

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS DE PELES E GLÂNDULAS PAROTÓIDES DE ANUROS DO SEMI-ÁRIDO BRASILEIRO

MATHEUS SANTOS DE SÁ<sup>1</sup>, FLORA ACUÑA JUNCÁ<sup>2</sup>, LAIN CARLOS PONTES DE CARVALHO<sup>1</sup>, RICARDO DOS SANTOS<sup>1</sup> & MILENA BOTELHO PEREIRA SOARES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, 40296-710, Salvador, Bahia, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia, Av. Universitária s/n, 44031-460, Feira de Santana, BA, Brasil

Autor para correspondência: (milena@cpqgm.fiocruz.br)

**(Avaliação da atividade imunomoduladora de extratos de peles e glândulas parotóides de anuros do semi-árido brasileiro)** – A pele dos anfíbios possui uma variedade de produtos químicos com diversas atividades biológicas. Esses compostos participam dos mecanismos de defesa contra patógenos e substâncias estranhas aos quais os anfíbios são expostos em seu habitat. Esse trabalho teve o objetivo de investigar a atividade farmacológica de extratos de peles e glândulas de anuros do semi-árido brasileiro visando à identificação de substâncias com atividade imunomoduladora. Extratos aquosos foram preparados a partir de homogeneização das peles de sete espécies de anuros *Hypsiboas crepitans*, *Hypsiboas albopunctatus*, *Bokermannohyla oxente*, *Leptodactylus ocellatus*, *Chaunus rubescens*, *Ceratophrys joazeirensis* e *Chaunus jimi* e das glândulas de duas espécies de anuros (*Chaunus rubescens* e *Chaunus jimi*). Para avaliar a inibição da produção de óxido nítrico (NO) pelos extratos, foram utilizadas células da linhagem J774 estimuladas com IFN- $\gamma$  e LPS, medindo-se a concentração de nitrito após 24 horas pelo método de Griess. Nos ensaios de linfoproliferação, esplenócitos de camundongos BALB/c foram estimulados com concanavalina A na presença ou ausência dos extratos, determinando-se a proliferação por meio da avaliação da incorporação de <sup>3</sup>H-timidina. Dos nove extratos analisados, cinco apresentaram atividade inibitória superior a 50% no ensaio de linfoproliferação (extrato de pele de *C. rubescens*, *B. oxente*, *C. jimi*, *L. ocellatus* e de glândula de *C. rubescens*) e apenas um extrato inibiu a produção de NO (*C. rubescens*). Os resultados demonstram que os anuros do semi-árido são fontes potenciais de moléculas imunossupressoras. Outros estudos estão sendo realizados com o objetivo de isolar e caracterizar as moléculas ativas na pele de *C. rubescens*.

**Palavras-chave:** Anuros, semi-árido brasileiro, atividade imunomoduladora.

**(Evaluation of immunomodulatory activity of skin and parotoid gland extracts of anure from Brazilian semi-arid region)** – The skin of amphibians has been characterized by the presence of several chemical products with diverse biological activities. These compounds participate as defense mechanisms against pathogens and harmful substances to which amphibians are exposed in their natural habitats. This work aimed to investigate the pharmacological activity of skin and gland extracts prepared from species of anures native or endemic from Brazilian semi-arid region with emphasis on immunomodulatory activity. Aqueous extracts were prepared by homogenization of skins of seven anure species (*Hypsiboas crepitans*, *Hypsiboas albopunctatus*, *Bokermannohyla oxente*, *Leptodactylus ocellatus*, *Chaunus rubescens*, *Ceratophrys joazeirensis* e *Chaunus jimi*) and of glands of two species (*Chaunus rubescens* and *Chaunus jimi*). To evaluate the inhibition of nitric oxide (NO) production by the extracts, we used J774 cells stimulated with IFN- $\gamma$  and LPS and measured the nitrite concentration using the Griess method 24 hour later. For lymphoproliferation assays, BALB/c mice spleen cells were stimulated *in vitro* with concanavalin A in the presence or absence of extracts being the proliferative response determined by <sup>3</sup>H-thymidine uptake quantification. Of the nine extracts analyzed, five had inhibitory activity superior to 50% in lymphoproliferation assay (skin extract of *C. rubescens*, *B. oxente*, *Chaunus jimi*, *L. ocellatus* and gland extract of *C. rubescens*) and only one extract inhibited NO production (*Chaunus rubescens*). The results demonstrate that anure species from the Brazilian semi-arid are a potential source of molecules with immunomodulatory activity. Studies aiming to isolate and characterize the active molecule in the skin of *C. rubescens* are being carried out.

