

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E

COMPORTAMENTO

DAISY PEREIRA MUNIZ

ESTUDO DO AUMENTO DA PERMEABILIDADE VASCULAR

INDUZIDO PELO EXTRATO BRUTO E PELA FRAÇÃO

HEMOLÍTICA DA ANÊMOMA DO MAR

Bundosoma caissarum

Orientador: Prof. Dr. Mauro Nicolau

Florianópolis

1998

“ESTUDO DO AUMENTO DA PERMEABILIDADE VASCULAR
INDUZIDO PELO EXTRATO BRUTO E PELA FRAÇÃO HEMOLÍTICA
DA ANÊMOMA DO MAR *Bunodosoma caissarum*”

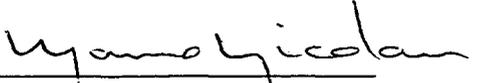
DAISY PEREIRA MUNIZ

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

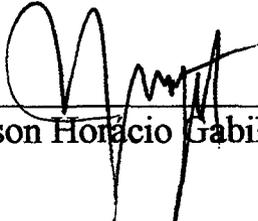
MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento.

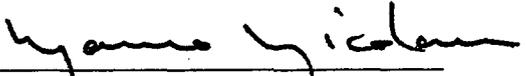
Orientador


Mauro Nicolau

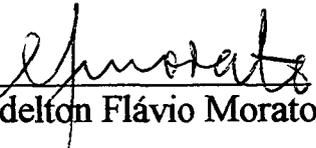
Coordenador do Curso


Nelson Horácio Gabilan

Banca Examinadora


Mauro Nicolau (Presidente)


Caden Souccar


Edelson Flávio Morato

DAISY PEREIRA MUNIZ

**ESTUDO DO AUMENTO DA PERMEABILIDADE VASCULAR
INDUZIDO PELO EXTRATO BRUTO E PELA FRAÇÃO
HEMOLÍTICA DA ANÊMOMA DO MAR**

Bunodosoma caissarum

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Nicolau.

**Florianópolis
1998**

À DEUS, pelo dom da vida, discernimento e sabedoria.

AOS MEUS PAIS, pelo incentivo, amizade e confiança.

À MINHA AVÓ, pelo carinho e estímulo.

Minha Eterna Gratidão!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Mauro Nicolau pela orientação, sugestões e o crescimento profissional durante a execução do trabalho.

Ao Professor Dr. Nelson Gabilan, pelas sugestões e orientação do presente trabalho.

À Professora Danusia Silva, pela correção da redação deste trabalho.

Ao amigo Luiz Fernando, pelo incentivo, sugestões construtivas que ajudaram a despertar um espírito crítico e habilidade para execução do presente trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica Alexandre Ribas e Marcos Feltrin, que auxiliaram nos experimentos.

Em especial, aos alunos, Richard Vitor e Paulo Wille, que auxiliaram em algumas técnicas.

À técnica Luciane P.N. Häckl, que auxiliou na preparação de reagentes e drogas para os experimentos.

À amiga Luciane pela amizade, carinho e companheirismo.

À amiga Neuseli, pela disponibilidade na digitação deste trabalho.

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

***“ Os caminhos para se chegar ao topo da montanha,
devem ser percorridos com esforço, discernimento
e resignação, os quais possa valer a pena chegar ao fim!”***

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	10
1.1- Anêmonas do mar	10
1.2- Produtos Naturais.....	11
1.2.1- Compostos ativos em Celenterados.....	13
1.2.2- Atividades Biológicas em Anêmonas do Mar.....	14
1.2.2.a- Ação em Canais Iônicos.....	14
1.2.2.b- Atividade Hemolítica.....	15
1.2.2.c- Atividade Cardíaca.....	15
1.2.2.d- Liberação de Neurotransmissores.....	16
1.3- Processo Inflamatório.....	16
1.3.1- Os Principais Mediadores da Inflamação.....	19
1.3.2- Permeabilidade Vascular.....	20
2- OBJETIVO	22
3- MATERIAIS E METODOS	23
3.1- Preparação do Extrato Bruto.....	23
3.2- Filtração em Sephadryl S-200 e Biogel P-2.....	24
3.3- Dosagem de Proteína.....	24
3.4- Ensaio da Atividade Hemolítica.....	25
3.5- Ensaio Biológicos.....	25
3.5.1- Ensaio "in vivo".....	25
3.5.1.a- Permeabilidade Vascular no Dorso de Ratos Anestesiados.....	26
3.5.1.b- Permeabilidade Vascular em Ratos Conscientes.....	27
3.6- Equipamentos.....	28
3.7- Reagentes.....	28
3.8- Drogas.....	28
3.9 - Análise Estatística	29

