



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA – IB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**Análise *in vitro* da atividade de secreções cutâneas de anfíbios do Cerrado brasileiro à proliferação do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999).**

Cleydson Luiz de Oliveira

**Orientador:** Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

**Co-orientador:** Dr. Carlos Alberto Schwartz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Brasília (DF), julho de 2014.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA – IB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

Dissertação de Mestrado  
CLEYDSON LUIZ DE OLIVEIRA

Título:

**Análise *in vitro* da atividade de secreções cutâneas de anfíbios do Cerrado brasileiro à proliferação do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999).**

Comissão Examinadora:

Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Orientador – UnB

Dra. Marisa Rangel

Membro Titular – Butantan

Dra. Mariana de Souza Castro

Membro Titular – UnB

Dr. Carlos Alberto Schwartz

Membro Suplente – UnB

*À Denise Vital e Amanda Vital.*

## **AGRADECIMENTOS...**

À minha família pelo incondicional apoio, compreensão e paciência, Denise Vital e Amanda Vital.

Ao Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior e Prof. Dr. Carlos Alberto Schwartz, orientador e co-orientador, respectivamente, pela oportunidade que me deram de trabalhar no Laboratório de Toxinologia-UnB, pelo enorme aprendizado que me permitiram construir, pela orientação, confiança depositada, compreensão e extrema paciência. Pela boa amizade, companheirismo e, acima de tudo, pelo profissionalismo. Muito Obrigado!

Aos professores Dr. Luis Felipe Toledo, Dr. Domingos da Silva Leite e Mestranda Carolina Lambertini, todos da UNICAMP, pelo imensurável apoio no fornecimento das amostras do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, este, primordial à realização deste trabalho. Também por suas orientações quanto ao manuseio e cultivo do fungo e pela receptividade, cordialidade e amigável tratamento que a mim dispuseram nos momentos em que estive nos laboratórios de quitridiomycose da UNICAMP.

Às estagiárias do laboratório e, aqui, cito aquelas que participaram diretamente das minhas rotinas e também ausências no laboratório, ajudando-me de maneira excepcional, Ana Carolina e Ana Brígida.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Toxinologia, Washington, Adolfo, Valter César e D<sup>a</sup> Maria, por todo apoio, amizade e companheirismo.

Às secretárias do Departamento de Pós-graduação em Biologia Animal, Daniele, Kézia, Ana Paula e Kelly, pelo extremo apoio nas burocracias das

disciplinas, pela compreensão e paciência, amizade, companheirismo e extremo profissionalismo. Muito Obrigado!

Aos Professores: Dr. Antônio Sebben, Dr<sup>a</sup>. Márcia Renata e Dr<sup>a</sup>. Mariana Castro, pelas orientações e apoio em determinadas fases deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação, Diego Alejandro, Harry, Cláudia Jimena, Jéssica Kelle, Talita Soares, Carol e Rafael Melani por todo apoio, pelas valiosas dicas, boa amizade, pelos bons, engraçados e alegres momentos.

Aos colegas de trabalho, Alexandre Lustosa, Marcos Fontes, Raphael Simão, Inaldo Ribeiro e Taves Guimarães, pelas dispensas que foram essenciais à realização deste trabalho, pelo apoio, camaradagem e companheirismo nas idas à UNICAMP.

À Universidade de Brasília, Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Toxinologia e Programa de Pós-graduação em Biologia Animal pela oportunidade a mim concedida.

Ao CNPq e DPP-UnB, por fomentarem recursos ao projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, quer tenha sido com sua ajuda, cooperação, orientação, apoio, amizade e companheirismo e que eu, porventura, não os tenha mencionado. A todos o meu MUITO OBRIGADO!

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”*

*(Leonardo da Vinci)*

## RESUMO

Declínios de populações de anfíbios em escala global têm sido registrados desde meados de 1980. Diversos são os fatores contribuintes, dentre os quais, destaca-se a quitridiomicosose, uma doença infecciosa emergente, causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999). A quitridiomicosose provoca um quadro clínico caracterizado pelo dano ao aparelho bucal de girinos em suas partes queratinizadas e interferências nas trocas gasosas na pele de indivíduos adultos, levando-os ao óbito. Há, na natureza, diversas espécies de anfíbios susceptíveis e resistentes à atividade do *Batrachochytrium dendrobatidis*, e poucos são os estudos que exploram as possíveis razões dessa susceptibilidade ou resistência. O mecanismo de defesa inata dos anfíbios, a sua secreção cutânea, apresenta inúmeros compostos bioativos com ação antimicrobiana, e vários são os estudos que comprovam suas atividades contra diversos patógenos, como fungos e bactérias. Foi testada neste trabalho, a atividade da secreção bruta de 23 espécies de anfíbios do cerrado contra o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Destas, três secreções apresentaram atividade considerável contra o fungo e por isso, foram fracionadas e utilizadas nos ensaios para verificação das atividades de cada fração. *Ameerega flavopicta*, *Phyllomedusa azurea* e *Rhinella mirandaribeiroi* contém em suas secreções cutâneas, compostos bioativos alcalóides, peptídicos e aminas biogênicas que apresentam atividade antimicrobiana atestada contra diversos organismos patógenos, incluindo-se o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Palavras chave: Anfíbios. Susceptibilidade. *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Bd*.

## ABSTRACT

Decline in amphibian populations on a global scale have been recorded since mid-1980. Several are the contributing factors, among which stands out chytridiomycosis, an emerging infectious disease caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999). This disease causes a clinical condition characterized by damage in the keratinized mouthparts of tadpoles and interference in gas exchange in the skin of adults, inducing death. There are several amphibian species in nature, susceptible and resistant to *Batrachochytrium dendrobatidis* activity. There are few studies that explore the possible reasons for this susceptibility or resistance. The innate defense mechanism of amphibians, their skin secretion, presents numerous bioactive compounds with antimicrobial action and there are several studies that prove its activities against various pathogens such as fungi and bacteria. At the present work, were tested the activity of the crude secretion of 23 species of amphibians from Cerrado. Three secretions presented strong activity against fungus and thus were fractionated and used for the tests to check the activities of each fraction. *Ameerega flavopicta*, *Phyllomedusa azurea* and *Rhinella mirandaribeiroi* contain in their skin secretions, bioactive alkaloids, peptides and biogenic amines that have antimicrobial activity against various pathogens organisms, including *Batrachochytrium dendrobatidis* fungus.

Key words: Amphibia. Susceptibility. *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Bd*.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> O ciclo de vida do <i>Bd</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Diagrama resumo de zoósporo flagelado e área cinetossomal ampliada.....	4
<b>Figura 3.</b> Aparato Bucal de girinos.....	7
<b>Figura 4.</b> Estrutura química básica de alcaloides.....	13
<b>Figura 5.</b> Estrutura química de um dos tipos de aminas biogênicas encontradas em anfíbios, a histamina.....	14
<b>Figura 6 –</b> Estrutura básica de Bufadienólídeos.....	15
<b>Figura 7.</b> Estrutura química da Magainina-I, de <i>Xenopus leavis</i> .....	16
<b>Figura 8.</b> (A) Microfotografia da cultura de <i>Bd</i> .....	27
<b>Figura 9.</b> Perfil de viabilidade do <i>Bd</i> após incubação com as secreções brutas de anfíbios.....	29
<b>Figura 10.</b> <i>Ameerega flavopicta</i> ©2004 Adrian Garda.....	29
<b>Figura 11.</b> Perfil cromatográfico da secreção cutânea de <i>Ameerega flavopicta</i> .....	30
<b>Figura 12.</b> Perfil de viabilidade do <i>Bd</i> após incubação com as frações cromatográficas resultantes do fracionamento da secreção cutânea de <i>A. flavopicta</i> .....	31
<b>Figura 13.</b> <i>Phyllomedusa azurea</i> ©2010 Pedro L. V. Peloso.....	34
<b>Figura 14.</b> Perfil cromatográfico da secreção cutânea de <i>Phyllomedusa azurea</i> .....	34
<b>Figura 15.</b> Perfil de viabilidade do <i>Bd</i> após incubação com as frações cromatográficas resultantes do fracionamento da secreção cutânea de <i>P. azurea</i> .....	35
<b>Figura 16.</b> <i>Rhinella mirandaribeiroi</i> ©2012 Mario Sacramento.....	37
<b>Figura 17.</b> Perfil cromatográfico da secreção cutânea de <i>Rhinella mirandaribeiroi</i> .....	39
<b>Figura 18.</b> Perfil de viabilidade do <i>Bd</i> após incubação com as frações cromatográficas resultantes do fracionamento da secreção cutânea de <i>R. mirandaribeiroi</i> .....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Viabilidade do fungo em diferentes tipos de água.....	5
<b>Tabela 2.</b> Espécies de anfíbios analisados para ausência ou presença de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> relacionando estágio de vida, metodologia de detecção e localidade.....	9
<b>Tabela 3.</b> Ensaio com as secreções brutas das espécies de anfíbios testadas contra o <i>B.dendrobatidis</i> .....	25
<b>Tabela 4 –</b> Grau de inibição à proliferação do <i>Bd</i> com as secreções brutas de anfíbios e análise por reação com MTT.....	27
<b>Tabela 5.</b> Ensaio de inibição do fungo com as frações do veneno de <i>Ameerega flavopicta</i> .....	31
<b>Tabela 6.</b> Ensaio de inibição do fungo com as frações do veneno de <i>Phyllomedusa azurea</i> .....	36
<b>Tabela 7.</b> Ensaio de inibição do fungo com as frações do veneno de <i>Rhinella mirandaribeiroi</i> .....	40
<b>Tabela 8.</b> Relação das massas moleculares dos componentes presentes nas frações cromatográficas de <i>Rhinella mirandaribeiroi</i> .....	41
<b>Tabela 9.</b> Peptídeos com atividade antimicrobiana contra zoósporos de <i>B. dendrobatidis</i> .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACN:** Acetonitrila

**Bd:** *Batrachochytrium dendrobatidis* (*B. dendrobatidis*)

**Da:** Dalton

**C(+):** Controle Positivo

**C(-):** Controle Negativo

**CFU:** Unidade Formadora de Colônia

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DS:** Dermaseptina(s)

**MALDI TOF/TOF:** Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/Time of Flight

**MALDI TOF/MS:** Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/Mass Spectrometry

**MIC:** Concentração Mínima Inibitória

**m/z:** Massa/carga

**MTT:** [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio]

**N/O:** Não observado

**RP-HPLC:** Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography

**PAM:** Peptídeo Antimicrobiano

**pH:** Potencial hidrogeniônico

**PS:** Filoseptina(s)

**TFA:** Trifluoroacetic Acid/Ácido Trifluoroacético

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
EPÍGRAFE.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ix
SUMÁRIO.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – O fungo.....	2
1.2 – A quitridiomycose.....	5
1.3 – Histórico de casos.....	7
1.4 – Princípios ativos da pele de anfíbios.....	12
1.4.1 – Alcaloides.....	13
1.4.2 – Aminas Biogênicas.....	14
1.4.3 – Esteroides.....	15
1.4.4 – Peptídeos Antimicrobianos.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 – Objetivo geral.....	18
3.2 – Metas.....	18
4. MÉTODOS.....	19
4.1 – As secreções cutâneas.....	19

4.2 – Cultivo do fungo.....	19
4.3 – Ensaio da secreção cutânea.....	21
4.4 – Ensaio da viabilidade celular.....	21
4.5 – Ensaio antifúngico das frações isoladas de secreções cutâneas ativas.....	22
4.6 – Caracterização química da fração com atividade antifúngica.....	24
5. RESULTADOS.....	24
5.1 – Secreções brutas.....	24
5.2 – <i>Ameerega flavopicta</i> .....	29
5.2.1 – Ensaio de Viabilidade.....	30
5.3 – <i>Phyllomedusa azurea</i> .....	33
5.3.1 – Ensaio de Viabilidade.....	35
5.4 – <i>Rhinella mirandaribeiroi</i> .....	37
5.4.1 – Ensaio de Viabilidade.....	39
6. DISCUSSÃO.....	42
6.1 – Ensaio com as secreções brutas.....	43
6.2 – <i>Ameerega flavopicta</i> .....	47
6.3 – <i>Phyllomedusa azurea</i> .....	49
6.4 – <i>Rhinella mirandaribeiroi</i> .....	52
6.5 – Resistência e Susceptibilidade.....	55
7. CONCLUSÃO.....	55
8. ANEXO.....	56
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior diversidade de anfíbios do mundo, com 946 espécies descritas (SBH, 2012). Declínios de populações de anfíbios em escala global têm sido registrados desde meados de 1980. Diversos são os fatores contribuintes, quais sejam: uso comercial de anfíbios, novos predadores no ecossistema (espécies introduzidas), destruição de habitats, poluição química, mudanças climáticas e doenças infecciosas (COLLINS, 2010). A quitridiomycose, uma doença infecciosa emergente causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999), está relacionada ao declínio de diversas populações de anfíbios pelo mundo (SPEARE e BERGER, 2000; DASZAK et al., 2003) e segundo POUNDS et al. (2006), a letalidade desse fungo pode aumentar em presença de condições ambientais ideais.

A pele dos anfíbios é um órgão de características fisiológicas complexas, com importantes funções para a preservação da espécie. Suas funções estão relacionadas com a respiração, osmorregulação, excreção, camuflagem, controle da temperatura, reprodução, defesa contra predadores e microrganismos patógenos, como bactérias e fungos (POUGH et al., 1999; CLARKE, 1997). As funções da pele constituem-se fator de extrema importância para a sobrevivência dos anfíbios. É através dela que alterações ambientais são percebidas. Quando a superfície da pele é alterada, coloca o indivíduo em condição de vulnerabilidade a infecções por microrganismos patógenos, tais como fungos. A eficiência normal é alterada na hibernação, onde as funções de defesa operam em um nível mínimo (CLARKE, 1997).

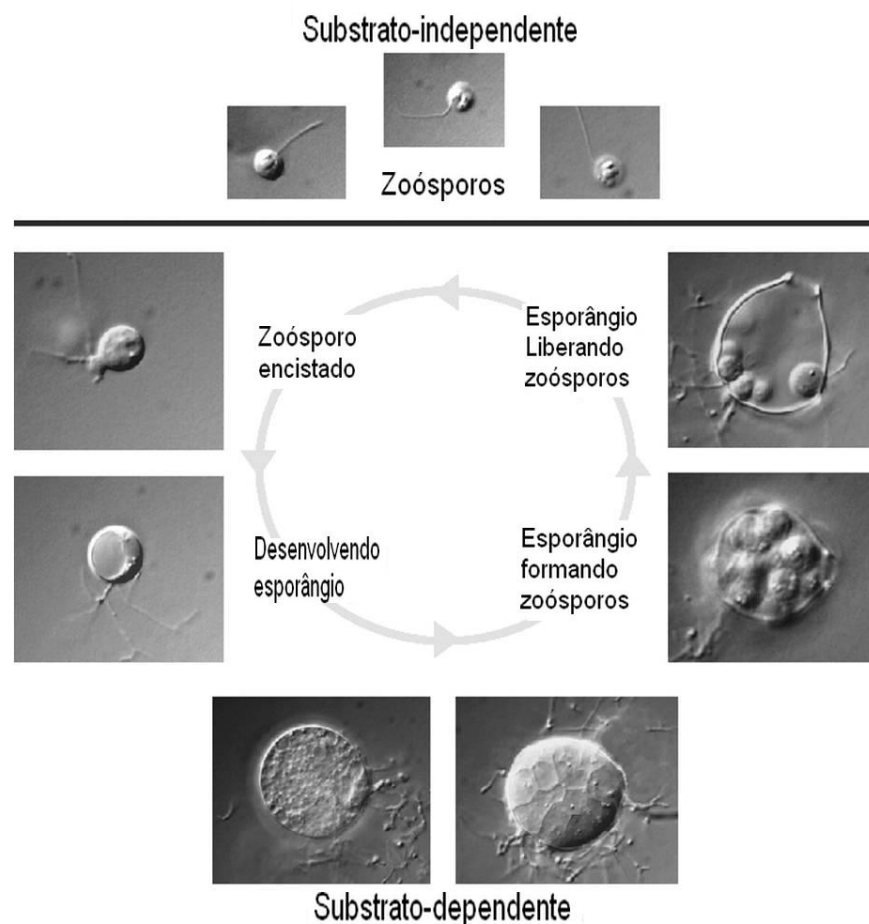
## 1.1. O fungo

O *Batrachochytrium dendrobatidis* é um fungo pertencente ao filo *Chytridiomycota*, classe *Chytridiomycetes* e ordem *Chytridiales* (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999). O fungo foi inicialmente isolado, em 1998, de indivíduos de *Dendrobates azureus*, encontrados mortos no *National Zoological Park, Washington, DC, USA* e foi nomeado seguindo a seguinte etimologia: *Batracho* (do grego = frog); *chytrium* (Ref. ao filo *Chytridiomycota*); *dendrobatidis* (Ref. à espécie na qual o fungo foi primeiramente encontrado e identificado); Recebe ainda a abreviatura “*Bd*” (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999).

O *Bd* alimenta-se de quitina, queratina e celulose. No caso de girinos infectados, o alvo do fungo são as regiões queratinizadas do aparelho bucal. Um estudo conduzido por SYMONDS et al., (2008) foi realizado com vistas à investigação da capacidade de crescimento e a ação queratinolítica do *Bd*. O resultado nos mostra maior crescimento em ágar triptona, seguido de ágar, pele de rã e o mais lento em cozidos de pele de serpente e ágar. Foi perceptível a produção de uma variedade de enzimas proteolíticas que podem ser queratinizantes, incluindo tripsina e quimiotripsina. Estes achados apoiam a predileção deste fungo pela pele de anfíbios, por conter grandes quantidades queratina, proteína que confere aos anfíbios uma pele com certo grau de rigidez e resistencia a lesões (SYMONDS et al., 2008).

Estudos da fisiologia do *Bd*, realizados por PIOTROWSKI et al., (2004), demonstraram que a faixa de temperatura e potencial hidrogeniônico (pH) ideais ao crescimento do fungo são, respectivamente, 4 a 25 C° e 4 - 8. Quanto ao ciclo de vida, o *Bd* é diploide e se reproduz de forma assexuada, apresentando zoósporos

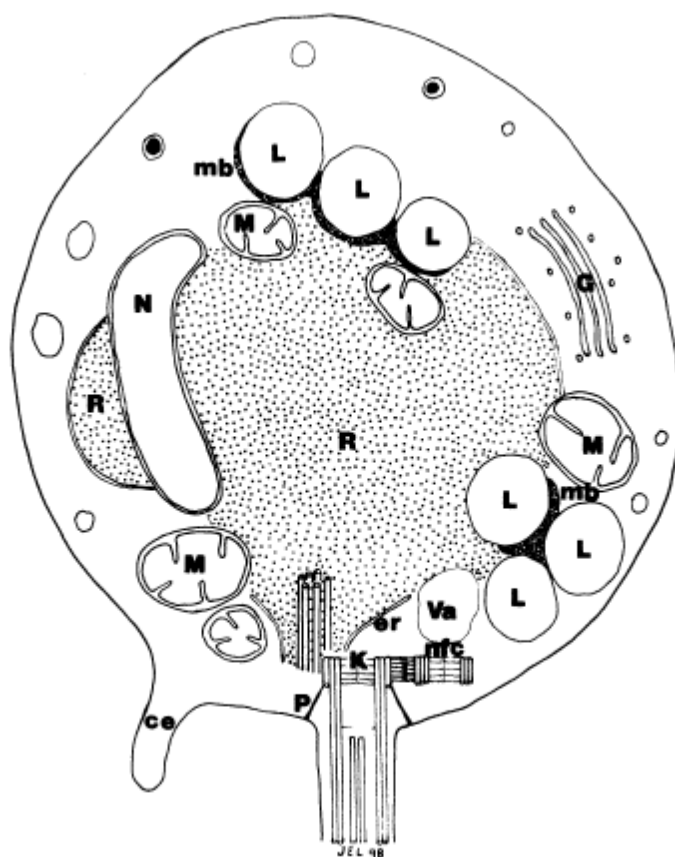
reprodutores móveis, nas formas ovoides que vivem na água ou lama e conseguem penetrar na pele do anfíbio. Ao aderir-se à pele do anfíbio o zoósporo amadurece, sofre processo de encistamento ou enquistamento, no qual o zoósporo se encapsula e inicia a formação de estruturas ramificadas, denominadas hifas, que se estendem pela pele, formando por fim, um corpo reprodutor esférico, o zoosporângio, que no futuro sofrerá ruptura que provocará a liberação dos novos zoósporos. Cada zoosporângio ( $5,2 \pm 0,72 \mu\text{m}^3$ ) produz um tubo de descarga única, que atravessa a pele e libera zoósporos maduros (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999). O ciclo de vida do *Bd* é ilustrado na figura 1.



**Figura 1.** O ciclo de vida do *Bd*. Na porção substrato-independente do ciclo, os zoósporos flagelados são livres nadantes. Na porção substrato-dependente, os zoósporos se encistam e se desenvolvem em esporângios, que produzem e liberam novos zoósporos. Fonte: Rosenblum et al., 2008; PNAS, 105:17034-17039.