**Key words:** Anure, Brazilian semi-arid, immunomodulatory activity.

### INTRODUÇÃO

O crescente interesse no isolamento e caracterização de agentes terapêuticos de origem natural é devido a diferentes fatores, tais como a diversidade química, a complexidade estrutural e o seu potencial biológico (Yu, 2002). A região do semi-árido brasileiro compreende 11,5% do território nacional e pouco se conhece a respeito da biodiversidade e potencial farmacológico das espécies ali

encontradas. Esta região é predominantemente caracterizada por um tipo de vegetação denominada caatinga, a qual abrange a maior parte da área com clima semi-árido da região nordeste do Brasil (SAMPAIO *et al.*, 2002).

Estudos sobre a atividade biológica de substâncias ativas presentes na pele dos anfíbios têm sido relatados na literatura científica há mais de 40 anos. A pele dos anuros é uma rica fonte de moléculas biologicamente ativas, entre

elas peptídeos (ERSPAMER, 1980). Foi isolado e caracterizado estrutural e funcionalmente um peptídeo, da pele do anuro *Hyla punctata*, com atividades antimicrobiana, antifúngica e hemolítica (PRATES *et al.*, 2004). Peptídeos isolados da pele de *Xenopus laevis*, denominados magaininas, apresentam amplo espectro de atividade antimicrobiana (ZASLOFF, 1987). Tigerininas, nome dado aos peptídeos isolados da pele de *Rana tigerina*, também apresentam atividade antimicrobiana (SAI *et al.*, 2001). Um peptídeo denominado leucina-arginina, com potente atividade imunomoduladora em mastócitos e células progenitoras granulopoiéticas, foi isolado da pele de *Rana pipiens* (SALMON *et al.*, 2001). Muitos dos peptídeos presentes na pele dos anuros estão em grandes quantidades (miligramas da substância por grama de pele). Muitos peptídeos ocorrem em concentrações que são superiores àquelas encontradas na circulação do animal, indicando que a principal fonte de biossíntese dessas substâncias é a pele. Acredita-se que esses peptídeos sejam componentes da defesa do anuro contra predadores e microrganismos invasores (SALMON *et al.*, 2001).

As doenças mediadas pelo sistema imune, tais como as alergias e doenças auto-imunes, representam um importante problema de saúde no mundo, sendo necessário o uso de abordagens inovadoras para o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos (KRENSKY *et al.*, 2001). O transplante é uma alternativa terapêutica para diversas patologias. No entanto, a rejeição mediada pelo sistema imune constitui um grande obstáculo para o uso desta tecnologia.

Drogas imunossupressoras são usadas em pacientes receptores de transplantes de órgãos e em portadores de doenças auto-imunes. Essas drogas requerem utilização a longo prazo e causam imunossupressão ampla e inespecífica, expondo o paciente a riscos de infecções. Além disso, essas terapias estão associadas a um potencial risco de dano irreversível dos órgãos (SIMON, 2004). Devido ao fato das atuais abordagens terapêuticas não serem inteiramente satisfatórias, o desenvolvimento de novas drogas com menos efeitos colaterais e menor custo é de grande interesse. Neste trabalho foi avaliada a atividade imunomoduladora de extratos de pele e glândulas paratóides de espécies de anuros do semi-árido brasileiro, com o objetivo de identificar novas moléculas ativas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os espécimes de seis espécies de anuros das famílias Hylidae (*Hypsiboas crepitans*, *Hypsiboas albopunctatus*, *Bokermannohyla oxente*), Leptodactylidae (*Leptodactylus ocellatus*) e Bufonidae (*Chaunus rubescens* e *Chaunus jimi*) foram coletados em diferentes ambientes do município de Rio de Contas, Bahia. Ainda em campo, amostras de tecido foram colhidas e, para os espécimes do gênero *Chaunus*, a glândula paratóide retirada, depois do falecimento do animal por inalação de éter. Estas amostras foram imediatamente conservadas sob refrigeração até a chegada no Laboratório de Animais Peçonhentos e

Herpetologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (LAPH/UEFS), onde foram mantidas a -20°C. Também espécimes de *Ceratophrys joazeirensis*, apreendidos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) e posteriormente cedidos ao LAPH/UEFS, tiveram amostras de tecido retiradas da mesma forma como as demais espécies. Todos os espécimes utilizados encontram-se depositados no Museu de Zoologia da UEFS.