4 - RESULTADOS	30
4.1 - Aumento da Permeabilidade Vascular no Dorso de Ratos Anestesiados.....	30
4.2 - Efeito do Pré-Tratamento com Antagonistas dos Mediadores Inflamatórios no Aumento da Permeabilidade Vascular Induzida pela Fração Hemolítica.....	32
4.3 - Aumento da Permeabilidade Vascular em Vários Tecidos de Ratos Conscientes.....	34
4.3.1 - Efeito do Extrato Bruto e da Fração Hemolítica sobre a Permeabilidade Vascular.....	34
4.3.2 - Efeito do RP 6570, no Extravasamento Plasmático Induzido pela Fração Hemolítica.....	40
4.3.3 - Efeito do Captopril no Extravasamento Plasmático Induzido pela Fração Hemolítica.....	42
4.3.4 - Efeito HOE 140, no Extravasamento Plasmático Induzido pela Fração Hemolítica.....	44
4.3.5 - Efeito da Indometacina no Extravasamento Plasmático Induzido pela Fração Hemolítica.....	46
4.3.6 - Efeito do L-NAME no Aumento Vascular Induzido pela Fração Hemolítica.....	48
5- DISCUSSÃO	50
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar os mediadores envolvidos no extravasamento plasmático induzido pelo extrato bruto e uma fração hemolítica isolados da anêmona do mar, *Bunodosoma caissarum* utilizando antagonistas e inibidores de síntese dos mediadores. Resultados preliminares mostraram que o extrato bruto e frações isoladas desta anêmona do mar induziram o aumento do extravasamento de proteínas plasmáticas na pele de ratos. As anêmonas do mar foram coletadas nas praias de Florianópolis (SC) e os tentáculos foram homogeneizados para a obtenção do extrato bruto. A fração hemolítica foi obtida do extrato por cromatografia em Sephacryl S-200 e Biogel P-2. Dois modelos experimentais foram utilizados para avaliar o efeito do extrato bruto e da fração hemolítica no extravasamento plasmático: injeção intradérmica no dorso de ratos anestesiados e conteúdo de azul de Evans em ratos conscientes no duodeno, estômago, íleo, pâncreas, rim e bexiga urinária. O extrato bruto aumentou o extravasamento plasmático no duodeno e íleo e a fração hemolítica no duodeno, íleo e bexiga urinária. A participação dos mediadores foi avaliada através do pré-tratamento com antagonistas seletivos da histamina (pirilamina), da substância P (RP 65780), da bradicinina (HOE 140) e de inibidores de síntese de prostaglandinas (indometacina), da enzima conversora de angiotensina (captopril) e da óxido nítrico sintase (L-NAME). Pirilamina, RP 65780, HOE 140 e indometacina inibiram o extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pela fração hemolítica. Estes resultados evidenciam que o efeito provocado pela fração hemolítica da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* seria devido à liberação de histamina, substância P, bradicinina e prostaglandinas. O aumento do extravasamento plasmático na pele, trato digestivo e bexiga urinária, antagonizado pelo RP 65780, também sugerem uma possível ação neurogênica da fração hemolítica.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to examine the involvement of mediators in plasma extravasation induced by the crude extract and a hemolytic fraction isolated from the Brazilian sea anemone, *Bunodosoma caissarum*. Sea anemones were collected on the beaches of Florianópolis (Southern Brazil) and tentacles were homogenized to obtain the crude extract. The crude extract was fractionated by Sephacryl S-200 and Biogel P-2 chromatography and a hemolytic fraction was isolated. The plasma extravasation was evaluated through two experiments: intradermic injection of the crude extract and hemolytic fraction on the skin of anesthetized rats; and using conscious rats, the tissue content of Evans Blue dye was evaluated in the duodenum, stomach, ileum, pancreas, kidney and urinary bladder. The crude extract increased the plasma extravasation in the duodenum and in the ileum, whereas the hemolytic fraction showed the same effect in the duodenum, ileum and urinary bladder. The involvement of mediators in the plasma extravasation was tested by the pretreatment with selective antagonists of histamine (pirilamine), substance P (RP 65780), bradykinin (HOE 140), and enzyme inhibitors of prostaglandin synthesis (indomethacin), angiotensin-converting enzyme (captopril) and nitric oxide synthase (L-NAME). Pirilamine, RP 65780, HOE 140 and indomethacin reduced the plasma extravasation induced by the hemolytic fraction. These data support that the effect of the hemolytic fraction from the sea anemone *Bunodosoma caissarum* is due to the release of histamine, substance P, bradykinin and prostaglandin. The increase of plasma extravasation in the skin, duodenum, ileum and urinary bladder, that was blocked by RP 65780, suggests a possible neurogenic action by the hemolytic fraction.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Anêmonas do mar

As anêmonas do mar, invertebrados que pertencem ao Phylum *Celenterata*, são encontrados na forma de pólipos solitários, amplamente distribuídos em águas oceânicas profundas e costeiras do Pacífico, Caribe, Estados Unidos, oeste da Índia, Austrália, Europa, Japão e América do Sul. Diversas espécies são encontradas em águas tropicais. Seu habitat são as rochas, troncos de árvores submersos encontrando-se algumas espécies infiltradas na lama ou na areia (Ruppert & Barnes, 1994).

Estes animais possuem estruturas especializadas de defesa, denominadas de nematocistos, que se encontram distribuídos na epiderme e aderidos aos tentáculos. Algumas anêmonas possuem finos tentáculos que se encontram alojados no corpo dentro de uma fenda protetora (Ruppert & Barnes, 1994). Geralmente alimentam-se de vários invertebrados como crustáceos, caranguejos, bivalvos e pequenos peixes. Para se alimentar a anêmona, paralisa a presa, por inoculação das toxinas destes nematocistos e

posteriormente a captura com seus tentáculos para ingeri-la. Algumas anêmonas, como a *Stichodactyla e Radianthus*, cujos tentáculos são pequenos, alimentam-se de finas partículas (Ruppert & Barnes, 1994).

As anêmonas também mantêm simbiose com alguns animais, como os organismos planctônicos, que ficam aderidos à superfície dos seus tentáculos e por toda a coluna do corpo. É o que acontece, por exemplo, com um pequeno peixe do gênero *Amphiprion* encontrado nos oceanos Pacífico e Índico. Este pequeno peixe vive simbioticamente entre os tentáculos das anêmonas, e se mantém às custas dos restos dos alimentos. Além de trazer alimento e proteger as anêmonas de alguns predadores, estes pequenos peixes removem seus tecidos necrosados. Além destes pequenos peixes, outros comensais: amphipodas, camarões, siris, estrelas do mar e outras espécies convivem com as anêmonas (Ruppert & Barnes, 1994).