Os zoósporos (3-5 µm de diâmetro) são de forma oval e tem um único flagelo posterior (19-20 µm de comprimento), o que lhe permite mover-se em superfície aquosa. Há pouca diferença morfológica em cepas de *B. dendrobatidis* e todas as cepas são patogênicas (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999). A Figura 2 representa o desenho de uma secção longitudinal de zoosporo do *B. dendrobatidis* e a organização das organelas.



**Figura 2.** Diagrama resumo de zoósporo flagelado e área cinetossomal ampliada. Abreviações: **ce:** extensão citoplasmática; **ER:** retículo endoplasmático; **G:** aparelho de Golgi; **K:** cinetossomo; **L:** glóbulo de lipídios; **M:** mitocôndria; **mb:** microcorpúsculo lipídico; **nfc:** centríolo não funcional; **N:** núcleo; **P:** propulsor; **Va:** vacúolo. As organelas que circundam a massa ribossomal e as extensões citoplasmáticas não são consistentemente encontradas em nenhuma parte particular da célula. Fonte: LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999. Mycologia, 91:219-227.

O desenho é baseado no exame de seções finas de zoósporos dentro do esporângio por microscopia eletrônica de transmissão (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999).

Quanto à sobrevivência do *Bd* em água, JOHNSON e SPEARE (2003) demonstraram a viabilidade dos zoósporos em três diferentes tipos de água: água de torneira, água deionizada e água natural do lago de um subúrbio de Hyde Park-UK. As amostras de água foram autoclavadas a 121 C°, por 15 minutos. Os dados (tabela 1) mostram que os zoósporos mantiveram-se viáveis de três a seis semanas, a depender do meio aquoso em que se encontravam e ainda, da quantidade de nutrientes naturalmente disponíveis na água. A água natural de lago apresentou uma maior quantidade de nutrientes ao fungo (JOHNSON e SPEARE, 2003).

**Tabela 1.** Viabilidade do fungo em diferentes tipos de água. Duração do crescimento em água: 1 semana; Liberação do zoósporo: somente em água de lago, entre a segunda e sétima semanas; Duração da Viabilidade: Zoósporo cultivado em caldo TGhL + injeção de água, dos três tipos, em separado;

	Água torneira	Água deionizada	Água de Lago
Duração do crescimento em água*	1 semana	1 semana	1 semana
Liberação dos zoósporos	n/o	n/o	Sim – Semana 2-7
Duração da viabilidade**	3 semanas	3 semanas	6 semanas

\* Crescimento: Zoósporo se liga a um frasco plástico e desenvolve-se em zoosporângio.

\*\* Viabilidade: Crescimento ocorrente, quando alíquotas de água são injetadas em caldo TGhL.

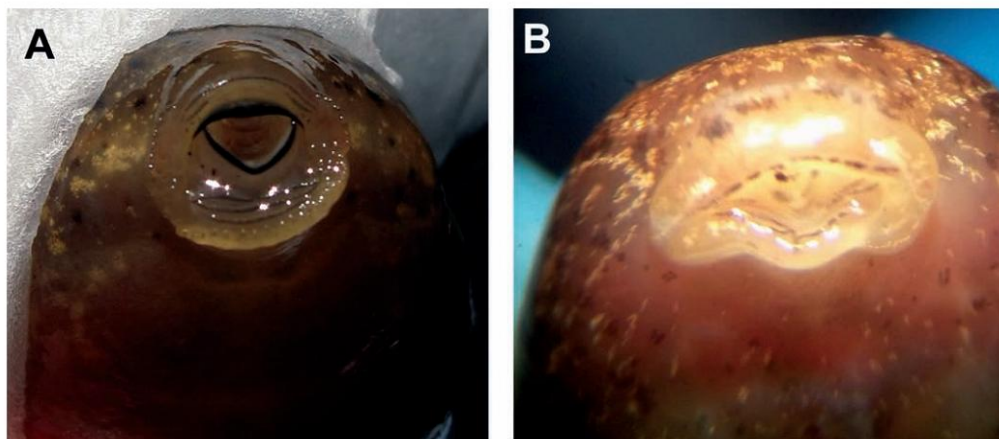
Fonte: JOHNSON, M. L., and SPEARE, R., 2003. "Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water.

## 1.2. A quitridiomicose

A infecção por *Bd* ocorre no interior das células das camadas exteriores da pele. Quando está infectada com quitridiomicose, a pele torna-se muito espessa devido a alterações celulares chamadas de hiperplasia, ou seja, a proliferação celular desordenada e hiperqueratose, um aumento da rigidez da pele, provocada pelo aumento de queratina nas células. Estas alterações na pele são fatais para os anfíbios, devido ao fato de que anfíbios absorvem sais minerais importantes (eletrólitos), tais como o sódio e o potássio através da pele. Os níveis anormais de eletrólitos resultantes da pele danificada pelo *Bd* provocam distúrbios fisiológicos severos, levando o animal ao óbito (VOYLES et al., 2009).

O zoósporo, estágio móvel do *Bd*, infecta as células epiteliais queratinizadas de anfíbios adultos, partes queratinizadas da boca de girinos (figura 3-B) e não infecta as partes não queratinizadas da pele de larvas (BERGER et al., 1998; BLAUSTEIN et al., 2005). A susceptibilidade à quitridiomycose e a gravidade das lesões epidérmicas em anfíbios acometidos não são consistentes entre espécies ou mesmo entre indivíduos (DAVIDSON et al., 2003; HANSELMANN et al., 2004; LAMIRANDE e NICHOLS, 2002). O fungo desenvolve-se, inicialmente, colonizando células vivas; Os talos colonizam o interior das células, parasitando-as até o amadurecimento, mas desenvolvem-se completamente como zoosporângios na superfície queratinizada de células mortas e sem organelas. Os tubos de descarga dos zoosporângios são hábeis em fundir e dissolver as membranas das células epidérmicas projetando-se para a superfície. A distribuição dos esporângios em girinos e adultos mostra que uma epiderme estratificada e queratinizada é imprescindível ao *Bd* quando ocorre uma infecção (BERGER et al., 1998; MARANTELLI et al., 2004). O mecanismo pelo qual o *Bd* provoca a morte de animais sensíveis, além dos distúrbios das funções normais da pele, pode ser a liberação de uma toxina fúngica (BERGER et al., 1998, 2005a.; VOYLES et al., 2009). O desenvolvimento de lesões da pele coincide com uma redução da atividade de canais iônicos epidérmicos (VOYLES et al., 2009) e um aumento da expressão do gene de queratina tipo I e dos genes envolvidos na reparação da pele (ROSENBLUM et al., 2009). ROSENBLUM et al. (2008) relataram a expressão de genes que codificam proteases em *Bd*, o que pode apoiar a hipótese da atividade de uma toxina fúngica no desenvolvimento de lesões na pele. No Brasil, três diferentes cepas do *Bd* já foram genotipadas, com diferentes fatores de virulência (SCHLOEGEL et al. 2012, VIEIRA et al. 2012), o que sugere ainda a hipótese de

diferenças de susceptibilidade, resistência e grau das lesões, associadas também ao fator de virulência da cepa que acomete a população.



**Figura 3.** Aparato Bucal de girino *L.catesbeianus* saudável (A); Aparato bucal de girino *Hylodes* sp., infectado por *B. dendrobatidis*. Foto: Lambertini et al. (2013).

### 1.3. Histórico de casos

PARRIS (2006) sugere que mais de um terço das espécies descritas de anfíbios estão em risco de queda populacional. Atualmente os anfíbios são considerados como o grupo de vertebrados com maior risco de extinção, devido a uma série de fatores como: mudanças climáticas, aumento da incidência de raios ultravioletas, poluição e o crescimento de espécies invasoras, todavia, a infecção por fungo quitrídio é considerada a mais grave e de rápida ação (SKERRATT et al., 2008). A quitridiomiose está dizimando populações inteiras de algumas espécies de anuros (SILVANO e SEGALLA, 2005), principalmente nas Américas, Oceania e Europa (FONSECA, 2008). Populações de anuros do gênero *Atelopus* (Bufonidae) (LAMPO, 2007) e os sapo-flecha (Dendrobatidae), vêm sofrendo severas perdas de indivíduos na América Central. Na Austrália, algumas espécies de pererecas do gênero *Litoria* (Hylidae) (KRIGER, et al. 2007), *Rheobatrachus silus* (LIEM,1973) e *Rheobatrachus vitellinus* (MAHONY, TYLER e DAVIES,1984), parecem, no entanto,

terem sido dizimadas pelo fungo. Toledo (2006) relatou que as espécies de rãs do gênero *Leptodactylus* não apresentaram a infecção. *Leptodactylus fallax* parece ser também imune à infecção (GARCIA et al., 2007). CARNAVAL et al. (2006) demonstrou que em 41 espécies de anfíbios brasileiros houve infecção por *Bd* confirmadas e que tais espécies estão restritas a áreas de Mata Atlântica, nas regiões Sul e Sudeste. LISBOA et al. (2013) revelou casos de infecção por *Bd* em *Aplastodiscus sibilatus* (CRUZ, PIMENTA e SILVANO, 2003) e *Hypsiboas freicanecae* (CARNAVAL e PEIXOTO, 2004), registrados no Estado de Alagoas, diagnosticados em girinos, por análise histológica de partes queratinizadas da boca. Este é o primeiro registro de infecção por *Bd* em *A. sibilatus* (LISBOA et al., 2013). Em todo o mundo, em mais de 200 espécies de anfíbios, foram identificadas infecção por *B. dendrobatidis* (SKERRATT et al., 2008).

No Brasil, poucos casos de declínio de anfíbios foram publicados até o momento (HEYER et al., 1988; WEYGOLDT, 1989; BERTOLUCI & HEYER, 1995; GUIX et al., 1998; POMBAL & HADDAD, 1999; IZECKSOHN & CARVALHO E SILVA, 2001; ETEROVICK et al., 2005). A maior parte dos relatos de declínio provém da Mata Atlântica, um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade (MYERS et al., 2000). Foi registrada a presença de *Batrachochytrium dendrobatidis* em sete, dos 27 estados brasileiros, incluindo Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, e São Paulo (TOLEDO et al. 2006). VIEIRA et al. (2012) apresenta um trabalho mais recente de presença e infecção de *Hylodes cardosoi* (LINGNAU, CANEDO & POMBAL, 2008) e *Hypsiboas faber* (FAIVOVICH et al., 2005) em Morretes, Paraná. TOLEDO (2006) contribui ainda com dados originais da distribuição de *B. dendrobatidis* no Brasil, fazendo uma revisão do conhecimento das espécies infectadas na América do Sul. Seu

levantamento aponta que a doença foi detectada na rã-de-corredeira, *Hylodes magalhaesi* (BOKERMANN, 1964), espécie que ocorre em regiões elevadas de Mata Atlântica. Em um estudo de modelagem, RON (2005) prediz expansão do fungo para as regiões de Cerrado e Pantanal.

A tabela 2 relaciona algumas das espécies de anfíbios analisadas para verificação da ocorrência de *Bd* com sua localidade e o tipo de detecção.

**Tabela 2.** Espécies de anfíbios analisados para ausência ou presença de *Batrachochytrium dendrobatidis* relacionando estágio de vida, metodologia de detecção e localidade. (S= Indivíduos que apresentaram infecção por *Bd*; N= Indivíduos que não apresentaram infecção por *Bd*).

Família	Gênero	Espécie	Infecção	Estágio	Metodologia	Localidade	Referência
<i>Ambystomatidae</i>	<i>Ambystoma</i>	<i>A. californiense</i>	S	Adultos/girinos	Histologia/PCR	Califórnia – USA	Padgett-Flohr & Hopkins (2008)
		<i>A. tigrinum</i>	S			Ohio – USA	Sheafor (2008)
<i>Brachycephalidae</i>	<i>Ischnocnema</i>	<i>Ischnocnema</i> sp.	S	Adultos	PCR	Boracéia (SP)	Burke (2011)
		<i>I. randorum</i>					
		<i>I. guentheri</i>	N				
		<i>I. juipoca</i>					
		<i>I. parva</i>					
<i>Bufo</i>	<i>Anaxyrus</i>	<i>A. boreas</i>	S	Adultos/girinos	Histologia	Wisconsin – USA	Pearl et al. (2007)
	<i>Atelopus</i>	<i>A. chiriquiensis</i>	S	Não informado no artigo		Las Tablas – Costa Rica	La Marca et al. (2005)
		<i>A. coynei</i>				Río Faisanes – Equador	
		<i>A. ignescens</i>				Páramo de Guamaní – Equador	
		<i>A. ignescens</i>				Páramo Del Antisana – Equador	
		<i>A. longirostris</i>				Río Faisanes – Equador	
		<i>A. mindoensis</i>				Quebrada Zapadores – Equador	
		<i>A. mucubaliensis</i>				La Corcovada – Venezuela	
		<i>A. planispina</i>				Río Azuela – Equador	
		<i>A. pinangoi</i>				Piñango – Venezuela	
		<i>A. varius</i>				Río Lagarto headwaters – Costa Rica	
	<i>Chaunus</i>	<i>C. ictericus</i>	N	Girinos	Histologia/PCR	Jundiá (SP)	Toledo et

		<i>C. ornatus</i>			CR		al. (2006)	
		<i>C. rubescens</i>				S. Roque de Minas (MG)		
	<i>Bufo</i>	<i>B. valliceps</i>						
<i>Caugastoridae</i>	<i>Craugastor</i>	<i>C. charadra</i>	N	Adultos	PCR	Honduras	Kolby et al. (2009)	
		<i>C. coffeus</i>	S					
		<i>C. rostralis</i>						
	<i>Eleutherodactylus</i>	<i>E. leavissimus</i>	N					
<i>Centronelidae</i>	<i>Hyalinobatrachium</i>	<i>H. fleischimanni</i>						
<i>Cycloramphidae</i>	<i>Proceratophrys</i>	<i>P. boiei</i>	N	Girinos	Histologia/PCR	Trevisco (SC)	Toledo et al. (2006)	
	<i>Thoropa</i>	<i>T. taophora</i>	S			Ubatuba (SP)		
<i>Dendrobatidae</i>	<i>Dendrobates</i>	<i>D. tinctorius</i>	S	Adultos/girinos	PCR	Washington – USA	Morgan et al. (2007)	
<i>Dermophiidae</i>	<i>Geotrypetes</i>	<i>G. seraphini</i>	S	Adultos	Histologia / PCR	Camarões – África	ZSL (2013)	
<i>Hylidae</i>	<i>Hypsiboas</i>	<i>H. polytaenius</i>	S	Adultos	PCR	Boracéia (SP)	Burke (2011)	
		<i>H. bischoffi</i>						
		<i>H. faber</i>						
					Girinos	Histologia/PCR	Morretes (PR)	Vieira et al. (2012)
			<i>H. albopunctata</i>	S	Girinos	Histologia/PCR	Rio Claro (SP)	Toledo et al. (2006)
		<i>H. semilineatus</i>						
		<i>S. albicans</i>						
		<i>Scinax</i>	<i>S. alter</i>	S				
			<i>S. hayii</i>	N	Adultos	PCR	Boracéia (SP)	Burke (2011)
		<i>S. crospeodofilus</i>						
		<i>B. astartea</i>						
		<i>Bokermannohyla</i>	<i>B. circundata</i>	S	Girinos	Histologia/PCR	Petrópolis (RJ)	Toledo et al. (2006)
			<i>B. circundata</i>					
			<i>B. hylax</i>					
			<i>A. arildae</i>	S	Adultos	PCR	Boracéia (SP)	Burke (2011)
	<i>A. albosignatus</i>	N						
	<i>Aplastodiscus</i>	<i>A. callipygius</i>	S	Girinos	Histologia/PCR	Camanducaia (MG)	Toledo et al. (2006)	
		<i>A. leucopygius</i>	S	Adultos	PCR	Boracéia (SP)	Burke (2011)	
		<i>A. leucopygius</i>	S	Girinos	Histologia/PCR	S. Luiz do Paraitinga (SP)	Toledo et al. (2006)	
		<i>Dendropsophus</i>	<i>D. minutus</i>	S	Adultos	PCR	Boracéia (SP)	Burke (2011)
	<i>Hyla</i>	<i>H. arenicolor</i>	S	Adultos/Girinos	Histologia	Arizona (USA)	Bradley (2002)	
	<i>Litoria</i>	<i>L. chloris</i>	S	---	---	Austrália	Longcore et al.	

							(1999)
	<i>Phrynomedusa</i>	<i>P. cf. marginata</i>	S	Girinos	Histologia/PCR	S. Luiz do Paraitinga (SP)	Toledo et al. (2006)
	<i>Pseudacris</i>	<i>P. regilla</i>	S	Adultos/girinos	Histologia	Wisconsin (USA)	Pearl et al. (2007)
<i>Hylodidae</i>	<i>Hylodes</i>	<i>H. cardosoi</i>	S	Girinos	Histologia/PCR	Morretes (PR)	Toledo et al. (2006)
		<i>H. dactylocinus</i>				Peruíbe (SP)	
		<i>H. magalhaesi</i>				Camanducaia (MG)	
		<i>H. meridionalis</i>				LauroMüller (SC)	
		<i>H. meridionalis</i>				S. Fco de Paula (RS)	
		<i>H. perplicatus</i>				S. Bento do Sul (SC)	
		<i>H. phyllodes</i>				S. Luiz do Paraitinga (SP)	
		<i>Hylodes</i> sp. (aff. Sazimai)					
	<i>H. asper</i>	S	Adultos	PCR	Boracéia (SP)	Burke (2011)	
	<i>Megaelosia</i>	<i>M. cf. boticariana</i>	S	Girinos	Histologia/PCR	Caçapava (SP)	Toledo et al. (2006)
		<i>M. goeldii</i>	N			Teresópolis (RJ)	
		<i>M. massarii</i>	S			Santo André (SP)	
		<i>Megaelosia</i> sp.	N			Pindamonhangaba (SP)	
<i>Leiuperidae</i>	<i>Adenomera</i>	<i>A. marmorata</i>	N	Adultos	PCR	Boracéia (SP)	Burke (2011)
	<i>Physalaemus</i>	<i>P. cardosi</i>					
	<i>Paratelmatobius</i>	<i>P. cuvieri</i>					
<i>Leptodactylidae</i>	<i>Leptodactylus</i>	<i>L. labyrinthicus</i>	N	Girinos	Histologia/PCR	Rio Claro (SP)	Toledo et al. (2006)
		<i>L. latrans</i>	N	Adultos	PCR	Boracéia (SP)	Burke (2011)
		<i>L. chaquensis</i>	N	Girinos	Histologia/PCR	Corumbá (MS)	Toledo et al. (2006)
		<i>L. podicipinus</i>					
<i>Microhylidae</i>	<i>Chiasmocleis</i>	<i>C. leucosticta</i>	N	Girinos	Histologia/PCR	Ribeirão Branco (SP)	Toledo et al. (2006)
	<i>Elaschistocleis</i>	<i>E. ovalis</i>				Rio Claro (SP)	
<i>Myobranchidae</i>	<i>Rheobatrachus</i>	<i>R. Silus</i>	EXTINTOS – Provável infecção por Bd			Austrália	Longcore et al. (1999)
		<i>R. vitellinus</i>					
	<i>Pseudophryne</i>	<i>P. corroboree</i>	S	---	---		Kilpatrick (2009)
	<i>Limnodynastes</i>	<i>L. dumerilli</i>	S	Adultos/girinos	PCR		Morgan et al. (2007)
<i>Pipidae</i>	<i>Xenopus</i>	<i>X. tropicalis</i>				Ghana	



		<i>X. leavis</i>				South Africa	
<i>Plethodontidae</i>	<i>Bolitoglossa</i>	<i>B. conanti</i>	N	Adultos	PCR	Honduras	Kolby et al. (2009)
		<i>B. diaphora</i>					
	<i>Cryptotriton</i>	<i>C. nasalis</i>					
	<i>Oedipina</i>	<i>O. tomasi</i>					
<i>Ranidae</i>	<i>Lithobates</i>	<i>L. castebeianus</i>	N	Girinos	Histologia/PCR	S. Luiz do Paraitinga (SP)	Toledo et al. (2006)
		<i>L. castebeianus</i>				Jaboticabal (SP)	
		<i>L. maculata</i>	S	Adultos	PCR	Honduras	Kolby et al. (2009)
	<i>Rana</i>	<i>R. yavapaiensis</i>	S	Adultos/girinos	Histologia	Arizona (USA)	Bradley (2002)
		<i>R. chiricaueensis</i>					
		<i>R. aurora</i>	S	Girinos	Histologia	Califórnia (USA)	Nieto et al. (2007)
		<i>R. boylei</i>	S	Adultos/girinos	Histologia/PCR	Califórnia (USA)	Padgett-Flohr & Hopkins (2008)
		<i>R. cascadae</i>	S	Adultos/girinos	Histologia	Wisconsin (USA)	Pearl et al. (2007)
		<i>R. draytonii</i>	S	Adultos/girinos	Histologia/PCR	Califórnia (USA)	Padgett-Flohr & Hopkins (2008)
		<i>R. luteiventris</i>	S				
		<i>R. muscosa</i>	S	Girinos	Histologia	Califórnia (USA)	Rachowks et al. (2006)
		<i>R. pretiosa</i>	S	Adultos	Histologia/PCR	Washington (USA)	Hayes et al. (2009)
		<i>R. sierrae</i>	S	Adultos/girinos	PCR	Califórnia (USA)	Morgan et al. (2007)

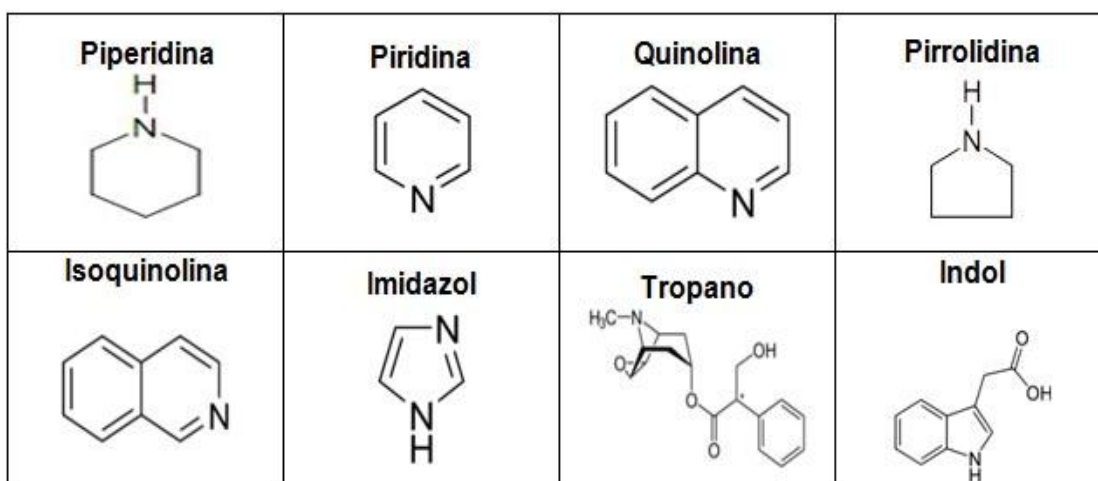
#### 1.4. Princípios ativos da pele de anfíbios

Os anfíbios apresentam, em sua pele, glândulas de dois tipos: mucosas e de veneno. As glândulas mucosas, menores que as de veneno, são distribuídas por todo o corpo do animal e atuam na manutenção da pele, preservando a umidade e propiciando o correto funcionamento das condições fisiológicas da pele do animal, por exemplo, a respiração cutânea. As glândulas de veneno são de origem epitelial, possuem estrutura alveolar e são compostas por células granulares organizadas ao redor de um ducto, associadas a células mioepiteliais dotadas de inervações, o que

permite a liberação dos seus compostos produzidos em situações de estresse ou por compressão mecânica provocada por fatores externos como, por exemplo, a ação de predadores (TOLEDO e JARED, 1995).

