentos de farmacología experimental.** v.1, 11^a ed. Madrid: Editorial Científico-Médico. 1970. p. 710.

VIEIRA, S. **Introdução a bioestatística.** Rio de Janeiro: Campus, 1983. p. 297.

VILLELA, G. G., BACILA, M., TASTALOI, H.. **Bioquímica.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1966. p. 842.

VITAL BRAZIL, O. Neurotoxins from the South South American rattlesnake venons. **J. formosan Med. Ass.**, v. 71, p. 1535- 1541, 1967.

WAKE, D. B. Declining amphibian populations. **Science**, v. 253, p. 860-870. 1991.

WAKELY, J. F., FURHRMAN, G. J., FUHRMAN, F. A., FISCHER, H. G., MOSHER, H. S. The occurence of tetrodotoxin (tarichatoxin) in amphibia and the distribuion of the toxin in organs of the newts (Taricha). **Toxicon**, v. 3, p. 195-203, 1966.

WOOD, A. J. J., ZHOU, H. H. Ethnic differences in drug disposition and responsiveness. **Clin. Pharmacokinet**, v. 20, p. 350-373, 1991.

WU, C. H., NARAHASHI, T. Mechanism of action of marine neurotoxins on ion channels. **Ann. Rev. of Pharmacol. and Toxicol.**, v. 28, p. 141-161, 1988.

ZELLER, E. A. Enzymes as essential components of bacterial and animal toxins. In: SUMMER, J. B., MYRBACK, K. **The enzymes: chemistry and mechanism of action.** vol. II. part.2 New York: Academic Press INC. 1951. p. 986-1013.