1.2- Produtos Naturais

Desde a antigüidade o homem vem utilizando produtos naturais de uma maneira empírica no tratamento de várias doenças. Os produtos naturais de origem vegetal fornecem vários princípios ativos que são prescritos terapeuticamente. Nos últimos anos, alguns fatores têm colaborado para o aumento do consumo de tais recursos: o baixo poder aquisitivo, o alto custo dos medicamentos alopáticos, o difícil acesso à assistência médica e a tendência de se utilizar produtos de origem natural.

Por outro lado, estes produtos naturais são protótipos potenciais para o desenvolvimento de fármacos através da síntese de novas moléculas pela indústria farmacêutica. Deve-se ressaltar ainda, que alguns compostos usados clinicamente são

extraídos de plantas como: a pilocarpina, a morfina, a atropina entre outros.

Encontramos na literatura a descrição de várias substâncias naturais extraídas do reino vegetal e animal com atividade biológica. Além do seu uso como medicamentos, estas substâncias são também úteis como ferramentas farmacológicas. Um exemplo recente é o da capsaicina, uma substância presente em pimentas vermelhas (*Capsicum sp*) da família das Solanáceas, utilizada no estudo do mecanismo de ação da inflamação neurogênica e de outras substâncias (Inoue *et al.*, 1995).

O reino vegetal tem fornecido várias substâncias com atividade biológica tais como: a tetrodotoxina, um composto extraído de peixes da família *Tetrodontidae*, usada experimentalmente como bloqueador seletivo de canais de sódio (Prenen *et al.*, 1988); a bombesina, neuropeptídeo isolado da pele de anfíbios, *Bombina bombina* e *Bombina variegata*, um potente estimulante da liberação de gastrina (Guo *et al.*, 1989) e a toxina do escorpião *Tytius serrulatus* que possui ação hipotensora (Norton, 1991).

Em preparações isoladas de músculos de rato, o veneno da cobra *Cerastes vipera* inibiu a contração dos músculos cardíaco e esquelético e a transmissão sináptica (Alzahaby & Rowan, 1995). A conotoxina, isolada do veneno da cobra marinha *Conus geografus*, mostrou seletividade para canais de cálcio voltagem-dependente dos neurônios, e não apresentou efeito em músculo (Cruz *et al.*, 1985); a dendrotoxina, isolada do veneno da cobra africana *Dendroaspis angusticeps*, bloqueia canais de potássio voltagem-dependente e aumenta a transmissão neuromuscular por induzir liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares (Braun, 1990).

Uma fração extraída do veneno da cobra *Bothrops jararaca* deu origem a um análogo sintético, o captopril, um potente inibidor da enzima conversora da angiotensina, que é utilizado atualmente na terapia antihipertensiva (Wyvratt & Patchett, 1985; Ferreira *et al.*, 1992).

Recentemente foi isolada uma substância do coral *Sarcophyton glaucum*, denominada sarcofitol, que inibe a formação de tumor na pele de camundongo (Fujiki *et al.*, 1997).

1.2.1 - Compostos Ativos em Celenterados

Na década de 40 foram iniciados importantes trabalhos com toxinas de algumas espécies de antozoários e seus efeitos em algumas preparações farmacológicas. Somente algumas espécies foram estudadas e um grande número de substâncias caracterizadas, através dos diferentes métodos de extração, obtenção e separação destes componentes. Também neste período iniciou-se o estudo do mecanismo de ação e das ações farmacológicas das toxinas de antozoários.

Nos últimos anos realizaram-se trabalhos, focalizando os efeitos farmacológicos e toxicológicos provocados por produtos extraídos de organismos marinhos. Estes estudos revelaram a presença de substâncias com atividade biológica nestes animais (Mendes & Freitas, 1984). Ensaio biológicos realizados com algumas espécies de hidrozóários e antozoários demonstraram a presença de atividade colinérgica; bem como a participação de catecolaminas na transmissão sináptica (Mendes & Freitas, 1984). Um polipeptídeo extraído de uma anêmona do mar, *Condylactis gigantea*, prolonga a inativação de canais de Na⁺ em axônios de crustáceos. Este e outros efeitos podem estar associados com polipeptídeos específicos de muitos celenterados.

1.2.2 - Atividades biológicas em anêmonas do mar

Os celenterados secretam toxinas e alguns são peptídeos ativos que apresentam em sua maioria, atividade neurotóxica, cardioativa e hemolítica (Béress, 1982; Kem & Dunn, 1988).

No início do século, Richet, 1903 demonstrou que as toxinas da anêmona do mar *Condylactis aurantiaca* e *Aiptasia pallida* possuíam efeito tóxico em crustáceos, provocando paralisia nos mesmos.

As anêmonas do mar, também, possuem substâncias com atividade biológica e vários estudos têm relacionado estas atividades nestes animais.

1.2.2.a - Ação em Canais Iônicos

A toxina extraída da anêmona *Anemonia sulcata* bloqueia os potenciais de ação do músculo e do nervo isolados de ratos. Esta possui mecanismo de ação em canais de Na^+ e ativam canais de K^+ nas preparações neuromusculares (Nishio *et al.*, 1991; Schweitz *et al.*, 1995). A anêmona *Anthopleura xanthogrammica* possui toxinas que atuam na despolarização da membrana em preparações de músculo isolado em ratos. A toxina isolada da anêmona do mar *Stichodactyla helianthus* inativa canais de Na^+ de uma maneira similar a da toxina isolada da anêmona *Anemonia sulcata*, através de estímulos elétricos em camundongos (Salgado & Kem, 1992). Em cultura de neurônios ganglionares da raiz dorsal de ratos, a toxina inibiu as correntes de K^+ dependente de voltagem (Castáneda. *et al.*, 1995).