As glândulas de veneno são as responsáveis pela produção e armazenamento dos compostos bioativos que são utilizados pelos anfíbios na proteção passiva contra predadores, e na defesa ativa contra agentes patogênicos, tais como bactérias, fungos e protozoários. Quimicamente, esses compostos podem ser divididos em quatro classes: alcaloides, aminas biogênicas, esteroides e peptídeos (DALY et al., 1987; ERSPAMER, 1994; CLARKE, 1997).

#### 1.4.1. Alcaloides

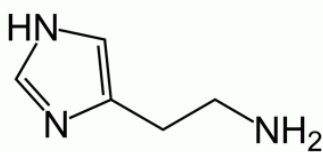


**Figura 4.** Estrutura química básica de alcaloides. Fonte: <http://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2011/05/alcaloides1.jpg>

Os alcaloides são definidos como compostos contendo nitrogênio cíclico, com uma distribuição limitada na natureza. Entre os anfíbios, os alcaloides são encontrados principalmente no veneno das rãs da família *Dendrobatidae* e *Phylllobates*, mas também podem ser encontrados em salamandras, tritões, sapos e outras espécies de rãs. Quanto à atividade farmacológica de alguns alcaloides, podemos citar: Batracotoxinas – encontrada em anfíbios do gênero *Phylllobates*,

considerada a mais potente toxina não proteica descrita (DALY et al., 1987). A batracotoxina promove abertura dos canais para sódio voltagem-dependentes de nervo e músculo, provocando despolarização irreversível das membranas de nervo e músculo, devido a um grande influxo de sódio (SCHWARTZ et al., 2007); Pumiliotoxinas – Toxina encontrada em dendrobatídeos, atua potencializando e prolongando contrações da musculatura esquelética em anfíbios, mamíferos e aves, de forma reversível; Histrionicotoxinas – Também encontrada nos dendrobatídeos, apresenta toxicidade em mamíferos, atuando em canais para potássio voltagem-dependentes de nervo e músculo, reduzindo sua condutividade e bloqueando o receptor nicotínico da junção neuro muscular (MALEQUE, 1984 *apud* SCHWARTZ et al., 2007); Epibatidina – Isolada de *Epipedobates tricolor*, é um alcaloide considerado como potente analgésico. Muitos alcalóides são derivados de insetos, ácaros e milípedes, e incorporados à fisiologia do anfíbio a partir da dieta (DALY et al., 1987; LAZARUS & ATTILA, 1994; DALY, 1995; CALDWELL, 1996).

#### 1.4.2. Aminas biogênicas

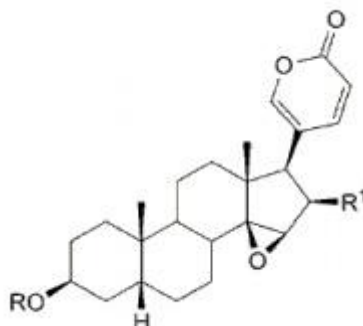


**Figura 5.** Estrutura química de um dos tipos de aminas biogênicas encontradas em anfíbios, a histamina. Fonte: <http://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2010/03/histamina-300x146.png>.

As aminas biogênicas, diferente dos demais compostos bioativos encontrados na pele de anfíbios, têm ampla distribuição entre representantes de diversas famílias, tendo sido identificadas em diversos trabalhos e sua estrutura química e farmacológica elucidadas. As aminas encontradas na pele de anfíbios são classificadas em quatro grupos caracterizados principalmente pela descarboxilação

de aminoácidos: Indolaquilaminas, imidazolalquilaminas, monohidroxi-fenilalquilaminas e catecolaminas (SCHWARTZ et al., 2007). Algumas espécies da família Bufonidae apresentam aminas biogênicas na composição de seus venenos, particularmente presentes em indivíduos do gênero *Bufo* e *Rhinella*. A atividade farmacológica mais comum de aminas indólicas é a estimulação em musculatura lisa e ainda, irritação de mucosas (ERPASMER, 1971).

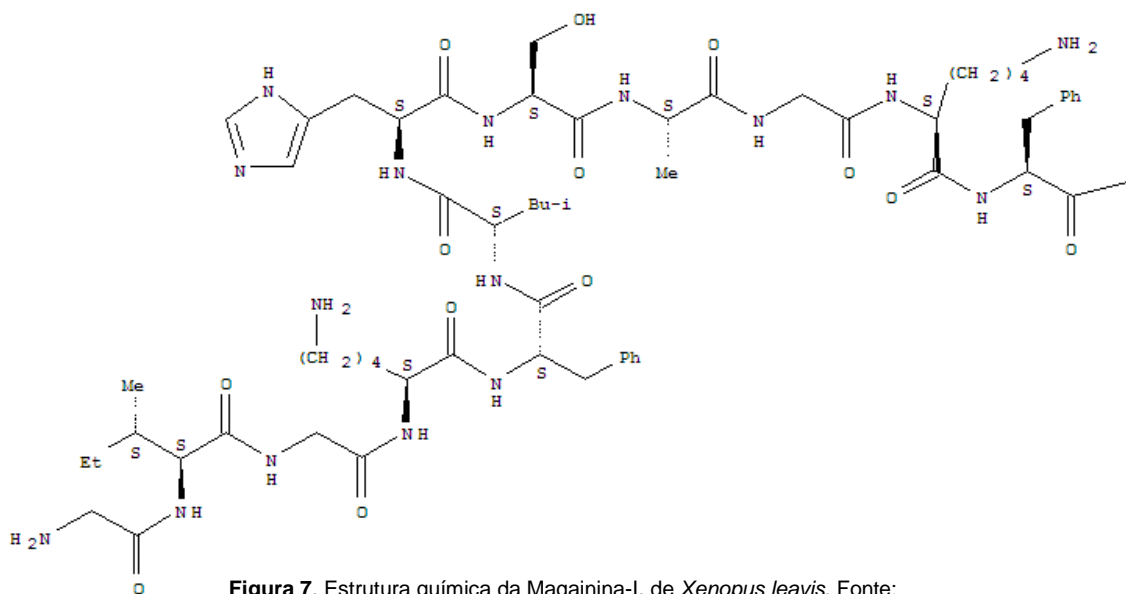
### 1.4.3. Esteroides



**Figura 6** – Estrutura básica de Bufadienólídeos. Fonte: [http://www.ufpi.br/arquivos/Image/Imagens/Fotos%20Segundo%20Semestre%202013/Estrutura\\_Bufadienolideo.jpg](http://www.ufpi.br/arquivos/Image/Imagens/Fotos%20Segundo%20Semestre%202013/Estrutura_Bufadienolideo.jpg)

Os bufadienólídeos são esteroides encontrados em venenos de anuros da família Bufonidae e são representados por dois grupos: as bufogeninas, também denominadas bufaginas e as bufotoxinas, que são formadas da união da suberil-arginina com bufogeninas. As bufogeninas constituem uma família de substâncias heterocíclicas que inibem a bomba de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  e possuem ação cardiotóxica. (LAZARUS et al., 1994); Alguns bufadienólídeos possuem ação antitumoral (NOGAWA et al., 2001). CUNHA FILHO et al., (2005) descrevem a ação antimicrobiana dos esteroides marinobufagenina e telocinobufagina, isolados de *Rhinella rubescens*. Indivíduos do gênero *Rhinella* apresentam grande quantidade de esteroides na composição de seus venenos (CUNHA FILHO et al., 2005).

### 1.4.4. Peptídeos antimicrobianos



**Figura 7.** Estrutura química da Magainina-I, de *Xenopus laevis*. Fonte: <http://img1.guidechem.com/chem/e/dict/152/108433-99-4.jpg>

Peptídeos antimicrobianos (PAM's) são produzidos por diversos grupos de animais e vegetais há milhares de anos (NICOLAS & MOR, 1995). A produção de PAM's em anuros participa do sistema imune inato do indivíduo, um mecanismo essencial de defesa em organismos multicelulares, que tem por função agir como a primeira barreira de proteção contra o ataque e proliferação de microrganismos patogênicos (BROWN & HANCOCK, 2006). O primeiro estudo sobre PAM's, caracterizados a partir da secreção cutânea de anfíbios foi realizado em 1987, por Zasloff, que, estudando a espécie *Xenopus laevis*, isolou, caracterizou e determinou a atividade antimicrobiana de dois peptídeos nomeados *Magainina 1* e *Magainina 2*, detentoras de uma ampla atividade contra fungos, bactérias e protozoários (BARRA & SIMMACO, 1995; RINALDI, 2002; NASCIMENTO et al., 2003). As magaininas de *Xenopus* e as dermaseptinas de *Phyllomedusa* são peptídeos lineares e anfipáticos que formam hélices e tem ação comprovada contra bactérias, fungos e protozoários (MOR at al., 1994).

A primeira dermaseptina (DS) foi descrita em 1991 e foi nomeada devido a sua origem: Derma (derme do anfíbio *P. sauvagei*); Septina, por sua atividade biológica contra fungos patogênicos, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (MOR et al., 1991). Posteriormente, outros trabalhos demonstraram atividade das DS contra protozoários e vírus (KRUGLIAK et al., 2000; LORIN et al., 2005).

A maioria dos PAM's são moléculas alifáticas e tendem a assumir conformações anfífilas em  $\alpha$ -hélice, mostrando uma separação bem definida entre domínios hidrofóbicos e hidrofílicos (MOR et al., 1991; LEITE et al., 2007). Este tipo de conformação parece estar ligado à sua atividade antimicrobiana (MOR et al., 1994). As filoseptinas (PS) constituem outra família de peptídeos antimicrobianos somente encontrados, até o momento, na secreção cutânea de anfíbios dos gêneros *Phyllomedusa* e *Hylomantis* (LEITE et al., 2005; CHEN et al., 2006; CONLON et al., 2007). As PS possuem em geral 19-20 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária e, assim como as DS, parecem assumir conformações anfífilas. Peptídeos desta família possuem ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, assim como contra protozoários (LEITE et al., 2005).

## **2. JUSTIFICATIVA**

A secreção cutânea de anfíbios é uma rica fonte de novas moléculas farmacologicamente ativas. Tais moléculas são também importantes no entendimento de como esse grupo evoluiu e se adaptou às diferentes pressões seletivas existentes no meio onde se encontram, visto que ajudam esses animais na defesa contra parasitas e predadores.

Até o momento existem poucos estudos que relacionam a resistência à quitridiomicose com defesa inata, ou seja, a produção de componentes bioativos produzidos na pele de anfíbios. ROLLINS-SMITH et al., (2002 e 2005) e CONLON (2011), trabalhando com peptídeos sintéticos de anfíbios anuros, já demonstraram sua potencialidade na inibição à proliferação do *B. dendrobatidis*, todavia não relacionaram o sinergismo dos diversos componentes presentes nas secreções cutâneas, na atividade inibitória.

Submeter amostras de *B. dendrobatidis* a ensaios com secreção bruta de anfíbios, para análise de viabilidade do fungo, permite explorar a atividade da secreção dos anfíbios contra o patógeno, levando-se em conta toda a composição da secreção, atuando de forma sinérgica com os compostos bioativos nelas presentes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

O presente estudo teve como objetivo verificar através de ensaio *in vitro* a suscetibilidade ou resistência de anfíbios anuros do Cerrado ao fungo *B. dendrobatidis*, com base na atividade antimicrobiana da secreção cutânea de anfíbios adultos.

#### **3.2. Metas**

- 1) Testar *in vitro* a viabilidade do fungo *B. dendrobatidis* em presença da secreção cutânea dos anfíbios do Cerrado.
- 2) Relacionar a defesa inata dos anfíbios com a capacidade de resistência contra a quitridiomicose, indicando quais secreções foram capazes de inibir a

proliferação do fungo e identificar dentre os anfíbios testados, aqueles suscetíveis a essa infecção.

- 3) Purificar as frações das secreções que apresentaram atividade inibitória à proliferação do *Bd* e submetê-las aos ensaios, com vistas a possibilitar a identificação dos compostos bioativos contra o *Bd*.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. As secreções cutâneas:

Foram utilizadas as secreções de 23 espécies de anfíbios anuros das famílias **Bufonidae, Cycloramphidae, Dendrobatidae, Hylidae, Leiuperidae, Microhylidae Ranidae** e de 1 (um) indivíduo da ordem Gymnophiona, família **Caeciliidae**, extraídas e manipuladas seguindo-se os Princípios Éticos na Experimentação Animal - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991), o Guiding Principles for Research Involving Animals e Human Beings - Sociedade de Fisiologia Americana (APS, 2000), Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals (ZIMMERMANN, 1983) e aprovação do Ministério do Meio Ambiente – MMA e Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade – ICMBio, sob registro 41555-1.

### 4.2. Cultivo do fungo:

A cepa do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* foi fornecida pelo Prof. Dr. Luís Felipe Toledo, Prof. Dr. Domingos da Silva Leite e Mestranda Carolina Lambertini, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com o seguinte registro:

STRAIN- CLFT 024



LOCALITY - Estrada da Graciosa

MUNICIPALITY - Morretes

STATE - Paraná

S: 25.35899

W: 48.87857

HOST: *Hylodes cardosoi*

STAGE: Girino

TYPE: Híbrido (classificação filogenética)

COLLECTING DATE: 26/03/2011

ISOLATION DATE: 01/04/2011

FIELD COLECTOR: L.F. Toledo, C.A. Vieira, C.H.L.N Almeida

"ISOLATOR": C.A. Vieira, D. Moraes

\*\*\*\* O gênero *Hylodes* é comum em riachos, sendo popularmente chamado de "rã-de-corredeira".

A cepa do fungo foi cultivada em meio de cultura mTGh, contendo triptona a 1%, ágar bacteriológico 1% e antibiótico (Para 1 L de água deionizada, 10 g triptona e 10 g ágar bacteriológico) e meio líquido, caldo 1% triptona (1 L água deionizada e 10 g triptona); não é necessário o ajuste do pH. Após o preparo, os meios de cultura foram autoclavados à temperatura de 121°C por 20 minutos e, após seu resfriamento, foram adicionados antibióticos (200 mg/L penicilina-G, 300 mg/L estreptomicina) (VIEIRA & TOLEDO, 2011). Os frascos contendo os meios de cultura e replique das cepas foram mantidos em Incubadora B.O.D., modelo CT-705-120-Cientec, refrigerados à temperatura média de 13°C. Para manutenção da cultura foram realizadas replicadas em intervalos de 20 dias e todo material utilizado foi autoclavado antes do descarte apropriado. As colônias do *Bd* foram constantemente monitoradas durante os ensaios de viabilidade, por observação no microscópio de luz.

### **4.3. Ensaio antifúngico da secreção cutânea:**

As secreções cutâneas dos anfíbios foram obtidas por eletroestimulação branda dos animais, lavagem da pele com água destilada para coleta das amostras, que, após coletadas foram congeladas e em seguida liofilizadas e mantidas estocadas em freezer. As alíquotas 10 mg das secreções cutâneas liofilizadas, pesadas em microbalança Shimadzu, modelo AUW220D, foram ressuspendidas em 1 ml de água Milli-Q. As colônias do *Bd* cultivadas em meio sólido foram transferidas do meio mTGh em 7 ml de caldo 1% triptona, coletadas com pipeta de 1000 µL e transferidas para um tubo Falcon de 15 ml. O meio líquido contendo o *Bd* foi distribuído em placa de Elisa com 96 poços, sendo: três poços para controle positivo, três poços para controle negativo e 69 poços para ensaios com as secreções, para resultados em triplicata, contendo 50 µL em cada poço. O ensaio foi repetido duas vezes em momentos distintos. O controle positivo consistiu do meio de cultura contendo o *Bd*, acrescido de 50 µL de formaldeído 0,4% e o controle negativo, meio contendo *Bd*, acrescido de 50 µL de água Milli-Q estéril. Cinquenta microlitros de cada secreção foram incubados com 50 µL meio líquido contendo *Bd*, após 24h de incubação, a viabilidade do fungo foi primeiramente observada em microscopia de luz com lente objetiva de 100x, ocular de 10x e óleo de imersão. Como parâmetros foram observados a presença/ausência de esporos e/ou esporângios e a existência de movimentação ou não dos esporos fora/dentro dos esporângios.

### **4.4. Ensaio antifúngico das frações isoladas de secreções cutâneas ativas:**

Três secreções que apresentaram atividade antifúngica foram encaminhadas para fracionamento em sistema de HPLC (Cromatografia líquida de Alta

Performance) para isolamento de compostos bioativos. Cada alíquota de 2 mg da secreção liofilizada foi ressuspensa com 250 µL de água Milli-Q e filtrada (Millex 0,22 µm). O material filtrado foi fracionado num sistema RP-HPLC (*Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography*) (Shimadzu Co., Kyoto, Japan, Série LC-10VP) e uma coluna analítica (Vydac C18 218TP54, 5 µm, 4,6 x 250 mm, 300 Å, Hesperia, USA). As fases móveis, utilizadas em gradiente foram: O tampão A, água Milli-Q contendo 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (v/v), e o tampão B, acetonitrila e 0,1% de TFA (v/v), com fluxo de 1,0 ml/min. O monitoramento se deu a 216 e 280 nm. As frações foram coletadas manualmente e secas em sistema de *Speed-Vac*. As frações cromatográficas referentes a três cromatografias foram reunidas para o ensaio de inibição da proliferação. Os compostos, com suas concentrações calculadas medindo-se a absorbância a 215 e 225 nm e as colônias de *Bd*, em caldo 1% triptona, foram distribuídos em placa de Elisa com 96 poços, na quantidade de 50 µL e acrescidas de 50 µL de solução contendo o composto bioativo de interesse, da secreção bruta. Os resultados foram obtidos em triplicata. O controle positivo consistiu do inóculo em caldo 1% triptona, acrescido de formaldeído 0,4% e o controle negativo, meio com *Bd*, acrescido de água Milli-Q.