### Preparação dos extratos

Os lotes de peles e glândulas foram enviados ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fiocruz (LETI/CPqGM/Fiocruz), onde foram acondicionadas imediatamente a -20°C e subseqüentemente utilizadas para o preparo dos extratos.

As peles foram inicialmente lavadas utilizando solução de cloreto de sódio a 0,9%. Em seguida, as peles foram fragmentadas utilizando-se tesoura e pinças para facilitar a homogeneização em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Adicionou-se água destilada (90% do volume final) na proporção de 7,5 mL (9/10 do volume final) para cada grama de pele antes da homogeneização, realizada utilizando-se homogeneizador (PGS Scientifics, Maryland, EUA). O homogenato foi tratado por ultrassom com amplitude de 60 e pulso de 4 segundos (Processador Ultrassônico CE; São Paulo, Brasil) durante 3 minutos, a 4°C. Imediatamente após esse processo, adicionou-se PBS concentrado 10 vezes (1/10 do volume final) e centrifugaram-se as amostras a 5.100 x g por 40 minutos a 4°C. Os extratos foram então esterilizados com 65.000 rads de irradiação gama a 4°C (Cis Bio International IBL437C, France) para posterior uso em ensaios biológicos.

### Dosagem de proteínas

Com o objetivo de se quantificar as proteínas totais dos extratos, alíquotas destes foram diluídas em solução tampão de bicarbonato de sódio a 0,1 M pH 8,0 contendo 1% de detergente NP 40, e adicionaram-se 10 µl de fluorescamina a 160 µg/mL/poço (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) em placa de 96 poços. A leitura da fluorescência foi feita em aparelho Fluoroskan II (Labsystems, Vantaa, Finlândia). A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pela interpolação da fluorescência das alíquotas com as diluições determinadas de uma proteína padrão (albumina do soro bovino; Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) utilizadas como padrão.

### Obtenção do antígeno de *Trypanosoma cruzi*

Para o ensaio de inibição da proliferação de esplenócitos de animal com infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi*, camundongos BALB/c foram infectados com 100 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Colombiana) com 6-8 meses de infecção (AOKI *et al.*, 2004). Antígeno de *T. cruzi* foi preparado a partir de formas tripomastigotas, suspensas em água, com três ciclos de congelamento e descongelamento, centrifugando a 5.100 x g e estocando o sobrenadante a -70°C.

Tabela 1. Avaliação da citotoxicidade dos extratos de pele e glândula de anuros do semi-árido brasileiro.

Extrato	Espécie	Concentração (µg/mL)	% de citotoxicidade
Peles	<i>Ceratophrys joazeirensis</i>	1.000	63
		100	0
		10	0
	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	1.000	70
		100	30
		10	0
	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	1.000	50
		100	19
		10	0
	<i>Hypsiboas crepitans</i>	1.000	53
		100	0
		10	0
	<i>Chaunus jimi</i>	1.000	34
		100	16
		10	0
<i>Bokermannohyla oxente</i>	1.000	0	
	100	0	
	10	0	
<i>Chaunus rubescens</i>	1.000	0	
	100	0	
	10	0	
Glândulas	<i>Chaunus jimi</i>	1.000	58
		100	47
		10	0
	<i>Chaunus rubescens</i>	1.000	0
		10	0

#### Avaliação da citotoxicidade

Para determinar a citotoxicidade dos extratos, esplenócitos de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$  células/poço em 200 µL) foram cultivados em placas de 96 poços em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) suplementado com 10% de SBF (Cultilab, Campinas, Brasil) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, Brasil). Cada extrato foi avaliado em três concentrações (10, 100 e 1.000 µg/mL), em triplicatas. Aos poços controles, foi adicionada uma solução de saponina a 1%. As células foram incubadas na presença de 1 µCi/poço de [metil- $^3\text{H}$ ]-timidina (Amersham, Little Chalfont, England) durante 24 horas, a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após esse período, o conteúdo das placas foi coletado em coletor de células (Filtermate 196, Packard, Groningen, EUA) e a incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina foi quantificada em contador de radiação beta (â-Matrix 9600) (Packard, Meriden, EUA). A citotoxicidade foi calculada em relação à incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina nas culturas não tratadas.