A toxina da anêmona *Bolocera tuediae* diminui os potenciais de membrana nas fibras

musculares dos músculos soleus e extensor longo dos dedos de ratos (Tesseraux *et al*, 1989).

1.2.2.b - Atividade Hemolítica

Trabalhos recentes demonstraram que a magnilisina, toxina isolada da anêmona *Heteractis magnifica* possui atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro. Outra toxina extraída dos tentáculos da anêmona *Actinia cari*, também, apresentou atividade hemolítica em eritrócitos bovinos e o efeito foi inibido pela esfingomielina (Turk *et al*, 1989; Sencic & Macek, 1990). A atividade hemolítica em eritrócitos de várias espécies animais tem sido observada com várias toxinas isoladas de anêmonas do mar tais como: *Actinia equina*, *Metridium senile*, *Stichodactyla helianthus*, *Anemonia sulcata*, *Actinia tenebrosa*. Todas as toxinas hemolíticas foram inibidas por esfingomielina (Bernheimer & Avigad, 1976; Macek & Lebez, 1988; Kem, 1988; Norton *et al.*, 1990).

1.2.2.c - Atividade Cardíaca

Vários autores mostraram que as toxinas isoladas de algumas anêmonas possuem atividade cardíaca. Em átrio isolado de cobaia, a tenebrosina- C, toxina isolada da anêmona do mar *Actinia tenebrosa*, bloqueou parcialmente o efeito inotrópico. Entretanto, a equinatoxina, extraída da anêmona *Actinia equina* inibiu significativamente este efeito (Alsen *et al.*, 1976; Ho *et al*, 1987; Galletis & Norton, 1990).

1.2.2.d - Liberação de Neurotransmissores

Recentemente foi demonstrado que a equinatoxina, isolada da anêmona *Actinia equina* inibe a captação de colina e GABA em preparação de sinaptossomas e que esta toxina também induz edema pulmonar (Sket *et al.*, 1974; Khoo *et al.*, 1995).

A anêmona brasileira, *Bunodosoma caissarum*, pertence à família das *Actiniidae* e encontra-se espalhada por algumas regiões do país como Espírito Santo, Arquipélago Fernando de Noronha, Rio Grande do Sul, litoral paulista e de Santa Catarina (Belém, 1988). Foram identificadas nesta anêmona neurotoxinas e hemolisinas e com atividades cardioativa e hemolítica (Malpezzi & Freitas, 1991).

Estudos preliminares, utilizando o extrato bruto dos tentáculos e frações desta anêmona do mar demonstraram que o efeito edematogênico é antagonizado por pirlamina na pele de rato (Gabilan, 1992).

1.3 - Processo Inflamatório

O processo inflamatório é um importante componente no mecanismo de defesa do organismo, que se caracteriza como a dor, calor, rubor e tumor. A inflamação é desencadeada por vários estímulos, entre estes, os agentes infecciosos, isquemia, interação antígeno-anticorpo e lesão celular ou do endotélio. Cada tipo de estímulo desenvolve uma forma característica de resposta, dependendo do agente lesivo e das características do tecido ou do órgão afetado (Rocha & Silva, 1978; Scott *et al.*, 1994). A reação inflamatória é seguida de sinais clássicos denominados de pontos cardeais como eritema, hiperalgesia e perda de função. Esta reação se desenvolve em três fases distintas, cada uma mediada por

diferentes mecanismos:

Fase aguda: caracterizada por vasodilatação local e pelo aumento da permeabilidade capilar;

Fase tardia: mais evidente, caracterizada por infiltração de leucócitos e células fagocitárias;

Fase crônica: quando ocorre fibrose e degeneração do tecido.

A vasodilatação observada na fase aguda, se deve a ação dos mediadores nas arteríolas e vênulas. Nesta fase, vários mediadores são liberados, como: as cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, prostaglandinas e as substâncias que são liberadas nas terminações nervosas locais. O exsudato que se forma, facilita a liberação de outros mediadores, ampliando a resposta inflamatória.

Na fase tardia ocorre a quimiotaxia, processo no qual as células migram para o sítio inflamatório. Na fase crônica ocorre a perda de função, que é o efeito secundário da resposta inflamatória tecidual e da dor (Gallin *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 1993).

Diversos estímulos, sejam exógenos ou endógenos desencadeiam uma reação inflamatória onde são liberados vários mediadores que ampliam este processo. Na tabela abaixo estão relacionados alguns mediadores da inflamação.