#### **4.5. Ensaio de Viabilidade celular:**

A análise da viabilidade do *Bd* foi realizada de duas formas distintas, uma por ensaio com MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio]. Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo composto/extrato em estudo no metabolismo celular de glicídios, através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração

amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (PEDROSA; FELIPE; KVIECINSKI, 2011). 50 µL de cada fração foram incubadas com 50 µL de solução de *Bd*; Após 24h de incubação a 13°C, em cada poço foi adicionado 2 µL de MTT e, encubado por sete dias, devido ao lento metabolismo do *Bd*; Após sete dias adicionou-se 50 µL de DMSO, para dissolução de possíveis cristais e fez-se a leitura em leitora de microplaca Multiskan® FC, Thermo Scientific, USA, com absorbância a 595 nm. A outra forma de verificação da viabilidade celular do *Bd* foi o ensaio com utilização do corante Azul de Tripano, um corante azoico, muito utilizado na preparação histológica, para ensaios de viabilidade celular que permitem diferenciar células vivas e mortas, por corar estas últimas. O Azul de Tripano é ideal para a determinação da viabilidade do *Bd*, por ser efetivo, rápido, barato e requerer o mínimo em equipamentos para uso e análise (MCMAHON, 2013). Após 24 de incubação do fungo com a secreção cutânea de anfíbio, 2 µL de Azul de Tripano foi adicionado em cada poço contendo 8 µL da amostra com *Bd*, portanto na proporção de 1:4. As amostras coradas pelo Azul de Tripano foram inseridas em câmara de Neubauer (10 µL) e observadas ao microscópio de luz com aumento de 400x. As características observadas nas amostras tiveram como base as observações do controle positivo e negativo, utilizados no mesmo ensaio, tendo sido o controle positivo: O meio de cultura contendo o *Bd* e formaldeído a 0,4%, 50 µL cada, separado 8 µL e acrescido de 2 µL de Azul de Tripano. O controle negativo, nas mesmas quantidades do controle positivo, com 50 µL de água Mili-Q, em vez de formaldeído.

#### **4.6. Análise por espectrometria de massa das frações cromatográficas de *R. mirandaribeiroi*:**

A determinação da massa molecular das secreções de *Rhinella mirandaribeiroi* foi realizada em um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF (UltraFlex II, Bruker Daltonics, Billerica, MA). As frações cromatográficas, dissolvidas em uma solução de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (1:3, v:v) e colocadas em uma placa de MALDI previamente lavada com metanol e secadas à temperatura ambiente por 15 minutos. A massa monoisotópica do composto de interesse foi obtida no modo refletor, com calibração externa, usando o *Peptide Calibration Mixture* (faixa de massa entre 1000 e 4000 Da, Bruker Daltonics).

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1. Secreções brutas**

Na tabela 3, demonstra-se que das 23 secreções brutas testadas, sete provocaram destruição dos esporângios, que abertos, continham zoósporos inertes em seu interior, bem como zoósporos livres também inertes ou com motilidade anormal. As secreções que provocaram a destruição de esporângios foram as de sequência: 1 (*Rhinella mirandaribeiroi*), 4 (*Ameerega flavopicta*), 7 (*Phyllomedusa azurea*), 10 (*Scinax similis*), 12 (*Trachycephalus venulosus*), 20 (*Dermatonotus muelleri*) e 23 (*Siphonops paulensis*). Na Figura 8A e 8B observam-se os esporângios com zoósporos de uma colônia em crescimento de *B. dendrobatidis*. Em 8C e 8D, após a incubação com secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi* e *Phyllomedusa azurea*, respectivamente. Na figura 8C é notório a redução de esporângios e o acúmulo de zoósporos livres, a sua maioria, inertes. Na imagem 8D

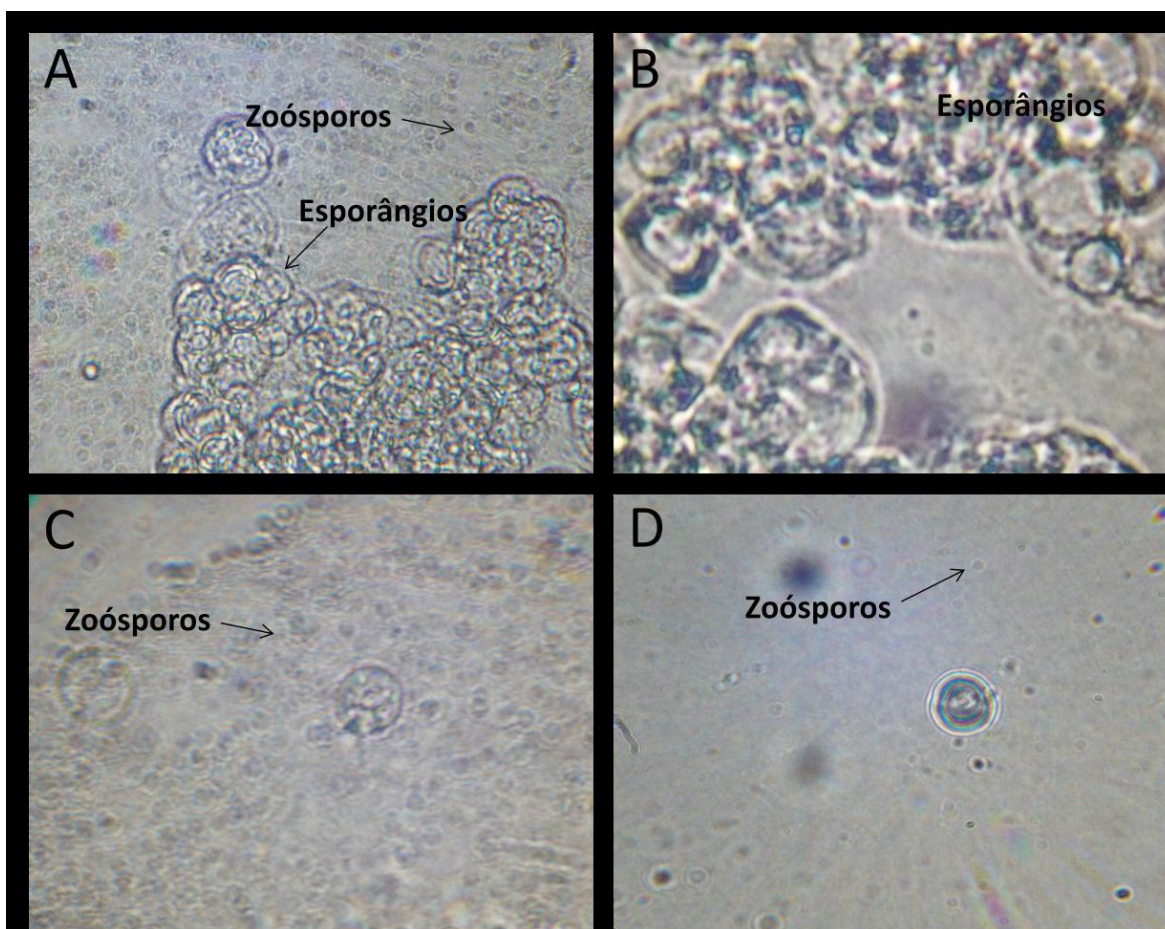
é perceptível a ausência de esporângios e naquele quadrante registrado, muitos esporos livres, ativos.

Tais resultados sugerem uma atividade antifúngica de compostos bioativos presentes na secreção cutânea dos indivíduos testados e possibilitaram a continuidade dos trabalhos de fracionamento e caracterização dos compostos bioativos das espécies escolhidas. *Ameerega flavopicta*, *Phyllomedusa azurea* e *Rhinella mirandaribeiroi*, foram as espécies com resultados positivos no ensaio com secreção bruta e, dentre as demais, foram escolhidas por apresentarem diferentes classes de compostos em suas secreções: alcaloides em *A. flavopicta*; *P. azurea* com peptídeos antimicrobianos; aminas biogênicas e esteroides presentes na secreção de *R. mirandaribeiroi*.

**Tabela 3.** Ensaio com as secreções brutas das espécies de anfíbios testadas contra o *B.dendrobatidis*. Atividade de redução na viabilidade do fungo. Observação ao microscópio óptico com aumento de 400x das células coradas por Azul de Tripano.

Família	Seq	Nome da espécie	Características observadas:
Bufonidae	1	<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>	Esporângios muito condensados e corados; Esporos livres com motilidade lenta.
	2-a	<i>Rhinella schneideri</i>	Esporângios e esporos normais.
	2-b	<i>Rhinella schneideri</i> (imago)	Poucos esporângios intactos e, nestes poucos, esporos com motilidade normal.
	2-c	<i>Rhinella schneideri</i> (jovem)	Esporângios e esporos normais.
Cycloramphidae	3	<i>Proceratophrys goyana</i>	Esporângios e esporos normais.
Dendrobatidae	4	<i>Ameerega flavopicta</i>	Ausência de esporângios; Esporos normais.
Hylidae	5	<i>Dendropsophus melanargyreus</i>	Esporângios muito condensados e corados; Esporos livres com motilidade lenta.
	6	<i>Hypsiboas raniceps</i>	Muitos esporângios rompidos e esporos com motilidade lenta.
	7	<i>Phyllomedusa azurea</i>	Esporângios destruídos e elevado número de esporos livres inertes.
	8	<i>Pseudis bolbodactyla</i>	Esporângios e esporos normais.
	9	<i>Scinax fuscovarius</i>	Esporângios muito condensados e corados; Esporos livres normais.
	10	<i>Scinax similis</i>	Esporângios destruídos; Esporos livres com motilidade muito lenta.
	11	<i>Scinax ruber</i>	Esporângios muito condensados e corados; Esporos livres normais.
	12	<i>Trachycephalus venulosus</i>	Esporângios destruídos.
Leiuperidade	13	<i>Eupemphix nattereri</i>	Esporângios e esporos normais.

	14	<i>Physalaemus centralis</i>	Esporângios e esporos normais.
Leptodactylidae	15	<i>Leptodactylus fuscus</i>	Esporângios e esporos normais.
	16	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	Esporângios e esporos normais.
	17	<i>Leptodactylus latrans (ocellatus)</i>	Esporângios e esporos normais.
	18	<i>Leptodactylus mystaceus</i>	Esporângios normais; Esporos com motilidade lenta.
	19	<i>Leptodactylus troglodytes</i>	Esporângios muito condensados e corados; Esporos livres normais.
Microhylidae	20	<i>Dermatonotus muelleri</i>	Ausência de Esporângios; Esporos normais.
	21	<i>Elachistocleis bicolor</i>	Esporângios e esporos normais.
Ranidae	22	<i>Lithobates catesbeianus</i>	Número elevado de esporos livres; Esporângios rompidos e intensamente corados pelo azul de tripano.
Ceaciliidae	23	<i>Siphonops paulensis</i>	Ausência de Esporângios
C(+) Bd+Formaldeído 0,4%			Esporângios destruídos e poucos esporos livres, com motilidade anormal;
C(-) Bd+ Milli-Q			Esporângios e esporos normais; Muitos esporângios intactos com intensa atividade de esporos.



**Figura 8.** (A) Microfotografia da cultura de *Bd* saudável (aumento 400x), sem uso de corantes no microscópio de luz, (B) *Bd* (aumento de 1000x). (C) Microfotografia após o tratamento com secreção bruta de *Rhinella mirandaribeiroi*. (D) Microfotografia após o tratamento com a secreção bruta de *Phyllomedusa azurea*.

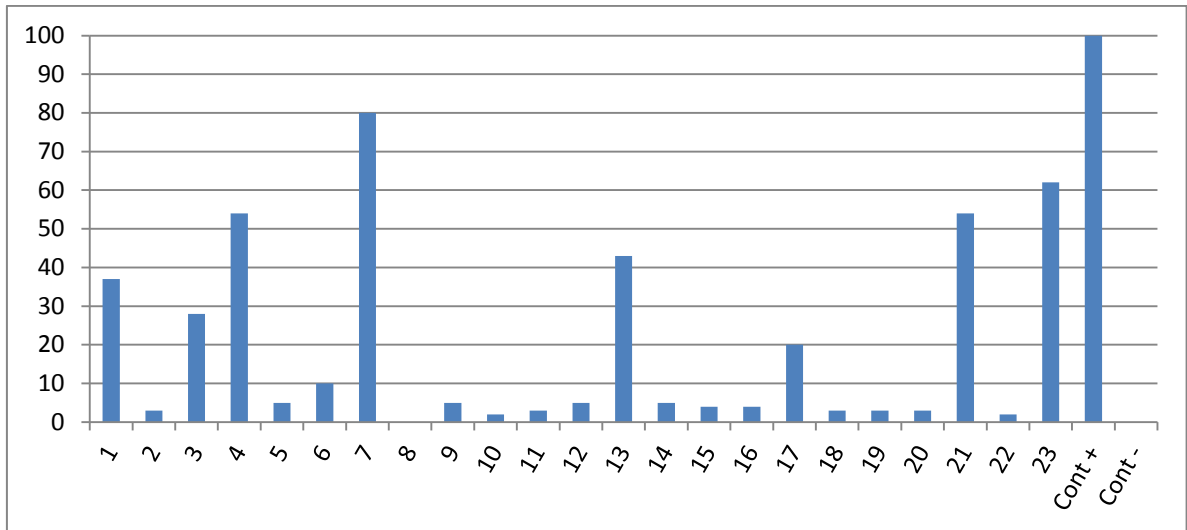
A tabela 4 e a figura 5 representam o grau de inibição à proliferação do *Bd* com as secreções brutas. A viabilidade do fungo foi analisada pela reação com MTT. Na tabela 4, os campos em destaque são os que apresentaram inibição superior a 30%. A figura 5 é a representação gráfica dos graus de inibição da tabela 4.

**Tabela 4** – Grau de inibição à proliferação do *Bd* com as secreções brutas de anfíbios e análise por reação com MTT. Destaque para as secreções que apresentaram grau de inibição maior que 30 %.

Família	Seq	Nome da espécie	Grau de inibição (%)
Bufonidae	1	<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>	37
	2-a	<i>Rhinella schneideri</i>	3



	2-b	<i>Rhinella schneideri</i> (imago)	Não Realizado
	2-c	<i>Rhinella schneideri</i> (jovem)	
Cycloramphidae	3	<i>Proceratophrys</i> <i>goyana</i>	28
Dendrobatidae	4	<i>Ameerega flavopicta</i>	54
Hylidae	5	<i>Dendropsophus</i> <i>melanargyreus</i>	5
	6	<i>Hypsiboas raniceps</i>	10
	7	<i>Phyllomedusa azurea</i>	80
	8	<i>Pseudis bolbodactyla</i>	0
	9	<i>Scinax fuscovarius</i>	5
	10	<i>Scinax similis</i>	2
	11	<i>Scinax ruber</i>	3
	12	<i>Trachycephalus</i> <i>venulosus</i>	5
Leiuperidade	13	<i>Eupemphix nattereri</i>	43
	14	<i>Physalaemus centralis</i>	5
Leptodactylidae	15	<i>Leptodactylus fuscus</i>	4
	16	<i>Leptodactylus</i> <i>labyrinthicus</i>	4
	17	<i>Leptodactylus latrans</i> ( <i>ocellatus</i> )	20
	18	<i>Leptodactylus</i> <i>mystaceus</i>	3
	19	<i>Leptodactylus</i> <i>trogodytes</i>	3
Microhylidae	20	<i>Dermatonotus muelleri</i>	3
	21	<i>Elachistocleis bicolor</i>	54
Ranidae	22	<i>Lithobates</i> <i>catesbeianus</i>	2
Ceaciliidae	23	<i>Siphonops paulensis</i>	62
C(+) Bd+Formaldeído 0,4%			100
C(-) Bd+ Milli-Q			0



**Figura 9.** Perfil de viabilidade do *Bd* após incubação com as secreções brutas de anfíbios. Destaca-se a atividade das sequências 1 (*R. mirandaribeiroi*), 4 (*A. flavopicta*), 7 (*P. azurea*), 13 (*E. nattereri*), 21 (*E. bicolor*) e 23 (*S. paulensis*).

### 5.2. *Ameerega flavopicta* (LUTZ, 1925)

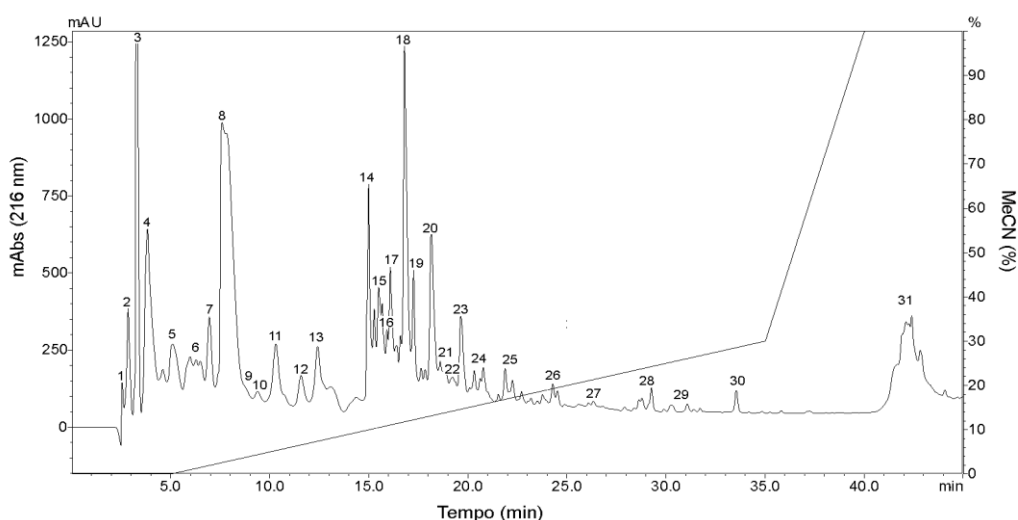
A *Ameerega flavopicta* é uma das espécies de anuros pertencentes à família Dendrobatidae.



**Figura 10.** *Ameerega flavopicta* ©2004 Adrian Garda.  
Disponível em <http://www.amphibiaweb.org>

Os indivíduos desta família apresentam, em geral, alcaloides na composição de seus venenos. Inicialmente, os alcaloides eram considerados como sendo alcaloides dendrobatídeos, pois, acreditava-se que eram sintetizados pelos indivíduos da família Dendrobatidae. Entretanto, estudos comprovaram que

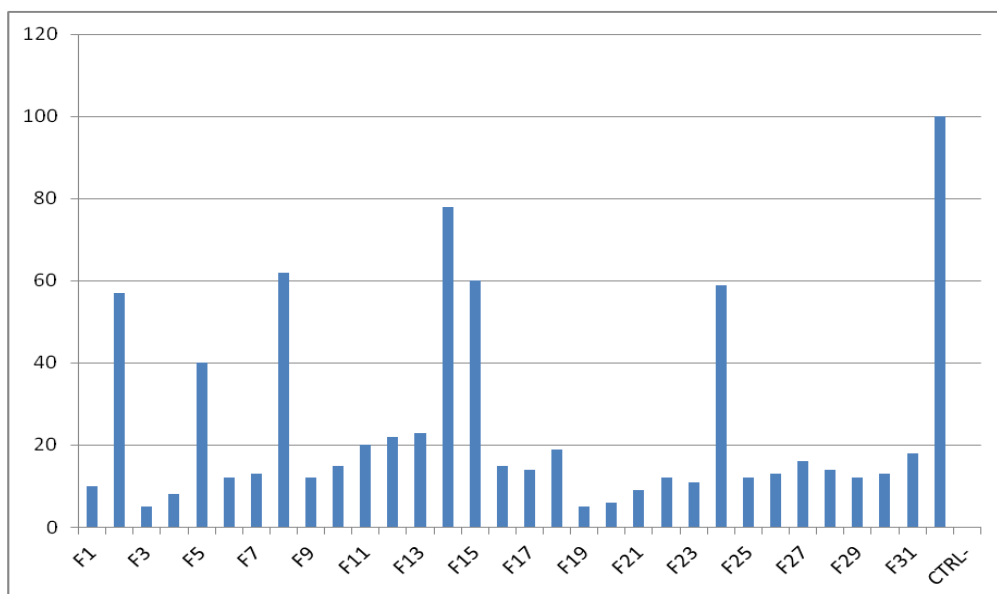
em dendrobatídeos de cativeiro não eram detectados alcaloides nas suas secreções. Hoje, sabe-se que os alcaloides dos dendrobatídeos tem origem em nos artrópodes que compõe a dieta desses anfíbios (DALY et al., 1994a; DALY, 1997). Se qualquer dos alcaloides existentes poderia apresentar atividade contra o *B. dendrobatidis*, segundo DASZAK et al., (1999), trata-se de fato ainda não elucidado. O perfil cromatográfico do veneno de *A. flavopicta* é representado na figura 11, demonstrando 31 frações de compostos mais abundantes no veneno e, em sua maioria, caracteristicamente hidrofílicas.



**Figura 11.** Perfil cromatográfico da secreção cutânea de *Ameerega flavopicta*, fracionado em sistema de cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (Vydac C18 218TP54, 5  $\mu$ m, 4,6 x 250 mm, 300 Å, Hesperia, USA). As frações foram eluídas em gradiente de 0,1%TFA (Fase A) e acetonitrila + 0,1%TFA, em fluxo de 1,0 ml/min.