#### Ensaio de inibição da produção de óxido nítrico

Células da linhagem J774 foram cultivadas em placas de 96 poços ( $10^5$  células em 200 µL/poço) e estimuladas com 1 µg/mL de LPS (Sigma Chemical Co.,

St. Louis, EUA) e 5 ng/mL de IFN- $\gamma$  (PharMingem, San Diego, EUA), na presença ou ausência dos extratos em concentrações máximas atóxicas, em meio DMEM, suplementado como descrito anteriormente, e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após este período, 50 µL dos sobrenadantes de cada poço foram coletados e transferidos para placas de 96 poços para avaliar a quantidade de nitrito produzida através do método de Griess, como descrito previamente (CHEN *et al.*, 2004).

A reação de Griess foi avaliada adicionando-se 50 µL de sobrenadante/poço e igual volume de reagente de Griess (solução de sulfanilamida a 1% e hidrocloretonafitilamida diamina – NEED – a 0.1% em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 0.3 M) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). As placas foram lidas imediatamente em espectrofotômetro (Spectra Max 190, SunnyVale, EUA), no comprimento de onda de 570 nm. O percentual de inibição da produção de NO para cada extrato avaliado foi determinado pela comparação das células tratadas com as amostras analisadas e os controles não tratados.

#### Ensaio inibição de linfoproliferação

Suspensões de esplenócitos de camundongos BALB/c ( $4 \times 10^5$  em 200 µL/poço) foram estimuladas com concanavalina A (Con A, 2 µg/mL) (Sigma Chemical Co.,

Tabela 2. Inibição da linfoproliferação e da produção de NO por extratos de peles e glândulas de anuros.

Extrato	Concentração (µg/mL)*	Espécie	Citotoxicidade (%)	NO (% de inibição)	Linfoproliferação (% de inibição)
Peles	100	<i>Ceratophrys joazeirensis</i>	0	0	42.6
		<i>Leptodactylus ocellatus</i>	30	24.9	55.6
		<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	19	0	36.6
		<i>Hypsiboas crepitans</i>	0	4.4	11.8
		<i>Bufo jimi</i>	16	20.9	59.3
	1.000	<i>Bokermannohyla oxente</i>	0	44.5	54.5
		<i>Chaunus rubescens</i>	0	93.6	99.9
Glândulas	10	<i>Bufo jimi</i>	0	0	14.7
	1.000	<i>Chaunus rubescens</i>	0	0.7	99.4

St. Louis, EUA) e cultivadas na presença ou ausência dos extratos em placas de 96 poços em meio DMEM, suplementado como descrito acima. Todos os extratos foram testados em triplicatas. Após 48 horas de incubação a 37°C e a 5% CO<sub>2</sub>, as placas foram pulsadas com 1 µCi/poço de <sup>3</sup>H-timidina e incubadas novamente por 12 horas. As células foram então coletadas para a quantificação da incorporação de <sup>3</sup>H-timidina, conforme descrito anteriormente. O percentual de inibição da linfoproliferação pelos extratos foi determinado em relação aos controles não-tratados.

Para o ensaio de linfoproliferação antígeno-específico, esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi* (4 x 10<sup>5</sup> células em 200 µL/poço) foram cultivados também em placas de 96 poços em meio DMEM na presença ou ausência dos extratos. As células foram estimuladas com 50 µg/mL de antígeno de *T. cruzi* durante quatro dias. Após esse período, foi adicionada <sup>3</sup>H-timidina (1 µCi/poço) e as células foram incubadas por um período de 18 horas. As células foram então coletadas para a quantificação da incorporação de <sup>3</sup>H-timidina, como descrito acima. O percentual de inibição da linfoproliferação pelos extratos foi determinado em relação aos controles não-tratados.