Mediadores Químicos Envolvidos na Inflamação

<i>MEDIADORES</i>	<i>FONTE</i>	<i>AÇÃO</i>
Bradicinina	Plasma	- Vasodilatação - Dor - Extravasamento de proteínas plasmáticas
Histamina	Plaquetas, mastócitos e basófilos	- Vasodilatação, - Extravasamento de proteínas plasmáticas
Prostaglandinas	Membrana celular	- Coagulação, - Vasodilatação, - Regulação da produção de mediadores
Serotonina	Plaquetas, mastócitos e basófilos	- Extravasamento de proteínas plasmáticas
Fator de Hageman ativado	Plasma	- Extravasamento de proteínas plasmáticas
Complemento (C3a, C5a)	Plasma, macrófagos	- Dor - Extravasamento de proteínas plasmáticas
Leucotrienos (LTB₄, LTD₄, LTE₄)	Neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos e mastócitos	- Extravasamento de proteínas plasmáticas, - Ativação celular, quimiotaxia

1.3.1 - Os Principais Mediadores da Inflamação

A histamina está distribuída por todo reino animal, presente em muitos venenos, bactérias e plantas (Reite, 1972). Estudos clássicos mostraram que a histamina, liberada dos mastócitos do tecido lesado, aumenta a permeabilidade vascular nas vênulas pós capilares onde a abertura de poros endoteliais levam ao aumento do extravasamento de proteínas plasmáticas (Grega *et al.*, 1981). Alguns autores tem demonstrado que a estimulação dos receptores H_1 causa vasodilatação e aumento do extravasamento plasmático na pele (Khalil & Helme, 1989).

A substância P que participa de vários processos fisiológicos, possui ação vasodilatadora, libera histamina dos mastócitos e possui efeito direto no aumento da permeabilidade vascular. Injeções intradérmicas de substância P induzem a formação de edema (Tanaka & Grunstein, 1985). Outras taquicininas encontradas em neurônios sensoriais, as neurocininas A e B também apresentam atividades semelhantes à substância P como o aumento da permeabilidade vascular, efeito vasodilatador e liberação de histamina dos mastócitos (Williams *et al.*, 1988).

A bradicinina é um potente peptídeo pró-inflamatório que produz vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular por atuar diretamente nas células endoteliais. Estimula as respostas inflamatórias através dos seus próprios receptores nas células efetadoras ou, indiretamente, pela liberação de mediadores das células intermediárias (Holzer, 1988).

A serotonina é um potente mediador da inflamação. A serotonina endógena aumenta a responsividade dos mecanorreceptores sensoriais em tecido inflamado cronicamente. É um potente vasodilatador, aumenta diretamente a permeabilidade vascular

e produz edema local em ratos (Reid *et al.*, 1995).

O óxido nítrico tem sido descrito como um importante mediador em muitos tipos de inflamação como por exemplo a neurogênica (Lippe *et al.*, 1993). Além deste papel, possui função importante na vasodilatação, por ter atividade biológica ligada ao fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) e também por estar envolvido na regulação do tônus vascular (Moncada *et al.*, 1991).

As prostaglandinas são liberadas por ação mecânica, térmica, química e outros, contribuindo para iniciar os sinais da inflamação. As prostaglandinas não atuam diretamente na permeabilidade vascular, mas aumentam o edema e a infiltração de leucócitos promovendo um fluxo sanguíneo na região inflamada. As prostaglandinas causam edema na pata de ratos, mas ainda não está claro se estas aumentam a permeabilidade nas vênulas pós capilares, sem a participação de outros mediadores inflamatórios (Moncada *et al.*, 1978).

1.3.2 - Permeabilidade Vascular

O aumento da permeabilidade vascular é uma importante reação primária inflamatória induzida pelos vários mediadores químicos que vão interagir com receptores específicos no sistema vascular (Williams *et al.*, 1988).

Os mediadores pró-inflamatórios como a histamina, bradicinina, serotonina e substância P induzem aumento da permeabilidade vascular através da contração das células endoteliais e conseqüente formação de poros no endotélio (Majno *et al.*, 1961).

Os sinais clássicos da inflamação como dor, edema, hipertermia, eritema e perda da função são conseqüência da liberação local de vários mediadores químicos como as prostaglandinas, histamina, bradicinina, serotonina. Esta resposta pode ser desencadeada

através da estimulação de neurônios sensoriais primários (fibras C), com a liberação principalmente de substância P, processo este denominado de inflamação neurogênica (Saria *et al.*, 1983).

Miller & Tu (1989) demonstraram que venenos de cobra e seus componentes induzem aumento da permeabilidade vascular.

Trabalho anterior mostrou que o extrato bruto da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* induziu o aumento da permeabilidade vascular no dorso de ratos anestesiados. Este efeito foi antagonizado pela pirlamina (Gabilan, 1992). No entanto, não foram analisados outros tecidos e o envolvimento dos outros mediadores no efeito induzido pelo extrato bruto e uma fração isolada desta anêmona.

2 - OBJETIVO

Este estudo teve como propósito avaliar o mecanismo através do qual o extrato bruto e a fração hemolítica isolados da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* induzem o aumento do extravasamento de proteínas plasmáticas. Para tal foram utilizados dois modelos experimentais: a permeabilidade vascular no dorso de ratos anestesiados e a permeabilidade vascular em vários tecidos de ratos conscientes.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Preparação do Extrato Bruto

Espécimens da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* foram coletadas na praia da Armação, em Florianópolis, Santa Catarina e trazidas para o laboratório, mantidas em frascos contendo água do mar na temperatura aproximada de 4°C. Os tentáculos foram retirados do disco oral, cortados, pesados, adicionado água destilada e homogeneizados. A amostra foi centrifugada em 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante, denominado extrato bruto foi alíquotado e estocado no freezer em temperatura de -4°C.

3.2 - Filtração em Sephacryl S-200 e Biogel P -2

O extrato bruto da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* foi dissolvido em 1,5 mL de Tampão Tris-Cl 150mM, NaCl 0,5 M e pH 8,1. A amostra foi submetida a uma filtração em coluna (2 x 115cm) de gel Sephacryl S- 200, equilibrada e eluída com o tampão fosfato, com fluxo de 3mL por hora, em temperatura ambiente. As frações foram colhidas e lidas em absorvância de 280 nm. As frações ativas foram liofilizadas, dessalificadas em Biogel P-2 e novamente liofilizadas. Para os ensaios, as amostras foram diluídas em salina em concentrações apropriadas para os testes.