### 5.2.1 Ensaio de viabilidade

A figura 12 apresenta o gráfico de inibição à proliferação do *Bd*, quantificado por MTT. O controle positivo (caldo com *Bd* + Formaldeído a 0,4%) apresenta 100% de inibição (referência). Destaque para a atividade das frações F2, F5 F8, F14, F15 e F24, que tiveram resultados mais próximos do controle positivo.



**Figura 12.** Perfil de viabilidade do *Bd* após incubação com as frações cromatográficas resultantes do fracionamento da secreção cutânea de *A. flavopicta*. Destaca-se a atividade das frações F2, F5 F8, F14, F15 e F24.

O ensaio com as frações de *A.flavopicta*, quantificada por metodologia de coloração com Azul de Tripano é demonstrada na tabela 5. Nesse ensaio, destaca-se a atividade das frações F2, F3, F5, F8, F14, F15, F17, F23 e F24.

**Tabela 5.** Ensaio de inibição do fungo com as frações do veneno de *Ameerega flavopicta*. Atividade de redução na viabilidade do fungo. Observação ao microscópio óptico com aumento de 400x das células coradas por Azul de Tripano.

Amostras	Características observadas	
	Esporângios	Esporos
F1	Normais, com intensa atividade dos esporos.	Normais
F2	Esporângios condensados e intensamente corados; Observado baixíssima atividade de esporos; Muitos esporângios destruídos.	Poucos esporos livres observados, com motilidade anormal (lentos)
F3	Esporângios condensados, notavelmente destruídos e intensamente corados.	Não foi observado movimento nos esporângios intactos. Poucos esporos livres, com motilidade muito lenta e muitos inertes.
F4	Esporângios condensados e intensamente corados;	Poucos esporos livres observados, com motilidade anormal (lenta) e baixíssima atividade nos esporângios intactos.
F5	Esporângios notavelmente destruídos, condensados e intensamente corados.	Esporos livres inviáveis; Baixíssima atividade nos poucos esporângios intactos.
F6	Muitos esporângios condensados; Alguns esporângios intactos.	Pouca atividade de esporos livres; Intensa atividade de esporos nos

		esporângios intactos.
F7	Esporângios normais	Pouca atividade de esporos livres; Intensa atividade de esporos nos esporângios intactos.
F8	Esporângios intensamente corados;	Baixíssima atividade nos esporângios intactos e poucos esporos livres viáveis.
F9	Esporângios intensamente corados e condensados;	Pouquíssimos esporos livres; Atividade de esporos normal em poucos esporângios intactos;
F10	Esporângios condensados, intensamente corados e muitos extravazados.	Poucos esporos livres, com motilidade deficiente (lentos); Esporos muito ativos em poucos esporângios intactos.
F11	Alguns esporângios condensados, outros isolados e intactos.	Poucos esporos livres, com motilidade normal; Atividade normal de esporos em alguns esporângios intactos.
F12	Esporângios intactos e condensados e alguns com atividade normal dos esporos.	Pouquíssimos esporos livres. Intensamente ativos em pouquíssimos esporângios pequenos e intactos.
F13	Condensados e muito corados; Alguns esporângios intactos, com atividade normal de esporos.	Poucos esporos livres, com motilidade normal; Atividade normal de esporos em alguns esporângios intactos
F14	Esporângios deformados e condensados, notavelmente destruídos.	Grande número de esporos livres, inertes.
F15	Poucos esporângios notados.	Nenhuma atividade de esporos livres ativos, todos visivelmente inertes. Atividade normal de esporos em num reduzido número de esporângios intacto.
F16	Esporângios normais	Esporos normais, poucos livres notados.
F17	Esporângios condensados;	Baixíssima atividade dos poucos esporos livres; Baixa atividade em esporângios intactos.
F18	Esporângios normais, com alguns condensados.	Esporos livres com motilidade lenta e em pequena quantidade; Intensa atividade nos esporângios intactos.
F19	Esporângios normais, alguns condensados e com pouca atividade de esporos observada.	Esporos livres com motilidade lenta e nenhuma atividade observada nos esporângios.
F20	Esporângios normais	Pouquíssimos esporos livres; Intensa atividade de esporos nos esporângios intactos;
F21	Esporângios normais	Pouquíssimos esporos livres; Intensa atividade de esporos nos esporângios intactos;
F22	Esporângios normais, com alguns condensados.	Esporos livres não notados. Atividade normal e intensa nos esporângios intactos.
F23	Esporângios normais	Muitos esporos livres; Incontáveis esporos corados e inertes; Baixíssima atividade nos esporângios intactos.
F24	Esporângios muito condensados e sem atividade dos esporos observada.	Esporos livres com motilidade lenta e baixíssima atividade nos esporângios intactos.
F25	Esporângios normais	Esporos normais; Intensa atividade nos esporângios intactos.

F26	Esporângios muito condensados;	Esporos normais; Intensa atividade nos esporângios intactos.
F27	Esporângios muito condensados;	Esporos normais; Intensa atividade nos esporângios intactos.
F28	Esporângios muito condensados;	Esporos normais, muitos livres e ativos; Intensa atividade nos esporângios intactos.
F29	Esporângios aparentemente ausentes.	Atividade normal no interior de pouquíssimos esporângios isolados e intactos. Incontáveis esporos livres ativos.
F30	Esporângios normais	Esporos normais, muitos livres e ativos; Intensa atividade nos esporângios intactos.
F31	Poucos esporângios observados; Condensados.	Incontáveis esporos livres; Não foi observada atividade dos esporos nos poucos esporângios intactos.
C(-) Bd+ Milli-Q	Normais, com intensa atividade dos esporos.	Normais
C(+) Bd+Formaldeído 0,4%	Esporângios destruídos	Esporos livres inertes

Os resultados da tabela 5, comparados aos da figura 12, demonstram a atividade de inibição ao desenvolvimento do *Bd*, das mesmas frações, somando-se ainda, a atividade das frações F3, F17 e F23. As frações em destaque apresentaram notável atividade sobre os esporângios e esporos, qualificadas tanto pela observação com Azul de Tripano, quanto pela diminuição da atividade de redução do MTT a formazan. As frações F14 e F15, na análise com Azul de Tripano, promoveram maior atividade contra o *B. dendrobatidis*.

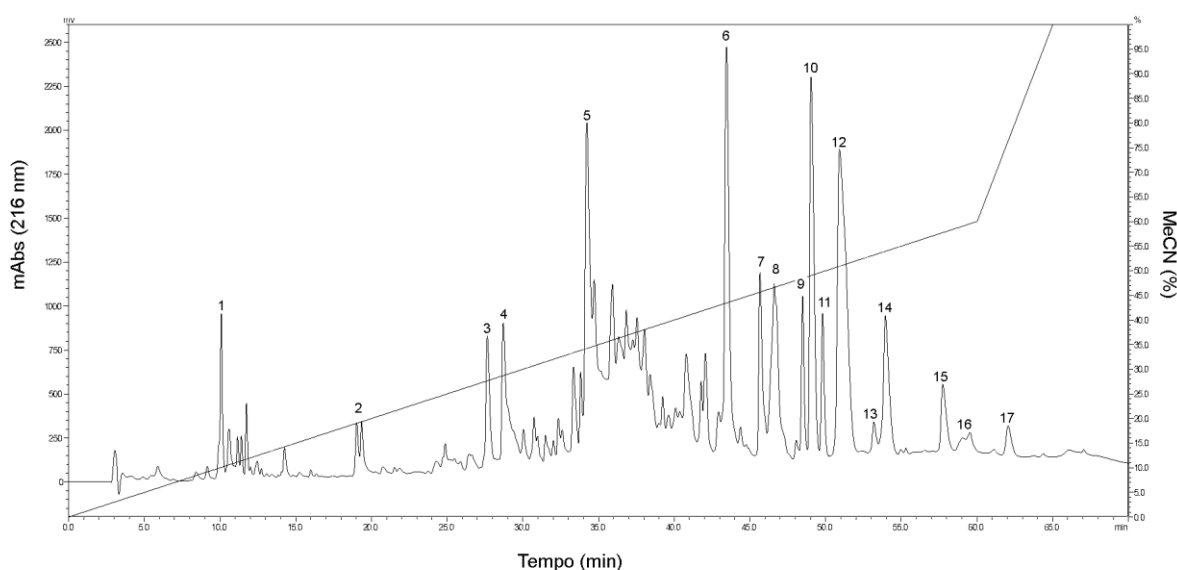
### 5.3. *Phyllomedusa azurea* (COPE, 1862)

A *Phyllomedusa azurea* é uma espécie da família Hylidae, comum em áreas de Cerrado e que apresenta secreção cutânea rica em peptídeos antimicrobianos.



**Figura 13.** *Phyllomedusa azurea* ©2010 Pedro L. V. Peloso. Disponível em <http://www.amphibiaweb.org>

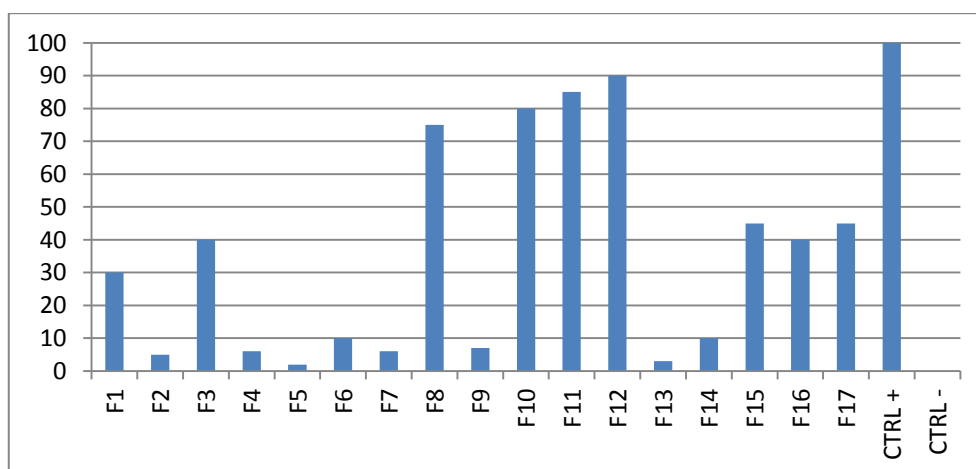
As espécies do gênero *Phyllomedusa* são os anfíbios com as secreções cutâneas melhor caracterizadas. As dermaseptinas presentes no veneno de *Phyllomedusa* constituem PAM's com um amplo espectro de ação, são peptídeos lineares e anfipáticos que formam hélices e tem ação comprovada contra bactérias, fungos e protozoários (MOR at al., 1994). A figura 14 apresenta o perfil cromatográfico da secreção de *P.azurea*, com 17 frações de compostos mais abundantes no veneno.



**Figura 14.** Perfil cromatográfico da secreção cutânea de *Phyllomedusa azurea*, fracionado em sistema de cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (Vydac C18 218TP54, 5  $\mu$ m, 4,6 x 250 mm, 300 Å, Hesperia, USA). As frações foram eluídas em gradiente de 0,1%TFA (fase A) e acetonitrila + 0,1%TFA, em fluxo de 1,0 ml/min.

### 5.3.1. Ensaio de viabilidade

O ensaio de viabilidade do *Bd* em presença das frações do veneno de *P. azurea* e verificação por reação com MTT é apresentado na figura 15. As frações F1, F3, F8, F10, F11, F12, F15, F16 e F17 apresentaram atividade de redução da viabilidade do *Bd*, com destaque às frações F8, F10, F11 e F12, que reduziram a viabilidade do fungo em 82,5%, em média. As dermaseptinas e filoseptinas presentes na secreção de *Phyllomedusa azurea*, constituem-se integrantes da família de peptídeos antimicrobianos de anfíbios e apresentam cadeia polipeptídica pequena (10-46 resíduos de aminoácidos), com um grande número de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, distribuídos ao longo da cadeia, levando à formação de alfa-hélices, anfipáticas, quando em ambientes hidrofóbicos (SCHWARTZ et al., 2007). Acredita-se que o mecanismo de ação dos peptídeos catiônicos de anfíbios envolva a interação com a membrana da célula-alvo, por meio de interações eletrostáticas e ou hidrofóbicas, inserindo-se na membrana, provocando distúrbios funcionais e consequente morte celular (DATHE & WIEPRECHT, 1999; LOHNER & PRENNER, 1999; OREN & SHAI, 1999).



**Figura 15.** Perfil de viabilidade do *Bd* após incubação com as frações cromatográficas resultantes do fracionamento da secreção cutânea de *P. azurea*. Destaca-se a atividade das frações F1, F3, F8, F10, F11, F12, F15, F16, F17.



A tabela 6 demonstra as atividades das mesmas frações apresentadas na Figura 15. A verificação de atividade se deu pela reação com Azul de Tripano e observação ao microscópio óptico, com aumento de 400x.

Inferese da tabela 6 que houve atividade das mesmas frações testadas com reação por MTT, exceto as F1 e F3. Acrescenta-se a atividade das frações F7 e F14. Chama a atenção a atividade das frações F12, F14, F16 e F17, que demonstraram clara atividade sobre os esporângios, notavelmente ausentes.

Na morte dos esporos, as frações F11, F14 e F15 mostraram-se marcadamente efetivas, entretanto, somente F11 corrobora com o resultado observado no ensaio com reação do MTT.

**Tabela 6.** Ensaio de inibição do fungo com as frações do veneno de *Phyllomedusa azurea*. Atividade de redução na viabilidade do fungo. Observação ao microscópio óptico com aumento de 400x das células coradas por Azul de Tripano.

Amostras	Características observadas:	Características observadas		
		Alteração morfológica do esporângio	Zoóporos Ativos	Zoóporos Inativos
F1	Esporângios e esporos normais		X	
F2	Esporângios e esporos normais		X	
F3	Esporângios e esporos normais		X	
F4	Esporângios e esporos normais		X	
F5	Esporângios e esporos normais		X	
F6	Esporângios e esporos normais		X	
F7	Esporos destruídos e poucos esporos ativos	X	X	
F8	Esporos destruídos e poucos esporos ativos	X	X	
F9	Esporângios e esporos normais		X	

F10	Esporângios intactos e muitos esporos inativos		X	
F11	Esporângios destruídos e poucos esporos ativos	X		X
F12	Ausência de esporângios		X	
F13	Esporângios e esporos normais		X	
F14	Ausência de esporângios;			X
F15	Poucos esporângios observados; Poucos esporos ativos.			X
F16	Ausência de esporângios; Esporos normais		X	
F17	Ausência de esporângios; Esporos normais		X	
C(-) Bd+ Milli-Q	Esporângios e esporos normais		X	
C(+) Bd+Formaldeído 0,4%	Poucos esporângios; todos danificados; esporos inertes.	X		X

#### 5.4. *Rhinella mirandaribeiroi* (NARVAES & RODRIGUES, 2009)

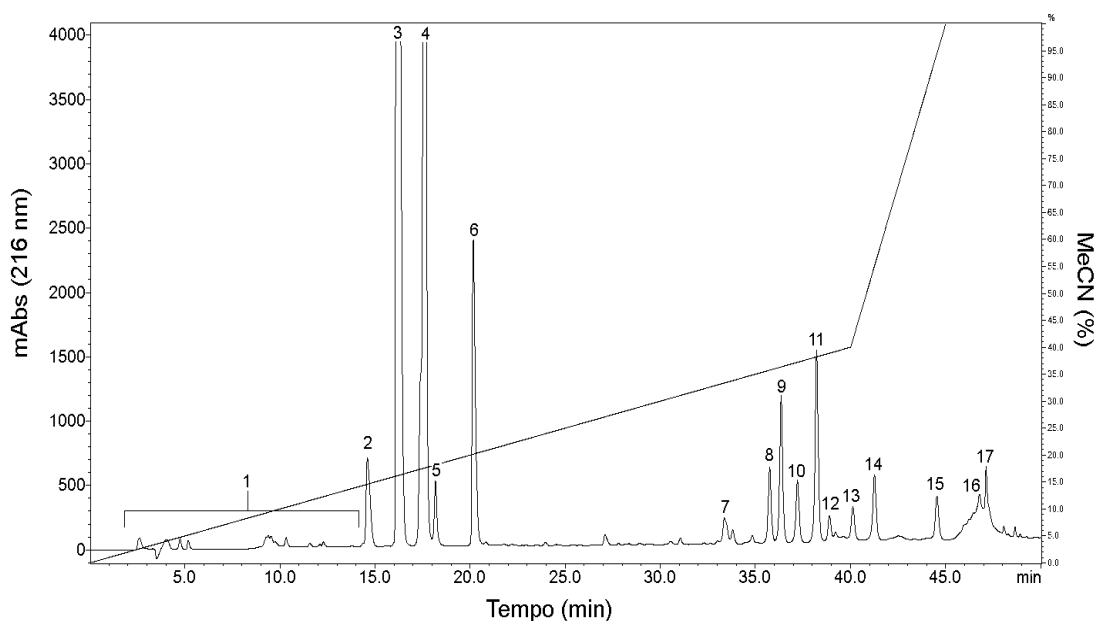
A *Rhinella mirandaribeiroi* é uma das espécies da família Bufonidae, pertencente ao grupo das *Rhinella granulosa* (NARVAES & RODRIGUES, 2009).



Figura 16. *Rhinella mirandaribeiroi* ©2012 Mario Sacramento. Disponível em <http://www.amphibiaweb.org>

A *Rhinella mirandaribeiroi* possui tamanho médio, 4 a 7 cm, pele caracteristicamente rugosa, com pequenas glândulas parotoídes. Ocorre em regiões de Cerrado, com ampla distribuição na América do Sul. O veneno de *R. mirandaribeiroi* apresenta em sua composição, esteroides, tais como os bufadienólídeos e aminas biogênicas, como indolalquilaminas. Os bufadienólídeos são esteroides encontrados em venenos de anuros da família Bufonidae e são representados por dois grupos: as bufogeninas, também denominadas bufaginas e as bufotoxinas, que são formadas da união da suberil-arginina com bufogeninas. As bufogeninas constituem uma família de substâncias heterocíclicas que inibem a bomba de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase e possuem ação cardiotoxicidade (TOLEDO & JARED, 1995; FLIER et al., 1980). As indolalquilaminas ou aminas indólicas são moléculas derivadas da hidroxilação enzimática, seguida de descarboxilação do *L*-triptofano, formando serotonina 5-hidroxitriptamina. *N*-Metilações sucessivas da serotonina geram a bufotenina (5-hidroxi-*N*, *N*-dimetilserotonina) (ERSPAMER, 1994).

O perfil cromatográfico da secreção de *Rhinella mirandaribeiroi* está representado na Figura 17. Dentre as frações mais abundantes no cromatograma (F3, F4 e F6), destaca-se a fração F6, de massa molecular experimental de 203.00 Da (MALDI-TOF/TOF – UltraFlex II, Bruker Daltonics, Billerica, MA) (Tabela 6), trata-se, possivelmente, do composto Dehidrobufotenina, corroborado pelo trabalho de MACIEL et al., (2003), que caracterizou quimicamente as indolalquilaminas presentes na secreção cutânea de *Rhinella rubescens*.

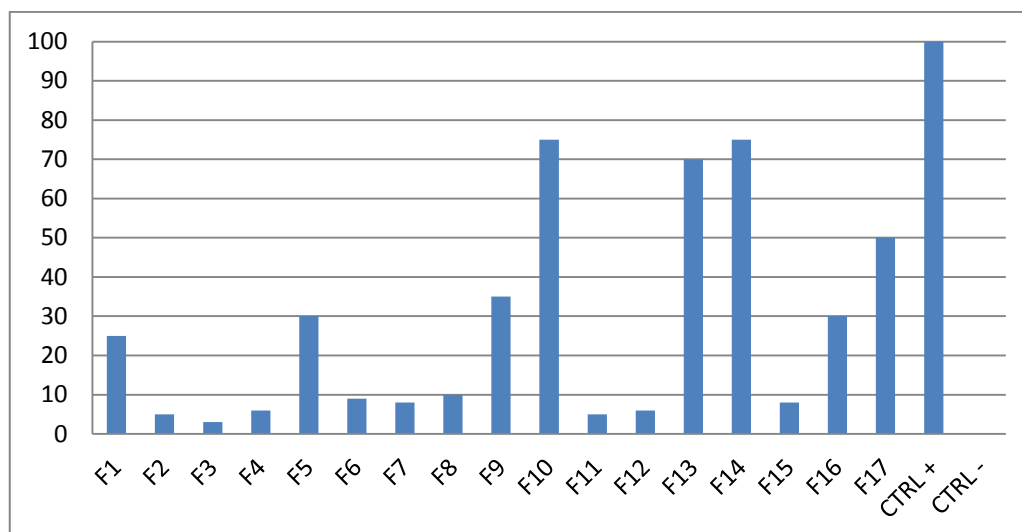


**Figura 17.** Perfil cromatográfico da secreção cutânea de *Rhinella mirandaribeiroi*, fracionado em sistema de cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (Vydac C18 218TP54, 5  $\mu$ m, 4,6 x 250 mm, 300 Å, Hesperia, USA). As frações foram eluídas em gradiente de 0,1%TFA (Fase A) e acetonitrila+0,1%TFA, em fluxo de 1,0 ml/min.