## RESULTADOS

### Avaliação da citotoxicidade

Os extratos testados quanto à atividade imunomoduladora apresentaram graus de citotoxicidade variados (Tabela 1). As concentrações de extrato que produziram citotoxicidade igual ou menor que 30% foram, portanto, as utilizadas nos ensaios para atividade imunomoduladora (Tabela 2).

### Ensaio de atividade imunomoduladora

Em cultura de macrófagos ativadas por LPS (1 µg/mL) e IFN-γ (5 ng/mL), o extrato de pele de *Chaunus rubescens* causou uma inibição da produção de NO acima de 90% (Tabela 2). Já o extrato de glândula parotóide da mesma espécie de anuro não apresentou atividade inibitória significativa. Os extratos de peles de *Hypsiboas crepitans*,

*Bokermannohyla oxente*, *Leptodactylus ocellatus* e *Chaunus jimi* causaram inibição de 4,4%, 44,5%, 24,9% e 20,9% respectivamente. Os extratos de pele de *Ceratophrys joazeirensis* e *Hypsiboas albopunctatus* e o de glândula de *C. jimi* não causaram inibição da produção de NO (Tabela 2).

Quando testados em culturas de esplenócitos ativados por Con A, os extratos de pele de *B. oxente*, *L. ocellatus*, *C. jimi* e *C. rubescens*, bem como os extratos de glândulas de *C. rubescens*, causaram uma inibição superior a 50%. No entanto, os extratos de peles de *H. crepitans*, *H. albopunctatus*, *C. joazeirensis* e extratos de glândula de *C. jimi* causaram uma inibição inferior a 50% (Tabela 2). O extrato de pele de *C. rubescens* apresentou atividade imunomoduladora concentração-dependente, com 100% de inibição a 1.000 µg/mL e IC<sub>50</sub> de 141,9 µg/mL (Fig. 1).

O extrato de pele de *C. rubescens* exerceu uma atividade inibitória da linfoproliferação em cultura de esplenócitos de camundongos chagásicos crônicos ativados por antígeno de *T. cruzi* (50 µg/mL) na presença ou na ausência do extrato de pele de *C. rubescens* em diferentes concentrações. Pôde-se observar uma atividade inibitória de 100% na concentração de 1.000 µg/mL, similar à observada no experimento realizado utilizando Con A (Fig. 2).

## DISCUSSÃO

No presente trabalho, pode-se sugerir que na pele de algumas espécies de anuros existem substâncias com atividade moduladora do sistema imune, como demonstrado pelos resultados encontrados. De uma maneira geral, as amostras testadas apresentaram baixa toxicidade, sendo que 60% delas apresentaram toxicidade máxima de 30% na concentração de 100 µg/mL.

Além dos efeitos observados na produção de NO, o potencial imunomodulador dos extratos de peles e glândulas de anuros foi também observado em ensaio de linfoproliferação utilizando Con A, como estímulo para os esplenócitos, ou antígeno de *Trypanosoma cruzi*, em ensaio de estimulação por um antígeno específico.

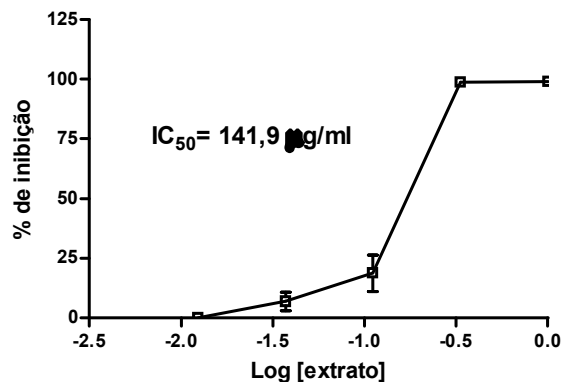


Fig. 1. Ensaio concentração-resposta do efeito do extrato de pele de *Chaunus rubescens* sobre a linfoproliferação de esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados por concanavalina A (2 µg/mL). As proliferações, obtidas na presença das quantidades de lisado indicadas nas abscissas, foram quantificadas pela mensuração da incorporação de <sup>3</sup>H-timidina. O percentual de inibição foi calculado comparando os valores encontrados na presença dos extratos com os valores obtidos na ausência dos mesmos. Os dados representam a média ± DP de quatro experimentos realizados independentemente\* P<0,05 (One-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