3.3 - Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteína foi determinada pelo método de Lowry (1951). Foi preparada uma solução padrão de 1 mg/mL, juntamente com o Reagente de Lowry (CTC, SDS 10 %, NaOH 1N, H₂O) e o Reagente de Folin 0,4 N. A solução foi completada com 400 µL de água destilada. As amostras foram diluídas em água destilada e foram adicionados 400 µL do reagente de Lowry. As soluções foram agitadas e após 10 minutos adicionados 200 µL do reagente de Folin 0,4 N, seguido de nova agitação. Esperou-se 30 minutos e as amostras foram lidas em absorvância de 750 nm.

3.4 - Ensaio da Atividade Hemolítica

No ensaio da atividade hemolítica foram utilizados eritrócitos de carneiro. Os eritrócitos foram separados do plasma após a lavagem do sangue por três ou quatro vezes, até a ausência de hemólise, utilizando Tampão Fosfato 0,01 M, NaCl 0,15 M com pH igual a 7,4. Em cada lavagem, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. Após este procedimento foi preparada uma solução de hemácias a 5 %. Foram retirados 100 µL da suspensão de eritrócitos e incubados com várias alíquotas (10, 20, 50 µL), do extrato bruto e a fração durante 30 minutos a 37° C. Após a incubação, adicionou-se 800 µl de Tampão Fosfato e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm. Estas amostras foram lidas em absorvância igual a 540 nm. O padrão de absorvância ocorre quando a hemólise corresponde a 0,600 em 540 nm.

Os ensaios acima relacionados foram feitos em colaboração com Prof. Dr. Nelson H. Gabilan.

3.5 - Ensaio Biológicos

A atividade biológica do extrato bruto e da fração hemolítica da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* foram avaliadas através de ensaios “*in vivo*”.

3.5.1- Ensaio “*in vivo*”

3.5.1.a- Permeabilidade Vascular no Dorso de Ratos Anestesiados

Ratos machos Wistar foram utilizados, pesando entre 160 a 230 g. Os animais foram anestesiados com Nembutal (40 mg / kg) por via intraperitoneal, 20 minutos antes do início do experimento. O pêlo da região dorsal foi removido com depilador elétrico (Oster). Em seguida foi feito o mapeamento do dorso com caneta hidrocor para delimitar as regiões da pele a serem expostas aos mediadores inflamatórios. A administração endovenosa do corante azul de Evans (2,5 mg /kg) foi feita através da veia caudal, 10 minutos antes das injeções intradérmicas no dorso de rato. Extrato bruto, fração hemolítica e os mediadores da inflamação foram diluídos em solução de Ringer Locke com a seguinte composição em mM:(NaCl 154; KCl 5,6; CaCl₂ 2; NaHCO₃ 6; glicose 5,5). Cada animal recebeu 8 injeções, das quais duas como controle, Ringer-Locke, e o restante com extrato bruto ou fração hemolítica em diferentes concentrações 30, 100 e 300 µg diluídas em 100µL por sítio de injeção.

O pré-tratamento dos animais consistiu na administração intravenosa de antagonistas seletivos dos mediadores inflamatórios: Pirilamina (5 mg/ kg, 5 min.), RP 65780 (10⁻⁶M, 15 min.), L- NAME (20 mg/kg, 5 min.) e Ciproheptadina (10⁻²M, 15 min.).

Vinte minutos após o pré-tratamento com os antagonistas, os animais foram mortos por decaptação, a pele foi retirada para medida do lado interno, dos diâmetros verticais e horizontais das manchas azuladas e subsequente cálculo da média.

3.5.1.b- Permeabilidade Vascular em Ratos Conscientes

Ratos machos Wistar foram utilizados, pesando entre 180 a 250 g, não anestesiados. Os animais foram injetados na veia caudal, previamente aquecida em água morna, com doses crescentes do extrato bruto (100, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou da fração hemolítica (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Após 10 minutos, os animais foram mortos por decaptação e da cavidade abdominal retirados os órgãos: duodeno, estômago, íleo, pâncreas, rim e bexiga. Estes órgãos foram dissecados em papel de filtro e divididos em duas porções. Uma porção de cada órgão foi colocada para secar em temperatura igual a 50° C por 24h para determinar o peso seco. O azul de Evans foi extraído dos órgãos incubados com formamida em temperatura ambiente por 24 h. A concentração de azul de Evans foi determinada pela absorbância a 620 nm, numa Leitora de Elisa. A absorbância foi comparada com uma curva padrão de 0,05- 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de azul de Evans em formamida. O extravasamento plasmático foi expresso em μg de azul de Evans por grama de tecido seco (Nicolau *et al.*, 1993).

O corante azul de Evans se liga as proteínas plasmáticas que deixam a corrente sangüínea somente através dos poros que se formam ao longo do endotélio das vênulas pós capilares em resposta aos mediadores inflamatórios.

Os animais foram pré-tratados com seguintes antagonistas: Pirilamina (5 mg/Kg), Indometacina (10 mg/Kg); RP 65780 (10^{-6} M), Captopril (10^{-5} M), HOE 140 (1 μM), L-NAME (20 mg/Kg).

Os resultados foram expressos em μg de Azul de Evans/g de tecido seco, onde o produto de Abs x K é dividido pela relação do peso seco / peso úmido.

Abs = leitura espectrométrica da absorbância em 620nm.

K= Constante calculada a partir da curva padrão de azul de Evans.