#### 5.4.1. Ensaio de viabilidade

Os ensaios de viabilidade do fungo com as frações da secreção de *Rhinella mirandaribeiroi* verificadas por reação com MTT e Azul de Tripano tem seus resultados apresentados na figura 18, para ensaio com MTT e tabela 7 para o ensaio com Azul de Tripano.

Para o ensaio com reação por MTT, a atividade de inibição ao desenvolvimento do *Bd* foi mais significativa com as frações F1, F5, F9, F10, F13, F14, F16, F17. As frações F10 e F14 foram as mais se aproximaram do C(+), 100% de inibição, apresentando resultados de inibição em torno de 75%.



**Figura 18.** Perfil de viabilidade do *Bd* após incubação com as frações cromatográficas resultantes do fracionamento da secreção cutânea de *R. mirandaribeiroi*. Destaca-se a atividade das frações F1, F5, F9, F10, F13, F14, F16 e F17.

O ensaio com as frações de *R. mirandaribeiroi* e verificação por Azul de Tripiano apresentou atividade nos ensaios em triplicata, para as frações F1, F9, F10 e F11, conforme apresentado pela tabela 7.

**Tabela 7.** Ensaio de inibição do fungo com as frações do veneno de *Rhinella mirandaribeiroi*. Atividade de redução na viabilidade do fungo. Observação ao microscópio óptico com aumento de 400x das células coradas por Azul de Tripiano.

Controles e frações	Características observadas	
	Esporângios	Esporos
F1	Esporângios muito condensados, com baixíssima atividade dos esporos	Poucos esporos livres observados.
F2	Normais	Normais e intensamente ativos
F3	Normais	Normais e intensamente ativos
F4	Normais	Normais e intensamente ativos
F5	Normais	Normais e intensamente ativos
F6	Normais	Normais e intensamente ativos
F7	Normais	Normais e intensamente ativos
F8	Normais	Pouca atividade de esporos nos esporângios intactos.
F9	Poucos esporângios intactos	Muitos esporos livres, com motilidade anormal (lentos).
F10	Poucos esporângios intactos	Muitos esporos livres, com motilidade anormal.

F11	Esporângios muito condensados e intensamente corados pelo azul de tripano	Esporos livres com motilidade anormal (lentos) e com pouca atividade nos poucos esporângios intactos
F12	Poucos esporângios intactos	Normais
F13	Normais, com pouca atividade de esporos.	Esporos livres normais.
F14	Poucos esporângios com atividade normal de esporos.	Esporos livres normais
F15	Esporângios normais, com pouca atividade dos esporos.	Esporos livres normais
F16	Normais	Normais
F17	Poucos esporângios com atividade normal dos esporos	Esporos livres normais
C(-) Bd+ Milli-Q	Normais	Esporos livres com motilidade normal e intensa movimentação em esporângios intactos.
C(+) Bd+Formaldeído 0,4%	Esporângios destruídos	Esporos livres inertes

A espectrometria de massas da secreção de *R. mirandaribeiroi* foi realizada por técnica de MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption*). A tabela 8 apresenta os valores de massas moleculares em Daltons dos compostos detectados nas frações da secreção de *R. mirandaribeiroi*.

**Tabela 8.** Relação das massas moleculares dos componentes presentes nas frações cromatográficas de *Rhinella mirandaribeiroi*.

Fração	Massas moleculares (Daltons - Da)
F1	Sem íons detectáveis
F2	121,0
F3	155,7; 222,9; 343,8; 393,7; 410,7; 522,0; 550,0; 566,6; 880,32
F4	160,0; 236,9 282,84
F6	203,00
F7	542,1; 545,4; 556,70; 560,1; 574,6; 590,7; 596,7; 746,96; 758,55, 761,5; 801,4; 811,8; 898
F8	160,1; 409,8; 558,1; 554; 572,6; 594,6; 744,47
F9	370,84; 418,80; 440,7; 445,5; 461,83
F10	728,60; 330,9; 398,8; 402,32; 414,8; 486,6; 492,6
F11	155,0; 159,0; 161,0; 486,7; 707,15; 730,58

F12	730,5;
F13	330,1; 386,3; 422,8; 492,7; 522,1; 550,17
F14	202,9; 350,8; 414,0; 436,7; 460,5; 492,6; 508,83; 681,2; 860,0; 870,0; 876,0; 891,9
F15	402,8; 424,8; 494,08; 550,0; 778,7; 795,1
F16	495,83; 793,07
F17	495,83; 793,07

## 6. DISCUSSÃO

Atividades antimicrobianas de secreções de anfíbios contra uma enorme diversidade de patógenos, como bactérias, vírus, fungos protozoários, além de atividades antitumorais e indutores de apoptose já foram descritas para inúmeras espécies. Contudo, especificamente contra o *Bd*, poucos são os trabalhos publicados. No Brasil, os trabalhos sobre *Bd*, em sua grande maioria, contemplam as questões ecológicas, ocorrências de casos de infecção de espécies em áreas que apresentam condições ambientais favoráveis à viabilidade do fungo, como exemplo, áreas de Mata Atlântica, o isolamento, o cultivo e a análise genômica para identificação de cepas e diferenças nos fatores de virulência. Neste trabalho, propomos demonstrar um dentre os diversos mecanismos de defesa dos anfíbios, este, relacionado às atividades de suas secreções cutâneas, que poderiam promover algum tipo de inibição ao desenvolvimento do *Bd* em espécies resistentes à quitridiomicose.

Como respostas à suscetibilidade ou resistência à quitridiomicose, os resultados deste trabalho apontam para um dos mecanismos de defesa que anfíbios do cerrado podem apresentar dentre os muitos mecanismos que os anfíbios dispõem para combater ou controlar a proliferação da doença. ROLLINS-SMITH et al., HARRIS et al. e WOODHAMS et al.(2006) atestam que, além da atividade

antimicrobiana das secreções cutâneas de anfíbios contra o *B. dendrobatidis*, bactérias simbióticas podem também atuar no controle da atividade do *Bd*, como inibidores de crescimento do fungo na pele dos anfíbios, como demonstrado no trabalho de HARRIS et al. (2009), em que a bactéria *Janthinobacterium lividum* atua como proteção ao efeito letal do *B. dendrobatidis* na pele de *Rana muscosa*.

### **6.1. Ensaio com as secreções**

Neste trabalho, foram testadas as secreções brutas de 23 espécies de anfíbios anuros brasileiros ocorrentes, em grande parte, no Cerrado, e com os resultados da atividade de inibição à proliferação do *Bd*, apresentados na Tabela 3, Tabela 4 e Figura 5.

Trabalhos de atividade antimicrobiana contra *B. dendrobatidis*, publicados, levaram em consideração apenas a atividade do composto contra o fungo e não disponibilizaram análises da viabilidade do fungo. MCMAHON (2013), em seus trabalhos, demonstrou que o Azul de Tripano não é efetivo para verificação da viabilidade dos esporângios e sim, dos zoósporos, uma vez que nos esporângios existem excretas dos zoósporos, zoósporos mortos e ainda, poros de membrana permeável, que são facilmente coradas pelo Azul de Tripano. Entretanto, foi possível verificar uma possível atividade sobre os esporângios, por inspeção visual no microscópio de luz. Não há trabalhos que descrevam a viabilidade do *Bd* com reação por MTT, tampouco que se utilize das duas técnicas de avaliação de viabilidade do fungo. Ainda, para uma análise quantitativa da atividade contra os zoósporos, com viabilidade atestada com o Azul de Tripano, necessitar-se-ia de metodologia de separação de somente zoósporos vivos para experimentação e posterior contagem de células inviáveis devido à atividade dos compostos, metodologia esta, não



descrita ou validada em nenhum trabalho anterior. Para este trabalho, não foi possível a criação de metodologia de separação de somente esporos vivos para as experimentações, assim, da análise de viabilidade pelo uso do corante Azul de Tripiano, foi possível somente a demonstração de resultados qualitativos, por meio das características das colônias de fungo submetidas aos experimentos, observadas no microscópio de luz. A análise de viabilidade pela reação do sal MTT, apresentou dados quantitativos estimados, uma vez que os resultados lidos sob o aspecto de absorbância são representados por dados numéricos.

Pouco se conhece sobre as características morfológicas dos esporângios. Os esporângios apresentam em sua composição, excretas dos zoósporos, zoósporos mortos e poros de membrana permeável, que são facilmente coradas pelo Azul de Tripiano (MCMAHON, 2013). No entanto, são os esporângios que abrigam os esporos e é onde ocorre a reprodução assexuada dos zoósporos, que após sofrer ruptura, os libera, sob condições específicas (PIOTROWSKI et al. 2004). Os ensaios com secreção bruta demonstraram a atividade dos venenos de *Ameerega flavopicta*, *Dermatonotus muelleri*, *Lithobates catesbeianus*, *Phyllomedusa azurea*, *Scinax similis*, *Siphonops paulensis* e *Trachycephalus venulosus* contra os esporângios. Mesmo que os zoósporos livres tenham parecido viáveis, há indícios de que seu mecanismo de reprodução possa ter sido inibido, pela atividade antimicrobiana de alguns compostos sobre os esporângios. No ensaio das secreções brutas com reação por MTT há significativa inibição dos esporos por ação dos venenos de *Elachistocleis bicolor* e *Eupemphix nattereri* (tabela 3), o que difere das observações microscópicas (tabela 4). Uma hipótese provável a esse resultado pode ser a resultante do tempo de exposição dos esporos à reação com o MTT.

Analisando a tabela 2 e comparando os resultados das três espécies escolhidas para os ensaios com as frações cromatográficas de suas secreções (*A. flavopicta*, *P. azurea* e *R. mirandaribeiroi*), embora suas secreções apresentem resultados positivos de inibição à proliferação do *Bd*, observa-se que indivíduos da mesma família destas espécies são acometidas por quitridiomicose em outras regiões: Da família **Dendrobatidae**, foi detectada a infecção em *Dendrobates tinctorius* (MORGAN et al., 2007); Da família **Hylidae**, foi detectada a infecção em diversas espécies (LONGCORE et al., 1999; BRADLEY, 2002; TOLEDO et al., 2006; PEARL et al., 2007; BURKE, 2011; VIEIRA et al., 2012). Quanto aos indivíduos da família **Bufonidae**, girinos de *C. ictericus* e *C. rubescens*, em Jundiaí (SP) e S. Roque de Minas (MG) não apresentaram infecção (TOLEDO et al., 2006).

Na tabela 3 e 4 pode-se observar que algumas dos gêneros e espécies testados, também aparecem nos levantamentos de infecção por *Bd*, apresentados na tabela 2. O gênero *Proceratophrys* na tabela 2 não apresentou infecção em *P. boiei* (TOLEDO et al., 2006). *Proceratophrys goyana* (tabela 4) apresentou grau de inibição à proliferação do fungo de 28 % e na tabela 3, os dados observados foram normais para as características dos esporângios e dos esporos; Na tabela 2, o gênero *Hypsiboas* apresentou infecção por *Bd* em *H. polytaenius*, *H. bischoffi* e *H. faber* (BURKE, 2011); *H. albopunctata* e *H. similineatus* (TOLEDO et al., 2006). *Hypsiboas raniceps* demonstrou uma pequena atividade nos esporângios (tabela 3) e grau de 10% de inibição ao desenvolvimento do fungo; Segundo a tabela 2, *Physalaemus cardosoi*, em Boracéia (SP), não apresentou infecção (BURKE, 2011); Na tabela 3, *Physalaemus centralis* não demonstrou atividades sobre os esporângios e esporos e seu grau de inibição à proliferação do fungo, de

acordo com a tabela 4, foi de 5%; Na tabela 2, *Elachistocleis ovalis*, em Rio Claro (SP), não apresentou infecção por *Bd* (TOLEDO et al., 2006); Na tabela 3, *Elachistocleis bicolor* não alterou as características dos esporângios e esporos e na tabela 4, apresentou grau de inibição de 54% à proliferação do fungo; Na tabela 4, as espécies do gênero *Leptodactylus* apresentaram grau de inibição de entre três e quatro por cento de inibição à proliferação ao fungo, com exceção de *L. latrans*, que apresentou grau de inibição de 20%; Na tabela 3, as espécies de *Leptodactylus* não demonstraram atividade significativa sobre os esporângio e esporos; Conforme dados da tabela 2, nenhum indivíduo de *Leptodactylus* apresentou infecção por *Bd* (TOLEDO et al., 2006; BURKE, 2011).

As espécies *Lithobates catesbeianus* e *Xenopus leavis* são resistentes à quitridiomiose, por mecanismos ainda não elucidados (FISHER & GARNER, 2007; GERVASI et al., 2013). Segundo GERVASI et al., (2013), *L. catesbeianus* é resistente a determinadas cepa do fungo e susceptível a outras. A secreção bruta de *L. catesbeianus*, neste trabalho, apresentou atividade sobre os zoosporângios, mas não sobre os zoósporos. FISHER & GARNER (2007) relatam ainda em seus trabalhos, que essas espécies atuam como vetores de disseminação do fungo quitrídio, uma vez que são espécies exóticas adaptáveis ao ambiente ao qual venham a ser inseridos. De acordo com a tabela 2, girinos de *L. catesbeianus* analisados por TOLEDO et al., (2006), nas localidades de S. Luiz do Paraitinga (SP) e Jaboticabal (SP), não apresentaram a infecção por *Bd*. Na tabela 3 é demonstrado que a secreção de *L. catesbeianus* provocou alterações nas características observadas dos esporângios. Na tabela 4, o grau de inibição ao desenvolvimento do *Bd* foi de 2%.

ROLLINS-SMITH et al., (2002) comparam a atividade dos compostos bioativos, presentes nas secreções de *L. castebeianus*, e *R. pipiens*, espécie que sofre declínio em Serra Nevada (EUA), ambas, do gênero *Ranidae*, que produzem peptídeos antimicrobianos semelhantes e que, numa espécie apresenta atividade efetiva contra o Bd e, na outra, não apresenta atividade (tabela 9). O estudo levanta a hipótese de que fatores fisiológicos, como a possível queda de imunidade, consequência da redução de linfócitos circulantes no sangue, devido às baixas temperaturas, fazerem da *R. pipiens* uma espécie susceptível à quitridiomicose, sugerindo a hipótese de que a temperatura também é um fator de influência, no que tange a susceptibilidade de indivíduos ao *B. dendrobatidis*, mesmo àqueles que produzem compostos antimicrobianos eficientes contra o fungo (ROLLINS-SMITH et al., 2002).

## **6.2. *Ameerega flavopicta***

A espécie *A. flavopicta*, tanto nos ensaios de secreção bruta, quanto nos ensaios com as frações, apresentou marcante atividade contra os zooporângios e apresentou atividade também contra os zoósporos. MACFOY et al., (2005) apresenta um trabalho com o título: Alcaloides da pele de anfíbios anuros: Função Antimicrobiana? Nesse trabalho, Macfoy e sua equipe realizaram ensaios antimicrobianos com os principais alcaloides presentes nas secreções de anfíbios: Pirrolidinas, Piperidinas, Decahidroquinolinas. Indolizidinas, Histrionicotoxinas e Pumiliotoxinas, contra a bactéria Gram-positiva, *Bacillus subtilis*; Gram-negativa, *Escherichia coli* e contra o fungo *Candida albicans*. Atendo-nos ao foco do trabalho, que seria a possível ação antifúngica de compostos alcaloides, MACFOY et al., (2005) citou: “O fungo *C. albicans* foi severamente sensível, mas não a todos os

compostos alcaloides. Pirrolidinas e Piperidinas foram os compostos mais potentes contra *C. albicans*. Ainda, a Decahidroquinolina, com um grupo polar metoxi na terminação da cadeia estendida da molécula, mostrou-se inativo contra bactérias, porém, ativo contra *C. albicans*.” MACFOY et al., (2005) conclui seu trabalho com uma afirmação: “Os resultados indicam que certos componentes relacionados à classe dos alcaloides encontrados nos venenos da pele dos anfíbios, possuem significativa ação antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e uma atividade antifúngica pouco significativa.” Uma vez que não foi realizada espectrometria de massa das frações que apresentaram atividade, não foi possível representar quais foram os compostos responsáveis pela redução da viabilidade do fungo.

Um trabalho de MORTARI et al., 2004 demonstra que a secreção de *Epipedobates flavopicta* (Dendrobatidae), apresenta Pumiliotoxina (PTX)-251D, que possui ação cardiotóxica e miotônica, aparentemente, por estimular efeitos nas funções de canais para sódio, com simultânea estimulação de influxo de cálcio do meio extracelular para o meio intracelular. Há também na composição da secreção, a presença de Histrionicotoxina (HTX), alcaloide de baixa toxicidade em mamíferos, atuante em canais para sódio e potássio voltagem-dependentes de nervo e músculo, reduzindo a condutividade e causando bloqueio do receptor nicotínico na junção neuromuscular (MALEQUE, 1984). Há ainda, as Decahidroquinolina (DHQ), alcaloide que tem sido isolado de diversas espécies de dendrobatídeos e frequentemente ocorrente em conjunto com Histrionicotoxina (SCHWARTZ et al., 2007). O mecanismo de ação das DHQs não são totalmente elucidados, mas parece estar relacionado à atividade das HTXs (DALY et al. 1987).

Não há relatos de infecção em indivíduos da espécie *A. flavopicta*, contudo, seria precoce afirmar que se trata de espécie resistente à quitridiomíose, visto

que há registro de indivíduos da mesma família, porém em ambientes que talvez sejam mais favoráveis ao fungo, que apresentaram infecção (tabela 2).

### 6.3. *Phyllomedusa azurea*

Trabalhos publicados por ROLLINS-SMITH et al., (2002 e 2005) e CONLON (2011), entre outros autores, descrevem peptídeos com atividade antimicrobiana contra zoósporos de *Bd*. A tabela 9 apresenta a relação de espécies, os peptídeos que produziram efeitos positivos em zoósporos de *Bd*, sua sequência de aminoácidos e as concentrações mínimas inibitórias (MIC), publicados nos trabalhos de ROLLINS-SMITH et al., (2002 e 2005) e CONLON (2011). Dentre os antimicrobianos efetivos contra o *Bd* apresentados na tabela 9, podemos destacar a Dermaseptina, peptídeo presente no veneno de *Phyllomedusa sauvagii*, com atividade em baixa concentração (MIC = 23 µM) contra o fungo.

**Tabela 9.** Peptídeos com atividade antimicrobiana contra zoósporos de *B. dendrobatidis* publicados nos trabalhos de L.A. Rollins-Smith et al (2002 e 2005) e J. Michael Conlon (2011).

Família	Espécie	Peptídeo	Sequência	MIC (µM)
Hylidae	<i>Litoria aurea</i> , L.	aurein 2.1	GLLDIVKKVVGAFGSL-NH2	200
	<i>raniformis</i>			
	<i>L. caerulea</i> , L.	caerin 1.1	GLLSVLGSAKHVLPVVPVIAEHL-NH2	25-50
	<i>splendida</i>			
	<i>L. chloris</i>	caerin 1.9	GLFGVLGSAKHVLPVVPVIAEKL-NH2	25-50
	<i>L. caerulea</i>	caerin 4.1	GLWQKIKSAAGLDLASGIVEGIKS-NH2	>200
	<i>L. citropa</i>	citropin 1.1 mod17	GLFAVIKKVAAVIKKL- NH2	100-200
	<i>L. dahlia</i>	dahlein 5.6	GLLASLGKVFGGYLAEKLPK-OH	200
	<i>L. infrarenata</i>	frenatin 3	GLMSVLGHAVGNVGGFKPKS-OH	100
	<i>L. genimaculata</i>	maculatin 1.1	GLFGVLAKVAAHVPAIAEHF-NH2	25-50
	<i>L. rubella</i>	tryptophyllin 1.2	FPWL-NH2	>200
	<i>Phyllomedusa sauvagii</i>	Dermaseptin	ALWKTMLKKLGTMALHAGKAALGAAA-DTISQGTQ.NH2	23

<b>Leptodactylidae</b>	<i>Leptodactylus fallax</i>	Fallaxin	GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL.NH2	100
<b>Myobatrachidae</b>	<i>Uperoleia mjobergii</i>	uperin 3.6	GVIDAAKKVVNVLKNLF-NH2	100
<b>Pipidae</b>	<i>Xenopus laevis</i>	CPF	GFASFLGKALKKAALKIGANLLGGTPQQ-OH	50
	<i>X. laevis</i>	magainin I	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	47
	<i>X. laevis</i>	magainin II	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	200
	<i>X. laevis</i>	PGLa	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL.NH2	100
<b>Ranidae</b>	<i>Rana boylii</i>	brevinin-1BYa	FLPILASLAAKFGPKLFCLVTKKC	6.25 -12.5
	<i>R. tarahumarae</i>	brevinin-1TRa	FLPVIAGIAANVLPKLFCKLTKRC	12.5
	<i>R. ornativentris</i>	brevinin-2Ob	GIFNVFKGALKTAGKHVAGSLLNQL-KCKVSGEC	6.25
	<i>R. areolata</i>	esculentin-1A	GLFPKFNKKKVKTGIFDIIKTVGKE-AGMDVLRGTGIDVIGCKIKGEC	12.5
	<i>R. luteiventris</i>	esculentin-2L	GILSLFTGGIKALGKTLFKMAGKA-GAEHLACKATNC	12.5
	<i>R. pipiens</i>	esculentin-2P	GFSSIFRGVAKFASKGLGKDLARLGVNLV-ACKISKQC	25
	<i>R. catesbeiana</i>	ranateurin-1	SMLSVLKNLKGKVLGFGVACKINKQC	12.5
	<i>R. boylii</i>	ranateurin-2BYa	GILSTFKGLAKGVAKDLAGNLL-DKFKCKITGC	25
	<i>R. boylii</i>	ranateurin-2BYb	GIMDSVKGLAKNLAGKLLDSLKCKITGC	12.5
	<i>R. pipiens</i>	ranatuerin-2P	GLMDTVKNVAKNLAGHMLDKLCKITGC	100
	<i>R. tarahumarae</i>	ranatuerin-2TRa	GIMDSIKGAAKEIAGHLLDNLKCKITGC	50
	<i>R. temporária</i>	temporin A	FLPLIGRVLSGIL.NH2	66
	<i>R. ornativentris</i>	temporin-1Ob	FLPLIGKILGTIL.NH2	25
	<i>R. pipiens</i>	temporin-1P	FLPIVGKLLSGLLNH2	50
	<i>R. catesbeiana</i>	ranatuerin-6	FISAIASMLGKFL.NH2	>100
	<i>R. areolata</i>	palustrin-3 <sup>a</sup>	GIFPKIIGKGIKTGIVNGIKSLVK-GVGMKVFKAAGLNNIGNTGCDNEDEC	6.25
	<i>R. catesbeiana</i>	Ranalexin	FLGGLIKIVPAMICAVTKKC	12.5
	<i>R. tagoi</i>	Melittin-related peptide	AIGSILGALAKGLPTLISWIKNR.NH2	25

A atividade de DS e PS parecem estar relacionadas à atuação nas membranas plasmáticas, causando perturbações que acabam por promover inibição de crescimento ou morte celular de microrganismos (EPAND & VOGEL, 1999; LEITE et al., 2005; BRAND et al., 2006a). Tais atividades estão relacionadas com as propriedades da membrana, devido a fatores como composição lipídica, carga e potencial de membrana que influenciam a ligação do peptídeo e sua capacidade de permeabilização. (APPONYI et al., 2004). A membrana bacteriana é rica em lipídeos e negativamente carregada devido às cabeças fosfolipídicas (ZASLOFF, 2002).