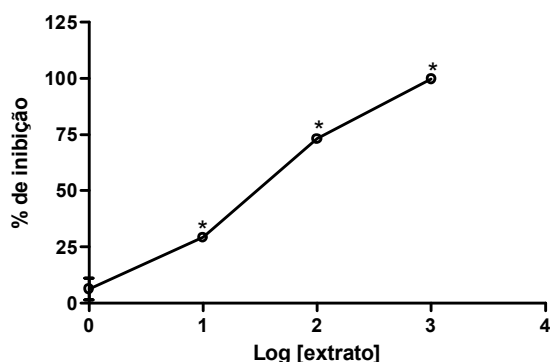


Fig. 2. Ensaio de linfoproliferação ao estímulo antigênico específico. Esplenócitos de camundongos BALB/c chagásicos crônicos foram estimulados *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* (50 µg/mL) na presença do extrato de pele de *C. rubescens*, em diferentes concentrações. A proliferação foi avaliada pela incorporação de <sup>3</sup>H-timidina, conforme descrito anteriormente. O percentual de inibição foi calculado também como descrito anteriormente. Os dados representam a média ± DP das triplicatas\* P<0,05 (One-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Além dos efeitos observados na produção de NO, o potencial imunomodulador dos extratos de peles e glândulas de anuros foi também observado em ensaio de linfoproliferação utilizando Con A como estímulo para os esplenócitos. Todos os extratos testados apresentaram inibição da linfoproliferação, variando de 11,8 a 99,9, nas diferentes concentrações testadas. Estas percentagens foram sempre superiores, para cada concentração de extrato, às percentagens de citotoxicidade, indicando que houve realmente uma inibição da linfoproliferação e não uma morte celular induzida pela citotoxicidade do extrato. Diante desses achados, pode-se inferir que as peles de anuros testadas produzem moléculas imunomoduladoras.

Para investigar se a inibição da linfoproliferação pelo extrato *C. rubescens* não era devido à interferência na

ligação da Con A, uma lectina isolada de *Canavalia ensiformis* (RUDIGER & GABIUS, 2001), aos esplenócitos por determinado componente do extrato, linfócitos de camundongos chagásicos crônicos foram estimulados com antígeno de *T. cruzi* na presença do extrato em diferentes concentrações. Observou-se uma inibição semelhante à observada no experimento realizado com estimulação por Con A, de modo concentração-dependente, demonstrando que este extrato possui de fato uma atividade imunossupressora na proliferação de linfócitos.

Em relação à inibição da produção de óxido nítrico, apenas no cultivo em que foram adicionados 100 µg/mL de extrato de pele de *L. ocellatus* o percentual de citotoxicidade foi superior ao percentual da inibição. Os valores de redução de produção de NO variaram entre 0% e 93,6%, havendo em alguns casos uma completa dissociação entre o efeito sobre a linfoproliferação e sobre a produção de NO, indicando que diferentes substâncias podem estar mediando esses efeitos. Os extratos de pele e glândula de *C. jimi* apresentaram pequena diferença na capacidade de inibir a proliferação de linfócitos estimulados com Con A e a produção de NO por células da linhagem J774 estimuladas com LPS e IFN-γ. Entretanto, parece haver uma variação na atividade de enzimas envolvidas na síntese dessas substâncias na pele e glândula parotóide. A composição e a concentração desses compostos na pele dos anfíbios podem variar com a espécie, estágio de desenvolvimento e distribuição geográfica (SEBEN, 1993). Indolalquilaminas, substâncias encontradas em secreções de peles de *Bufo*, podem estar em diferentes concentrações numa mesma espécie coletada em locais diferentes (CEI *et al.*, 1968). Por outro lado, extratos de pele e glândula de *C. rubescens* apresentaram percentuais semelhantes de atividade inibitória da proliferação de linfócitos ativados por Con A, de maneira concentração-dependente, sugerindo a ocorrência de duas substâncias ativas no mesmo extrato de pele, já que o extrato de glândula não apresentou atividade inibitória da produção de NO (Tabela 2).