3.6- Equipamentos

Leitor de Elisa (Labsystems)

Coletor de frações

Fisiógrafo Narco Biosystems

Espectrofotometro Micronal B382

Depilador elétrico (Oster)

3.7 - Reagentes

Triton X-100

BSA(albumina de soro bovino)

Sephacryl S- 200 e Biogel P-2

Azul de Evans (SIGMA)

Formamida (SIGMA)

Nembutal (ABOTT)

3.8 - Drogas

Maleato de Pirilamina (SIGMA)

Indometacina (SIGMA)

RP 65780 e HOE 140 (cedidos pelo Prof. D. Regoli, Univ. Sherbrooke, Quebec, Canada)

L- NAME (SIGMA)

Captopril (SIGMA)

Ciproheptadina (SIGMA)

3.9 - Análise Estatística

Os resultados obtidos dos experimentos foram analisados pelo teste t de Student não pareado e por Análise de Variância (ANOVA). O teste de Neuman-Keuls foi utilizado quando necessário.

As diferenças foram consideradas significativas a nível de * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4 - RESULTADOS

4.1 - Aumento da Permeabilidade Vascular no Dorso de Ratos Anestesiados

A administração intradérmica do extrato bruto (EB) da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* induziu um aumento na permeabilidade vascular no dorso de ratos. O aumento do extravasamento plasmático foi medido através do diâmetro das manchas de azul de Evans, injetado previamente no animal. Ocorreu um aumento significativo no diâmetro das manchas azuladas com as doses de 30, 100 e 300 µg/ sítio de injeção do extrato bruto. Entretanto, não foi observada uma relação dose resposta entre as duas primeiras doses. Utilizando o mesmo modelo experimental, foi verificado que a fração hemolítica (FH) obtida a partir do extrato bruto extraído dos tentáculos, também provocou um aumento do diâmetro das manchas azuladas. A injeção intradérmica desta fração hemolítica nas doses de 100 e 300 µg/sítio de injeção aumentou significativamente a permeabilidade vascular nas doses utilizadas (Tabela I).

Tabela I - Efeito do aumento da permeabilidade vascular induzidos pelo extrato bruto (EB 30, 100 e 300 $\mu\text{g/sítio de injeção}$) e fração hemolítica (FH, 100 e 300 $\mu\text{g/sítio de injeção}$) no dorso de ratos. O diâmetro médio (mm) foi obtido das medidas dos diâmetros vertical e horizontal da mancha de azul de Evans previamente injetado pela via endovenosa.

Controle	EB 30	EB 100	EB 300	FH 100	FH 300
7,0 \pm 3,0	15,0 \pm 2,5	15,0 \pm 2,6	17,0 \pm 3,2 *	14,0 \pm 3,0	16,2 \pm 2,5 **
n = 14	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6

Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias. Os grupos foram comparados com o controle através do teste "t" de Student. A significância indica: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

n = número de experimentos.

4.2 - Efeito do Pré-Tratamento com Antagonistas dos Mediadores Inflamatórios no Aumento da Permeabilidade Vascular Induzida pela Fração Hemolítica

Com o propósito de avaliar a participação dos mediadores inflamatórios liberados pela fração hemolítica (FH), a dose de 300 µg/ sítio foi selecionada na pele dorsal do rato. Neste estudo foram utilizados antagonistas e inibidores de síntese dos principais mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório.

O pré-tratamento com o anti histamínico, pirilamina, 5mg/kg, injetado 5 min. antes do experimento através da veia caudal, reduziu o diâmetro (16,2 ± 2,5 para 6,0 ± 3,0 mm) da mancha azulada induzida pela fração hemolítica (Tabela II).

O pré tratamento 15 min. antes, i.v. com RP 65780, um antagonista dos receptores NK-1 da substância P, também reduziu o diâmetro (16,2 ± 2,5 para 12,7 ± 0,13 mm) da mancha azulada induzida pela fração hemolítica (Tabela II).

Em outro grupo de animais, foi utilizado um antagonista não seletivo da serotonina, a ciproheptadina (10^{-2} M, i.v.) administrada 15 min. antes da injeção intradérmica da fração hemolítica (300 µg/ sítio). Este pré-tratamento reduziu o extravasamento plasmático induzido pela fração hemolítica de modo significativo (Tabela II).

A administração prévia de L-NAME, inibidor da óxido nítrico sintase (20 mg/kg, i.v.), 5 min. antes da injeção da fração hemolítica (300µg/sítio), não modificou o extravasamento plasmático (Tabela II).

Tabela II - Efeito do pré-tratamento com: pirilamina (5mg/Kg), RP 67580 (10^{-6} M), L-Name (20mg/Kg) e a ciproheptadina (10^{-2} M) no aumento da permeabilidade vascular induzido pela fração hemolítica (300 μ g/Kg/ sítio de injeção) no dorso de ratos. A medida foi feita através do diâmetro médio (mm) da mancha do azul de Evans previamente injetado pela via endovenosa.

Grupos	n	Ringer-Locke	FH 300
Controle	(n=14)	7,0 \pm 3,0	16,2 \pm 2,5**
Pirilamina	(n=6)	7,2 \pm 2,2	6,0 \pm 3,0**
RP 67580	(n=6)	7,0 \pm 2,5	12,7 \pm 0,13
L-Name	(n=6)	7,0 \pm 3,0	16,0 \pm 3,4
Ciproheptadina	(n=6)	6,0 \pm 2,5	8,0 \pm 3,0**

Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão da média. Os grupos experimentais foram comparados com seus respectivos controles através do teste "t" de student. A significância indica: * p < 0,05 e ** p < 0,01.