Dentre os modelos de mecanismos pelos quais PAM's provocam perturbações nas membranas, destacam-se: O modelo tábuas de barril "barrel-stave", no qual o peptídeo anfipático e helicoidal se liga paralelamente à superfície da membrana e nela se introduz, formando poros perpendiculares ao plano da membrana. Os poros formados aumentam à medida que mais monômeros são inseridos na membrana (PUKALA et al., 2006); O modelo do poro toroidal, que consiste na interação dos peptídeos com os lipídios da membrana, formando poros aquosos, pelos quais os íons fluem livremente, provocando distúrbios à membrana celular (SHAI, 2002); O modelo carpete (modo de ação atribuído às DS), no qual os peptídeos se ligam a motivos carregados negativamente na membrana celular do alvo, porções fosfolipídicas, causando desintegração da mesma quando uma determinada concentração crítica é atingida; Outro modelo, Shai-Matsuzaki-Huang, vem sendo proposto para melhor explicar a ação de PAMs, com base na formação de micelas compostas por peptídeos e fosfolipídios retirados da membrana celular que acaba por causar permeabilização e destruição da mesma (BECHINGER & LOHNER, 2006). Este mecanismo envolve tanto a formação de poros quanto a de carpetes (ZASLOFF, 2002). É importante ressaltar que em cada espécie de



*Phyllomedusa* já estudada, são encontrados vários análogos dessas famílias de PAMs, o que provavelmente confere a capacidade de defesa contra uma ampla gama de patógenos (MOR et al., 1994; LEITE et al., 2005). Essa variedade pode também estar relacionada a um possível modo de ação, baseado na sinergia de diferentes componentes de uma ou diferentes famílias de moléculas, de modo que venha a potencializar ou tornar seletiva a atividade antimicrobiana (MOR et al., 1994).

No ensaio de inibição à proliferação do *Bd*, tanto com a secreção bruta, como no ensaio com as frações, o veneno de *P. azurea*, apresentou marcante atividade contra os zoosporângios, embora algumas frações tivessem apresentado, também, atividade contra os zoósporos. A análise de viabilidade apresentou resultados que se corroboram nas duas técnicas. Comparando os resultados deste ensaio, com os resultados demonstrados por ROLLINS-SMITH et al., (2002 e 2005) e CONLON (2011), infere-se que as Desmaseptinas e Filoseptinas presentes em *P. azurea* (BRAND et al., 2006a; CHEN et al., 2006) atuam como agentes antimicrobianos contra o *Bd*, corroborando com os resultados deste trabalho. Contudo, seria precoce afirmar que *Phyllomedusa azurea* é resistente à quitridiomiose, uma vez que há muitos anfíbios da família Hylidae acometidos pela doença (TOLEDO, 2006).

#### **6.4. *Rhinella mirandaribeiroi***

Os resultados do ensaio com as frações de *R. mirandaribeiroi* demonstraram atividade de inibição ao desenvolvimento do *Bd*, de forma mais significativa com as frações F1, F5, F9, F10, F13, F14, F16, F17. As frações F10 e F14 foram as mais se aproximaram do C(+) (100% de inibição), apresentando resultados de inibição em torno de 75%. O resultado de espectrometria de massas para a fração F6, de massa molecular experimental de 203.00 Da, sugere

uma possível presença de Deidrobufotenina (202,9 Da), esta, demonstrada por MACIEL et al., (2003), em um trabalho que caracteriza quimicamente as indolalquilaminas presentes na secreção cutânea de *Rhinella rubescens*, podendo portanto, corroborar a hipótese. A Fração F10 apresentou componentes com massa molecular de 402,32 Da, que sugere a presença de Telocinobufagina, que pode ser corroborado por CUNHA FILHO et al., (2005), que demonstrou a atividade de compostos antimicrobianos de *Rhinella rubescens*, como Telocinobuagina, com 402.5238 Da. A Telocinobufagina apresenta atividade antimicrobiana, como inibição do crescimento em cepas de *S. aureus* e *E. coli* (CUNHA FILHO et al., 2005). Contudo, contra *B. dendrobatidis*, não há atividade descrita. A fração F13, assim como a F10, com grande atividade contra o *Bd* apresentou massa molecular experimental de 386,3 Da, que sugere tratar-se de Bufalina, outro esteroide presente em anfíbios da família Bufonidae. SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., (2014) purificou e isolou os compostos ativos de *Rhinella schneideri*, apontando a Bufalina, com massa molecular experimental de 387,4 Da, o que reforça a ideia de que a F13 possa ter alguma relação com a Bufalina.

A Bufalina é utilizada na China, como ingrediente ativo quimioterapêutico, presente no medicamento anticancerígeno chinês chamado Chan-Su (XIE et al., 2011). A bufalina atua como indutor de apoptose, inibindo a proliferação de células tumorais de diversos tipos de cancer em humanos, através da parada do ciclo celular e apoptose, mas o seu mecanismo exato de ação não foi completamente elucidado (XIE et al., 2011). No ensaio de inibição à proliferação do *Bd* com reação por Azul de Tripiano, até o momento da observação ao microscópio, não foi notada uma atividade significativamente inibitória da fração F13.

SHARON et al., (2009) descreve a possibilidade de indução de apoptose em fungos, como forma de inibição e controle da sua atividade. O papel emergente da apoptose como um regulador chave do desenvolvimento de fungos sugere que pode ser possível desenvolver novos meios de controle de infecções fúngicas, através da manipulação de apoptose. No entanto, a apoptose tem sido descrita e estudada em apenas algumas espécies de fungos (Ex.: *Saccharomyces cerevisiae*). Embora os genes homólogos de apoptose possam ser identificados em todos os genomas de fungos. Até agora, apenas um punhado de genes foram analisados funcionalmente e mais pesquisas são necessárias para identificar os componentes moleculares e os mecanismos celulares que controlam a apoptose em fungos. Alguns fatores que induzem apoptose em fungos são: Exposição à luz Ultra-violeta (UV), estresse oxidativo, tratamento com antimicrobianos de amplo espectro e atividade de antifúngico específico (SHARON et al., 2009).

Neste trabalho foi notória a atividade inibitória da fração F10, que estima-se tratar-se da Telecinobufagina, entretanto, o mecanismo de ação dos componentes da fração, bem como a real composição da fração não foram elucidados.

A fração F6, uma possível deidrobufotenina, que MACIEL et al., (2003), demonstrou ter massa molecular de 202,9 Da, valor que se assemelha ao encontrado na espectrometria de massas da fração, 203,00 Da, não apresentou atividade efetiva contra o *Bd*. A Deidrobufotenina é uma amina indólica, que apresenta ação farmacológica de estimulação da musculatura lisa em mamíferos (SCHWARTZ et al., 2007). Não há trabalhos que demonstre a atividade de deidrobufotenina contra *B. dendrobatidis*.

## 6.5. Resistência e Susceptibilidade

Segundo PEREIRA (2004), "**Resistência** é o conjunto de mecanismos do organismo que servem de defesa contra a invasão ou multiplicação de agentes infecciosos ou contra efeitos nocivos de seus produtos tóxicos e depende da nutrição, da capacidade de reação a estímulos do meio, de fatores genéticos, da saúde geral, estresse, ou da imunidade." "**Susceptibilidade** é a medida de fragilidade, a possibilidade de adoecimento por determinado agente, fator de risco ou conjunto de causas."

Tomando como parâmetros as atividades das secreções cutâneas dos anfíbios testados, este trabalho indicaria como possíveis resistentes ao *Bd* na área do Cerrado, as sete espécies das quais as secreções apresentaram atividade inibitória ao crescimento do fungo, entretanto, é precoce afirmar que estas espécies são resistentes à quitridiomiose. Da mesma forma, afirmar que as 16 espécies restantes seriam susceptíveis à infecção por *Bd*, poderia ser equivocado, visto que há outros fatores a serem considerados, por exemplo, a fisiologia do animal e as condições ambientais do Cerrado.

## 7. CONCLUSÃO

O fungo *B. dendrobatidis* tem posto em risco a manutenção e a preservação de comunidades de anfíbios distribuídas pelo mundo. Este trabalho demonstra um dos diversos mecanismos naturais de defesa dos anfíbios contra o fungo causador da quitridiomiose: A capacidade que algumas espécies podem apresentar no controle e inibição à proliferação do *Bd* através da atividade da sua secreção cutânea. Este trabalho abre possibilidades de estudos para a caracterização e

elucidação dos compostos efetivos contra o fungo quitrídio, além da exploração de outros fatores de influência no combate à quitridiomicose.

Os anfíbios, excelentes bioindicadores do ambiente, são produtores de uma infinidade de compostos bioativos efetivos no controle de pragas, compostos com atividades farmacológicas de interesse científico e são elementos ativos no equilíbrio ambiental, portanto, precisam ser preservados.

## 8. ANEXO

O presente projeto foi contemplado pelo CNPq universal 2012 Faixa A, processo 478.027/2012-5.

Autorização do Ministério do Meio Ambiente – MMA e Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade – ICMBio, sob registro 41555-1, para manuseio e extração de secreção de anfíbios das áreas citadas na autorização.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPONYI, M. A.; PUKALA, T. L.; BRINKWORTH, C. S.; MASELLI, V. M.; BOWIE, J. H.; TYLER, M. J.; BOOKER, G. W.; WALLACE, J. C.; CARVER, J. A.; SEPAROVIC, F.; DOYLE, J.; LLEWELLYN, L. E. Host-defence peptides of the Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. **Peptides**, v. 25, p. 1035-1054, 2004.
- BARRA, D. & SIMMACO, M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. **Tibtech**, v. 13, p. 205-209, 1995.
- BECHINGER, B. & LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1758, p. 1529-39, 2006.
- BERGER, L.; SPEARE, R.; DASZAK, P.; GREEN, D.E.; CUNNINGHAM, A.A.; GOGGIN, C.L.; SLOCOMBE, R.; RAGAN, M.A.; HYATT, A.H.; MCDONALD, K.R.; HINES, H.B.; LIPS, K.R.; MARANTELLI, G.; PARKES, H. Chytridiomycosis causes amphibian mortality

- associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 9031–9036, 1998.
- BERGER, L.; HYATT, A.D.; SPEARE, R.; LONGCORE, J.E. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms** **68**, v. 22, p. 51–63, 2005a.
- BERGER, L.; SPEARE, R.; SKERRATT, L.F. Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs *Litoria caerulea* with severe chytridiomycosis. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, p. 65–70, 2005b.
- BERTOLUCI, J. & HEYER, W.R. Boracéia Update. **Froglog**, v. 14 p. 3, 1995.
- BLAUSTEIN, A.R.; ROSS, A.A.; HARRIS, R.N. The value of well-designed experiments in studying diseases with special reference to amphibians. **EcoHealth**, v. 6, p. 373–377, 2009.
- BOKERMANN, W. C. A. Una nueva especie de *Elosia* de la Serra da Mantiqueira, Brasil. **Neotropica**, v. 10, p. 102–107, 1964.
- BRADLEY, G.A.; ROSEN, P.C.; SREDL, M.J.; Jones, T.R.; Longcore, J.E. Chytridiomycosis in native Arizona frogs. **J Wildl Dis**, v. 38, p. 206–212, 2002.
- BRAND, G.D.; LEITE, J.R.S.A.; DE SÁ MANDEL, S.M.; MESQUITA, D.A.; SILVA, L.P.; PRATES, M.V.; BARBOSA, E.A.; VINECKY, F.; MARTINS, G.R.; GALASSO, J.H.; KUCKELHAUS, S.A.S.; SAMPAIO, R.N.R.; FURTADO JR., J.R.; ANDRADE, A.C.; BLOCH JR, C. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v. 347, p. 739-46, 2006a.
- BROWN, K.L.; HANCOCK, R.E.W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Curr Opin Immuno**, v. 18(1) p. 24-30, 2006.
- BURKE, J. C. **Presença de *Batrachochytrium dendrobatidis* em anuros de vida livre, sem lesões aparentes, do município de Boracéia-SP.** 2011. 49 f. Dissertação (mestrado) – Instituto de Ciências da saúde da Universidade Paulista, São Paulo, 2011.
- CALDWELL, J.P. The evolutionary of myrmecophagy and its correlates in poison frogs. **J. Zoology**, v. 240, p. 75-101, 1996.

- CARNAVAL, A.C.O.Q.; PEIXOTO, O.L. A new species of *Hyla* from northeastern Brazil (Amphibia, Anura, Hylidae). **Herpetologica**, v. 60, p. 387-395, 2004.
- CARNAVAL, A.C.O.Q.; PUSCHENDORF, R.; PEIXOTO, O.L.; VERDADE, V.K.; RODRIGUES, M.T. Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic Rain forest. **Ecohealth**, v. 3(1), p. 41-48, 2006.
- CHEN, T.; ZHOU, M.; GAGLIARDO, R.; WALKER, B.; SHAW, C. Elements of the granular gland peptidome and transcriptome persist in air-dried skin of the South American orange-legged leaf frog, *Phyllomedusa hypocondrialis*. **Peptides**, v. 27, p. 2129-36, 2006.
- CLARKE, B.T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Bio Ver.**, v.72, p. 365-379, 1997.
- COBEA-COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Princípios éticos da experimentação animal. São Paulo, 1991.
- COLLINS, J.P. Amphibian decline and extinction: what we know and what we need to learn. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 92, p. 93–99, 2010.
- CONLON, J.M. *et al.* Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. **Methods**, v. 42, p. 349-357, 2007.
- CONLON, J. M.; MECHKARSKA, M.; AHMEDA, E.; COQUET, L.; JOUENNE, T.; LEPRINCE J.; VAUDRY, H.; HAYES, M. P.; PADGETT-FLOHR, G. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, p. 644–649, 2011.
- COPE, E.D. Catalogues of the reptiles obtained during the Exploration of the Parana, Paraguay, Vermejo and Uruguay Rivers, by Capt. Thos. J. Page, U.S.N.; and of those procured by Lieut. N. Michler, U.S. Top. Eng., Commander of the Expedition conducting the Survey of the Atrato River. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 14, p. 346-359, 1862.
- CRUZ, C.A.G.,; PIMENTA, B.V.S. & SILVANO, D.L. Duas novas espécies pertencentes ao complexo de *Hyla albosignata* Lutz & Lutz, 1938, do leste do Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). **Bol. Mus. Nac. Zool.**, v. 503, p. 1-13, 2003.

- CUNHA FILHO, G.A.; SCHWARTZ,C.A.; RESCK, I.S.; MURTA,M.M.; LEMOS, S.S.; CASTRO, M.S.; KYAW, C.; PIRES JR.; O.R.; LEITE, J.R.S.; BLOCH JR.; C.; SCHWARTZ, E.F. Anti-microbial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. **Toxicon**, v. 45, p. 777–782, 2005.
- DALY, J.W. Alkaloids from frog skins: Selective probes for ion channels and nicotinic receptors. **Bra. J. Med Bio. Res.**, v.28, p. 1033-1942, 1995.
- DALY, J.W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **Proc. Natt. Acad. Sei. U.S.A.**, 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, p. 1023-1095, 1987.
- DALY, J.W.; GARRAFFO, H.M.; SPANDE, T.F.; JARAMILLO, C. & RAND, A.S. Dietary source for skin alkaloids of poison frogs, *Dendrobatidae*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 4, p. 943-955, 1994a.
- DALY, J.W.; GARRAFFO, H.M.; HALL, G.S.E. & COVER JR., J.F. Absence of skin alkaloids in captive-raised madagascan mantelline frogs and sequestration of dietary alkaloids. **Toxicon**, v. 35, n. 7, p. 1131-1135, 1997.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Infectiousdisease and amphibian population declines. **Diversity and Distributions**, v. 9, p. 141-150, 2003.
- DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 15, n.1462 (1-2), p. 71-87, 1999.
- DAVIDSON, E.W.; PARRIS, M.; COLLINS, J.P.; LONGCORE, J.E.; PESSIER, A.P.; BRUNNER, J. Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). **Copeia**, v. 3, p. 601–607, 2003.
- EPAND, R.M. & VOGEL, H.J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1462, p. 11-28, 1999.



- ERSPAMER, V. Biogenic amines and active polypeptides of the amphibian skin. **Annual Review of Pharmacology**, v. 11, p. 327-350, 1971.
- ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P.; ERSPAMER, G.F.; MONTECUCCHI, P.C.; DE CASTIGLIONE, R. Phyllomedusa Skin: A Huge Factory and Store-House of a Variety of Active Peptides. **Peptides**. v. 6, p. 7-12, 1985.
- ERSPAMER, V. Bioactive secretions of the amphibian integument. **Amphibian Biology**, v. 1, p. 178-350, 1994.
- ETEROVICK, P.C.; CARNAVAL, A.C.O.Q.; BORGES-NOJOSA, D.M.; SILVANO, D.L.; SEGALLA, M.V.; SAZIMA, I. An overview of amphibian declines in Brazil with new records from Serra do Cipó, State of Minas Gerais. **Biotropica**, v. 37(2), p. 166-179, 2005.
- FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. DE A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A.; WHEELER, W. C. *Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: a phylogenetic analysis and taxonomic revision*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 294, p. 1–240, 2005.
- FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. The British Mycological Society. **Fungal Biology Reviews**, v. 2-1, p. 2 – 9, 2007.
- 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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. **Science**, v. 208, p. 503-505, 1980.
- FONSECA, C. R.; et.al. Metamorfose: O declínio mundial dos anfíbios é agravado pela desconexão entre o hábitat aquático dos girinos e o hábitat terrestre dos adultos, induzida pelas atividades humanas. **Revista Scientific American Brasil**, Ed:72, mai. 2008.
- GARCIA G.; CUNNINGHAM, A.A.; HORTON, D.L.; GARNER, T.W.J.; HYATT, A.D.; HENGSTBERGER, S. *et al.* Mountain chickens *Leptodactylus fallax* and sympatric amphibians appear to be disease free on Montserrat. **Oryx**, v. 41, p. 398-401, 2007.
- GERVASI, S. S.; URBINA, J.; HUA, J.; CHESTNUT, T.; RELYEA, R. A.; BLAUSTEIN, A. R. Experimental Evidence for American Bullfrog *Lithobates catesbeianus* Susceptibility to

Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **EcoHealth**, DOI: 10.1007/s10393-013-0832-8, 2013.

GUIX, J.C.; MONTORI, A.; LIORENTE, G.A.; CARRETERO, M.A.; SANTOS, X. Natural history and conservation of bufonids in four atlantic rainforest areas of Southeastern Brazil. **Herpetological Natural History**, v. 6, p. 1-12, 1998.