Todos os extratos testados para atividade imunomoduladora também foram testados quanto à atividade antibacteriana (dados não publicados). Embora haja diversas citações na literatura relacionadas à atividade antimicrobiana de peptídeos isolados da pele de anuros, não foram observadas atividades semelhantes nos extratos testados. Naqueles trabalhos onde se observou atividade antibacteriana nas secreções de peles de anuros, a forma de extração da molécula ativa foi por estímulo elétrico (PRATES & JUNIOR, 2000) ou por injeção de adrenalina no saco dorsal do animal (SAI *et al.*, 2001), induzindo desse modo a produção das moléculas de interesse em grandes concentrações. Nesse trabalho, a forma de produção dos extratos foi por trituração da pele do animal em solução aquosa. Com isso, os peptídeos antimicrobianos poderiam estar em concentrações baixas, dificultando a detecção de suas atividades.

Várias espécies de anuros têm sido estudadas levando ao isolamento e caracterização de várias substâncias bioativas. No entanto, poucos estudos têm sido

realizados para identificar substâncias com atividades imunomoduladoras. Essas considerações ressaltam a relevância do presente estudo em relação à caracterização preliminar de substâncias isoladas de extratos de peles de

anuros do semi-árido brasileiro, considerando o grande potencial dos extratos de pele de anuros em apresentarem atividade farmacológica e o desconhecimento das propriedades dos anuros nativos dessa região.

#### REFERÊNCIAS

- AOKI MP, NL GUINAZU, AV PELLEGRINI, T GOTOH, DTE MASIH & S GE. 2004. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. **Am J Physiol Cell Physiol** 286(2): 206-12.
- CEI JM, V ERSPAMER & M ROSEGHINI. 1968. Taxonomic and evolutionary significance of biogenic amines and polypeptides occurring in amphibian skin. I. Neotropical leptodactylid frogs. **Syst Zool** 16(4): 328-42.
- CHEN T, X ZHAO, Y LIU, Q SHI, Z HUA & P SHEN. 2004. Analysis of immunomodulating nitric oxide, iNOS and cytokines mRNA in mouse macrophages induced by microcystin-LR. **Toxicology** 197(1): 67-77.
- ERSPAMER VM. 1980. Active polypeptides: from amphibian skin to gastrointestinal tract and brain of mammals. **Trends in Pharmacological Sciences** 1(2): 391-395.
- KRENSKY AM, TB STROM & JA BLUESTONE. 2001. The pharmacological basis of therapeutics. *In*: Goodman & Gilman's (20<sup>th</sup> ed). **Drugs used for immunomodulation**. New York: MacGraw Hill Companies.
- PRATES MV, ML SFORCA, WC REGIS, JR LEITE, LP SILVA, TA PERTINHEZ, AL ARAUJO, RB AZEVEDO, A SPISNI & CJR BLOCH. 2004. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. **J Biol Chem** 279(13): 13018-26.
- PRATES MV & CB JUNIOR. 2000. Peptídeos antimicrobianos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 17(1): 30-36.
- RUDIGER H & HJ GABIUS. 2001. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconj J** 18(8): 589-613.
- SAI KP, MV JAGANNADHAM, M VAIRAMANI, NP RAJU, AS DEVI, R NAGARAJ & N SITARAM. 2001. Tigerinins: novel antimicrobial peptides from the Indian frog *Rana tigerina*. **J Biol Chem** 276(4): 2701-7.
- SALMON AL, LJM CROSS, AE IRVINE, TRJ LAPPIN, M DATHE, G KRAUSE, P CANNING, L THIM, M BEYERMANN, S ROTHMUND, M BIENERT & C SHAW. 2001. Peptide Leucine Arginine, a potent immunomodulatory peptide isolated and structurally characterized from the skin of the Northern leopard frog, *Rana pipiens*. **The Journal of Biological Chemistry** 276 (13): 10145-10152.
- SAMPAIO EVSB, AM GIULIETTI, J VIRGÍNIO & CFL GAMARRA-ROJAS. 2002. **Vegetação e flora da Caatinga**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, Centro Nordestino de Informação sobre Plantas.
- SEBEN A & CA SCHWARTZ. 1993. A defesa química dos anfíbios. **Ciência Hoje** 15(87): 23-53.
- SIMON LS. 2004. The treatment of rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol** 18(4): 507-38.
- YU DQ. 2002. Prospect in the study of creating new drugs from Chinese herbal medicine. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao** 24(4): 335-8.
- ZASLOFF M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc Natl Acad Sci USA** 84(15): 5449-53.