HANSELMANN, R.; RODRIGUEZ, A.; LAMPO, M.; FAJARDO-RAMOS, L.; AGUIRRE, A.A.; KILPATRICK, A.M.; RODRIGUEZ, J.P.; DASZAK, P. Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. **Biological Conservation**, v. 120, p. 115–119, 2004.

HARRIS, R.N.; BRUCKER, R.M.; WALKE, J.B.; BECKER, M.H.; SCHWANTES, C.R.; FLAHERTY, D.C.; LAM, B.A.; WOODHAMS, D.C.; BRIGGS, C.J.; VREDENBURG, V.T.; MINBIOLE, K.P. Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. **ISME J**, v. 3, p. 818–824, 2009.

HAYES, M.P.; ROMBOUGH, C.J.; PADGETT-FLOHR, G.; HALLOCK, L.A.; JOHNSON, J.E.; WAGNER, R.S. et al. Amphibian chytridiomycosis in the Oregon spotted frog (*Rana pretiosa*) in Washington State, USA. **Northwest Nat.**, v. 90, p. 148–151, 2009.

HEYER, W.R.; RAND, A.S.; CRUZ, C.A.G.; PEIXOTO, O.L. Decimations, extinctions, and colonizations of frog populations in southeast Brazil and their evolutionary implications. **Biotropica**, v. 20(3), p. 230-235, 1988.

HEYER, W.R.; RAND, A.S.; CRUZ, C.A.G.; PEIXOTO, O.L.; NELSON, C.E. Frogs of Boracéia. **Arquivos de Zoologia**, v. 31(4), p. 231-410, 1990.

IZECKSOHN, E. & CARVALHO-E-SILVA, S.P. Anfíbios da Floresta Nacional Mário Xavier, município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil (Amphibia: Anura). **Cont. Avul. Hist. Nat. Bras. Ser. Zool.**, v. 39, p. 1-3, 2001.

JOHNSON, M. L.; SPEARE, R. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and disease control implications. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9.8: 922, 2003.

JUNCA, F.A. Declínio mundial das populações de anfíbios. Sitientibus Série Ciências Biológicas vol.1. Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, BA, Brasil. (1), p. 84-87, 2001.

- KILPATRICK A.M.; BRIGGS, C.J.; DASZAK, P. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. **Trends in Ecology & Evolution online**, 2009.
- KOLBY, J. E.; PADGETT-FLOHR, G. E.; FIELD, R. Amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in Cusuco National Park, Honduras. **Dis. Aquat. Org. Spec.** Ed. 4. Published online 6 May 2009. doi: 10.3354/dao02055 23, 2009.
- KRIGER, K.M.; PEREOGLOU, F.; HERO, J.M. Latitudinal variation in the prevalence and intensity of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in eastern Australia. **Conservation Biology**, v. 21, p. 1280-1290, 2007b.
- KRUGLIAK, M.; FEDER, R.; ZOLOTAREV, V.Y.; GAIDUKOV, L.; DAGAN, A.; GINSBURG, H.; MOR, A. Antimalarial activities of dermaseptin S4 derivatives. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 44, p. 2442-51, 2000.
- LA MARCA, E.; LIPS, K.R.; LOTTERS, S.; PUSCHENDORF, R.; IBANEZ, R.; RUEDA-ALMONACID, J.V.; SCHULTE, R.; MARTY, C.; CASTRO, F.; MANZANILLA-PUPPO, J.; GARCIA-PEREZ, J.E.; BOLANOS, F.; CHAVES, G.; POUNDS, J.A.; TORAL, E. & YOUNG, B.E. Catastrophic population declines and extinctions in neotropical Harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). **Biotropica**, v. 37, p. 190–201, 2005.
- LAMBERTINI, C.; RODRIGUEZ, D.; BRITO, F.B.; LEITE, D.S.; TOLEDO, L.F. Diagnóstico do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Métodos em Herpetologia. Herpetologia Brasileira**, v. 2 (1), p. 12–17, 2013.
- LAMIRANDE, E.W.; NICHOLS, D.K. Effects of host age on susceptibility to cutaneous chytridiomycosis in blue-and-yellow poison dart frogs (*Dendrobates tinctorius*). In: McKinnell, R.G., Carlson, D.L. (Eds.), *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Pathology of Reptiles and Amphibians*. Saint Paul, Minnesota, USA, p. 3–13, 2002.
- LAMPO, M.; BARRIO-AMOROS, C.; HAN, B. *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in the recently rediscovered *Atelopus mucubajiensis* (Anura, Bufonidae), a critically endangered frog from the Venezuelan Andes. **EcoHealth**, v. 3, p. 299-302, 2007.
- LAZARUS, L.H.; BRYANT, S.D.; ATTLA, M.; SALVADORI, S. Frog skin opioid peptides: A case for environmental mimicry. **Environmental Health Perspective**, v.102, p. 648-654, 1994.

- LEITE, J.R.S.A.; SILVA, L.P.; RODRIGUES, M.I.S.; PRATES, M.V.; BRAND, G.D.; LACAVA, B.M.; AZEVEDO, R.B.; BOCCA, A.L.; ALBUQUERQUE, S.; BLOCH JR, C. Phylloseptins: a novel class of anti-bacteria and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides**, v. 26, p. 565–73, 2005.
- LEITE, J.R.S.A., BRAND, G.D.; SILVA, L.P.; KUCKELHAUS, S.A.; BENTO, W.R.; ARAUJO, A.L., MARTINS, G.R.; LAZZARI, A.M.; BLOCH JR, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol*, 2007. *In press*.
- LIEM, D.S. "A new genus of frog of the family Leptodactylidae from south-east Queensland, Australia." **Memoirs of the Queensland Museum**, v. 16(3), p. 459-470, 1973.
- LINGNAU, R.; CANEDO, C.; POMBAL JR., J.P. A new species of Hylodes (Anura:Hylodidae) from the Brazilian. **Atlantic Forest**, *Copeia* 2008(3), p. 595-602, 2008.
- LISBOA, B.S.; NEVES, J.M.M.; NASCIMENTO, F.A.C.; TAVARES-BASTOS, L.; MOTT, T. New records of *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Atlantic forest of Northeastern Brazil. **North-Western Journal of Zoology**, v. 9: art.132505, 2013.
- LOHNER, K. & PRENNER, E. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1462, p. 141-156, 1999.
- LONGCORE, J.E.; PESSIER, A.P.; NICHOLS, D.K. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. **Mycologia**, v. 91, p. 219-227, 1999.
- LORIN, C.; SAIDI, H.; BELAID, A.; ZAIRI, A.; BALEUX, F.; HOCINI, H.; BELEC, L.; HANI, K.; TANGY, F. The antimicrobial peptide Dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. **Virology**, v. 334, p. 264-75, 2005.
- LUTZ, A. Batraciens du bresil. **Comptes Rendus des Soc. Biol**, v. 93, p. 137-139, 1925.
- MACIEL, N.M.; SCHWARTZ, C. A.; PIRES JR., O. R.; SEBEN, A.; CASTRO, M. S.; SOUSA, M. V.; FONTES, W.; SCHWARTZ, E. N. F. Composition of indolealkylamines of *Bufo rubescens* cutaneous secretions compared to six other Brazilian bufonids with phylogenetic implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 134, Issue 4, p. 641–649, 2003.

- MACFOY, C.; DANOSUSA, D.; SANDITA, R.; JONESB, T. H.; GARRAFFOC, H. M.; SPANDEC, T. F.; DALY, J. W. Alkaloids of Anuran Skin: Antimicrobial Function? **Z. Naturforsch**, v. 60c, p. 932-937, 2005.
- MAHONY, M.; TYLER, M.J.; AND DAVIES, M. "A new species of the genus *Rheobatrachus* (Anura: Leptodactylidae) from Queensland." **Transactions of the Royal Society of South Australia**, v. 108(3), p. 155-162, 1984.
- MALEQUE, M.A.; BROSSI, A.; WITKOP, B.; GODLESKI, S.A. & ALBUQUERQUE, E.X. Interaction of analogs of histrionicotoxin with the acetylcholine receptor ionic channel complex and membrane excitability. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 229, p. 72-79, 1984.
- MARANTELLI G.; BERGER L.; SPEARE R. & KEEGAN L. Distribution of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development. **Pacific Conservation Biol**, v. 10 (1), p. 173–179. 2004.
- MCMAHON, T.A. "Understanding Amphibian Decline: the Role of Pesticides and the Pathogenic Chytrid Fungus on Amphibians and Aquatic Communities". **Graduate School Theses and Dissertations**. <http://scholarcommons.usf.edu/etd/4727>, 2013.
- MOR, A.; NGUYEN, V.H.; DELFOUR, A.; MIGLIORE-SAMOUR, D. & NICOLAS, P. Isolation, amino acid sequence, and synthesis of demaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. **Biochemistr**, v. 30, p. 8824-8830, 1991.
- MOR, A.; HANI, K. NICOLAS, P. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specif microorganisms. **J. Biol. Chem**, v. 269, p. 316-354, 1994.
- MORGAN, J.A.; VREDENBURG, V.T.; RACHOWICZ, L.J.; KNAPP, R.A.; STICE, M.J.; TUNSTALL, T. *et al.* Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 13845–13850, 2007.
- MORTARI, M. R.; SCHWARTZ, E. N. F.; SCHWARTZ, C. A. PIRES JR., O. R.; SANTOS, M. M.; BLOCH, C. B. & SEBBEN, A. Main alkaloids from the Brazilian Dendrobatidae frog *Epipedobates flavopictus*: pumiliotoxin 251D, histrionicotoxin and decahyd-roquinolines. – **Toxicon**, 43: 303–310, 2004.

- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- NARVAES, P.; RODRIGUES, M.T. Taxonomic revision of *Rhinella granulosa* species group (Amphibia, Anura, Bufonidae), with a description of a new species. **Arquivos de Zoologia Museum de Zoologia da Univ São Paulo**, v. 40, p. 1-73, 2009.
- NASCIMENTO, A.C.; FONTES, W.; SEBBEN, A. & CASTRO, M.S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretion. **Protein and Peptide Letters**, v. 10, p. 227-238, 2003.
- NASCIMENTO, A.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; SEBBEN, A.; SOUSA, M.; FONTES, W.; CASTRO, M.S. Purification, characterization and homology analysis of ocellatin 4, a cytolytic peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus ocellatus*. **Toxicon**, v. 50, p. 1095-1104, 2007.
- NICOLAS, P. & MOR, A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 49, p. 277-304, 1995.
- NOGAWA, T.; KAMANO, Y.; YAMASHITA, A. & PETTIT, G.R. Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Ch'an su. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1148-1152, 2001.
- OREN, Z. & SHAI, Y. Mode of action of linear amphipatic alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 47, p. 451-463, 1999.
- PADGETT-FLOHR, G.E. Pathogenicity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in two threatened California amphibians. **Herpetol. Conserv. Biol.**, v. 3, p. 182–191, 2008.
- PADGETT-FLOHR, G.E.; HOPKINS, R.L. *Batrachochytrium dendrobatidis*, a novel pathogen approaching endemism in central California. **Dis. Aquat. Org.** v. 83, p. 19-24, 2009.
- PALMA, M.S.; MENDES, M.A.; MARQUES, M.R.; SOUZA, B.M.; SANTOS, L.D.; SANTOS, K.S. Fundamentos de Análise Proteômica, parte 1. São Paulo, 110p. Apostila do curso de Fundamentos em Análise Proteômica – Departamento de Biologia da UNESP-Rio Claro, 2004.
- PARRIS, M.J.; REESE, E.; STORFER, A. Antipredator behavior of chytridiomycosis-infected northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles. **Canadian Journal of Zoology**, v. 84, p. 58-65, 2006.

- PEARL, C.A.; BULL, E.L.; GREEN, D.E.; BOWERMAN, J.; ADAMS, M.J.; HYATT, A. et al. Occurrence of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Pacific northwest. **J. Herpetol**, v. 41, p. 145–149. 2007.
- PEDROSA, R. C.; FELIPE, K.B.; KVICINSKI, M.R. Protocolo de avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT – UFSC, disponível no site: <http://ppgbqa.ufsc.br/files/2011/06/protocolo-MTT.docx>, 2011.
- PEREIRA, S. D., (2004). **Conceitos e Definições da Saúde e Epidemiologia usados na Vigilância Sanitária**. São Paulo, mar. 2007. Disponível em: [http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/epid\\_visa.pdf](http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/epid_visa.pdf) (acessado em jul. 2014).
- PIOTROWSKI, J.S.; ANNIS, S.L.; LONGCORE, J. E. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. **Mycologia**, v. 96, p. 9-15, 2004.
- POMBAL JR., J.P. & HADDAD, C.F.B. Frogs of the genus *Paratelmatobius* (Anura: Leptodactylidae) with descriptions of two new species. **Copeia** 1999, p. 1014-1026, 1999.
- POMBAL JR.; J.P. & HADDAD, C.F.B.. Estratégias e modos reprodutivos de anuros (Amphibia) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, Sudeste do Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 45(15), p. 201-213, 2005.
- POUGH, F.H.; HELSER, J.B.; MCFARLAND, W.N. A vida dos Vertebrados. 2ed. São Paulo, Atheneu, 1999.
- POUNDS, J.A.; BUSTAMANTE, M.R.; COLOMA, L.A.; CONSUEGRA, J.A.; FOGDEN, M.P.L.; FOSTER, P.N.; LA MARCA, E.; MASTERS, K.L.; MERINO-VITERI, A.; PUSCHENDORF, R.; RON, S.R.; SÁNCHEZAZOFEITA, G.A.; STILL, C.J.; YOUNG, B.E. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. **Nature**, v. 439, p. 161-167, 2006.
- PUKALA, T. L.; BOWIE, J. H.; MASELLI, V. M.; MUSGRAVE, I. F.; TYLER, M. J. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. **The Royal Society of Chemistry**, v. 23, p. 368-393, 2006.
- RACHOWICZ, L.J.; KNAPP, R.A.; MORGAN, J.A.; STICE, M.J.; VREDENBURG, V.T.; PARKER, J.M. et al. Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. **Ecology**, v. 87, p. 1671–1683, 2006.

- RINALDI, A. C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: An expanding scenario. **Cur. Op. Chem. Biol**, v. 6, p. 799–804, 2002.
- ROLLINS-SMITH, L.A.; CAREY, C.; LONGCORE, J.E.; DOERSAM, J.K.; BOUTTE, A.; BRUZGAL, J.E.; CONLON, J. M. Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. **Dev Comp Immunol**, v. 26, p. 471–479, 2002.
- RON, S.R. Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. **Biotropica**, v. 37(2), p. 209-221, 2005.
- ROLLINS-SMITH, L.A.; CONLON, J.M. Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. **Dev. Comp. Immunol**, v. 29, p. 589–598, 2005.
- ROSENBLUM, E.B.; STAJICH, J.E.; MADDOX, N.; EISEN, M.B. Global gene expression profiles for life stages of the deadly amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 17034–17039, 2008.
- ROSENBLUM, E.B.; POORTEN, T.J.; SETTLES, M.; MURDOCH, G.K.; ROBERT, J.; MADDOX, N.; EISEN, M.B. Genome-wide transcriptional response of *Silurana* (*Xenopus*) *tropicalis* to infection with the deadly chytrid fungus. **PloS one** 4, e6494, 2009.
- SCHLOEGEL, L.M.; TOLEDO, L.F.; LONGCORE, J.E.; GREENSPAN, S.E.; VIEIRA, C.A.; LEE, M.; ZHAO, S.; WANGEN, C.; FERREIRA, C.M.; HIPOLITO, M.; DAVIES, A.J.; CUOMO, C.A.; DASZAK, P.; JAMES, T.Y. Novel panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. **Molecular Ecology**. v. 21, p. 5162–5177, 2012.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; QUISPE, C.; THEODULOZ, C.; SOUSA JR., P. T.; PARIZOTTO, C. Antiproliferative activity and new argininy l bufadienolide esters from the “cururú” toad *Rhinella* (*Bufo*) *schneideri*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1076-1085, 2014.
- SCHWARTZ, C.A.; CASTRO, M.S.; PIRES JR., O.R.; MACIEL, N.M.; SCHWARTZ, E.N.F.; SEBEN, A. Princípios bioativos da pele de anfíbios: panorama atual e perspectivas. In: Nascimento, L.B., Oliveira, M.E., Ed(s). *Herpetologia no Brasil II*. Belo Horizonte: **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, p.143-168, 2007.



- SBH (Sociedade Brasileira de Herpetologia), 2012. Lista oficial de espécies de anfíbios do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível em [www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfíbios.htm](http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfíbios.htm) (acessado em julho de 2014).
- SEBBEN, A.; SCHWARTZ, C.A. & CRUZ, J.S. A defesa química dos anfíbios. **Ciência Hoje**, v. 15, p. 25-33, 1993.
- SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **BiopolymersN**, v. 66, p. 236-48, 2002.
- SHARON, A.; FINKELSTEIN, A.; SHLEZINGER N. & HATAM, I. Fungal apoptosis: function, genes and gene function FEMS. **Microbiol Rev**, v. 33, p. 833–854, 2009.
- SHEAFOR, B.; DAVIDSON, E.W.; PARR, L.; ROLLINS-SMITH, L. Antimicrobial peptide defenses in the Salamander, *Ambystoma Tigrinum*, against emerging amphibian pathogens. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44(2), p. 226–236, 2008.
- SILVANO, D.L.; SEGALLA, M.V. Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade**, Curitiba, PR, Brasil. v. 01 (1), p. 25, 2005.
- SKERRATT, L.F.; BERGER, L.; HINES, H.B.; MCDONALD, K.R.; MENDEZ, D.; SPEARE, R. Survey protocol for detecting chytridiomycosis in all Australian frog populations. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 80, p. 85-94, 2008.
- SPEARE, R. AND L. BERGER. Global distribution of chytridiomycosis in amphibians. Available: <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/chyglob.htm>. [accessed May 2, 2006], 2000.
- SYMONDS, E.P.; TROTT, D.J.; BIRD, P.S.; MILLS, P. Growth characteristics and enzyme activity in *Batrachochytrium dendrobatidis* isolates. **Mycopathologia**, v. 166, p. 143–147, 2008.
- TAKARADA, K.; KIMIZUKA, R.; TAKAHASHI, N.; HONMA, K.; OKUDA, K.; KATO, T.A. Comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p. 61-4, 2004.
- TEMPONE, A.G.; PIMENTA, D.C.; LEBRUN, I.; SARTORELLI, P.; TANIWAKI, N.N.; DE ANDRADE JR., H.F.; ANTONIAZZI, M.M.; JARED, C. Antileishmanial and

- antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon**, v. 52, p. 13–21, 2008.
- TOLEDO, L.F.; BRITTO, F.B.; ARAUJO, O.G.S.; GIASSON, L.M.O.; HADDAD, C.F.B. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. **South American Journal of Herpetology**, v. 1, p. 185-191, 2006a.
- TOLEDO, L.F.; HADDAD, C.F.B.; CARNAVAL, A.C.O.Q.; BRITTO, F.B. A Brazilian anuran (*Hylodes magalhaesi*: Leptodactylidae) infected by *Batrachochytrium dendrobatidis*: a conservation concern. **Amphib. Reptile Conserv**, v. 4(1), p. 17-21, 2006.
- TOLEDO, R.C.; JARED, C. Histologic study of the lumbar glands of *Pleurodema thaul* (amphibian, Anura, Leptodactylidae) **Rev. Bras. Biol.**, v. 47, p. 257-264, 1989.
- TOLEDO, R.C.; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comp. Biochem. Physiol**, v. 111, p. 1-29, 1995.
- VIEIRA, C.A.; ALMEIDA, C.H.L.N.; LAMBERTINI, C.; LEITE, D.S.; TOLEDO, L.F. First Record of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Paraná, Brazil, v. 43, p. 93-94, 2012.
- VIEIRA, C. A. & TOLEDO, L. F. Protocolo II: Isolamento, cultivo e armazenamento de *Batrachochytrium dendrobatidis*, 2011. Acessível em: <http://www.naturalhistory.com.br/bd.html>.
- VIEIRA, C.A.; TOLEDO, L.F.; LONGCORE, J.E.; Body length of *Hylodes ornatus* and *Lithobates catesbeianus* tadpoles, depigmentation of mouthparts, and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* are related. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73: in press, 2013.
- VOYLES, J.; YOUNG, S.; BERGER, L.; CAMPBELL, C.; VOYLES, W.F.; DINUDOM, A.; COOK, D.; WEBB, R.; ALFORD, R.A.; SKERRATT, L.F.; SPEARE, R. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. **Science**, v. 326, p. 582–585, 2009.
- WEYGOLDT, P. Changes in the composition of mountain stream frog communities in the Atlantic mountains of Brazil: frogs as indicators of environmental deteriorations? **Stud. Neotrop. Fauna Environ.**, v. 24(4), p. 249-255, 1989.

XIE, C.M.; CHAN, W.Y.; YU, S., ZHAO, J.; CHENG, C.H.K. Bufalin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation and JNK activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 1365–1375, 2011.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus laevis* skin: Isolation, characterization of two active forms and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 84, p. 5449-5453, 1987.

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

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16(2), p. 109-10, 1983.