4.3 -Aumento da Permeabilidade Vascular em Vários Tecidos de Ratos Conscientes

Diversos órgãos de rato foram selecionados: duodeno, estômago, íleo, pâncreas, rim e bexiga urinária, supridos com diferentes redes de vasos sanguíneos, que respondem a maioria dos mediadores do processo inflamatório e são usados rotineiramente no laboratório. Esta diversidade tecidual, permite estudar vários aspectos do processo inflamatório e os mediadores envolvidos, pois mostram seletividade. Os resultados são apresentados em figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, comparando o controle do conteúdo de azul de Evans nos órgãos selecionados com aquele após a administração do extrato bruto ou fração hemolítica com ou sem o pré-tratamento com os antagonistas e inibidores de síntese.

4.3.1 - Efeito do Extrato Bruto e da Fração Hemolítica sobre a Permeabilidade Vascular

Os animais controle foram administrados com o corante azul de Evans e com uma quantidade de salina igual ao volume das substâncias em estudo a serem injetadas.

A administração intravenosa do extrato bruto (EB) da anêmona do mar nas doses de (100 e 300 µg/Kg) aumentou o extravasamento plasmático (µg/g de tecido seco) proporcionalmente as doses relacionadas nos seguintes tecidos, duodeno (89,29 ± 4,32 para 109,5 ± 5,91; 133,6 ± 6,92 µg/g de tecido seco) e íleo (93,7 ± 3,0 para 114,3 ± 11,9 e 137,0 ± 6,7 µg/g de tecido seco). Nos outros tecidos, o aumento da permeabilidade vascular não foi significativo (Figura 1).

O pré-tratamento dos animais com um antagonista da histamina dos receptores H_1 , a pirilamina (5mg/kg, i.v.) 5 min. antes da administração da associação do extrato bruto e azul de Evans, reduziu o extravasamento plasmático induzido pelo extrato bruto (300 $\mu\text{g/Kg}$) no duodeno ($133,6 \pm 6,9$ para $101,8 \pm 2,6$ $\mu\text{g/g}$ de tecido seco) e no íleo ($137,0 \pm 19,9$ para $87,2 \pm 7,5$ $\mu\text{g/g}$ de tecido seco). (Figura 2).

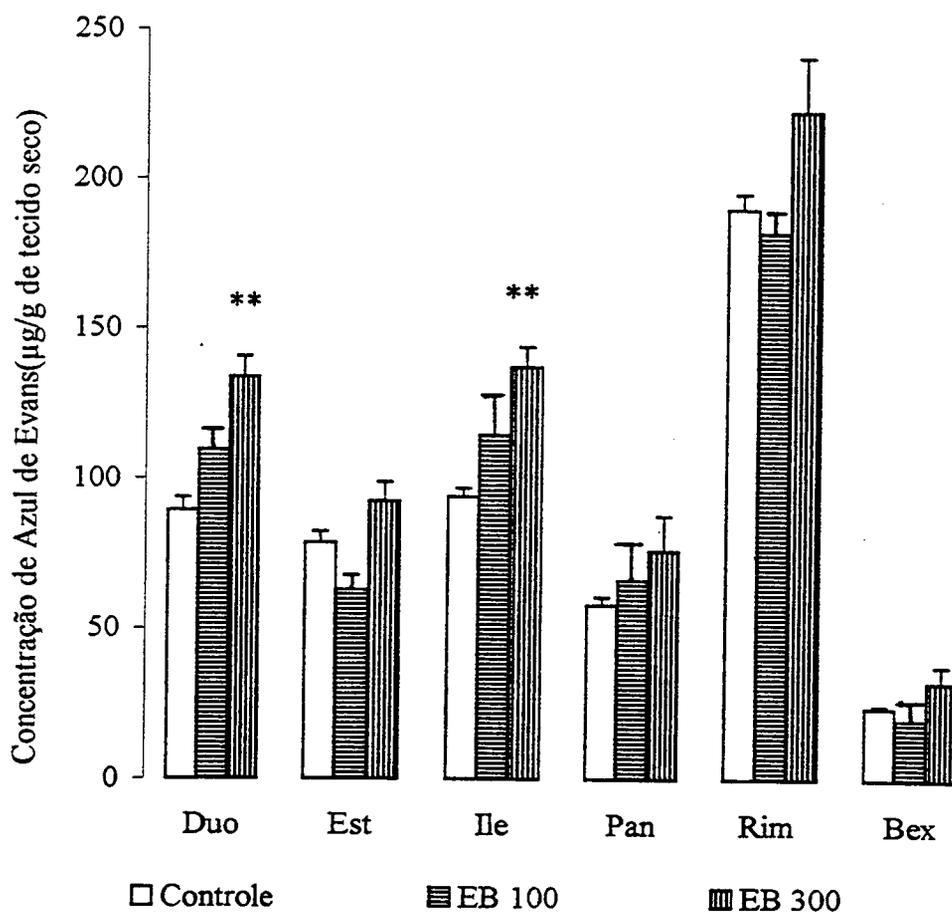


FIG.1 - Efeito da administração intravenosa do extrato bruto (EB) da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum*, nas doses de 100 e 300 µg/kg em associação com o azul de Evans no extravasamento de proteínas plasmáticas nos tecidos representados: Duo: duodeno; Est: estômago; Ile: íleo; Pan: pâncreas; Rim: rim; Bex: bexiga urinária. As colunas indicam a média e as barras verticais o erro padrão da média. Os asteriscos indicam a significância, *p < 0,05 e **p < 0,01 em relação ao controle.

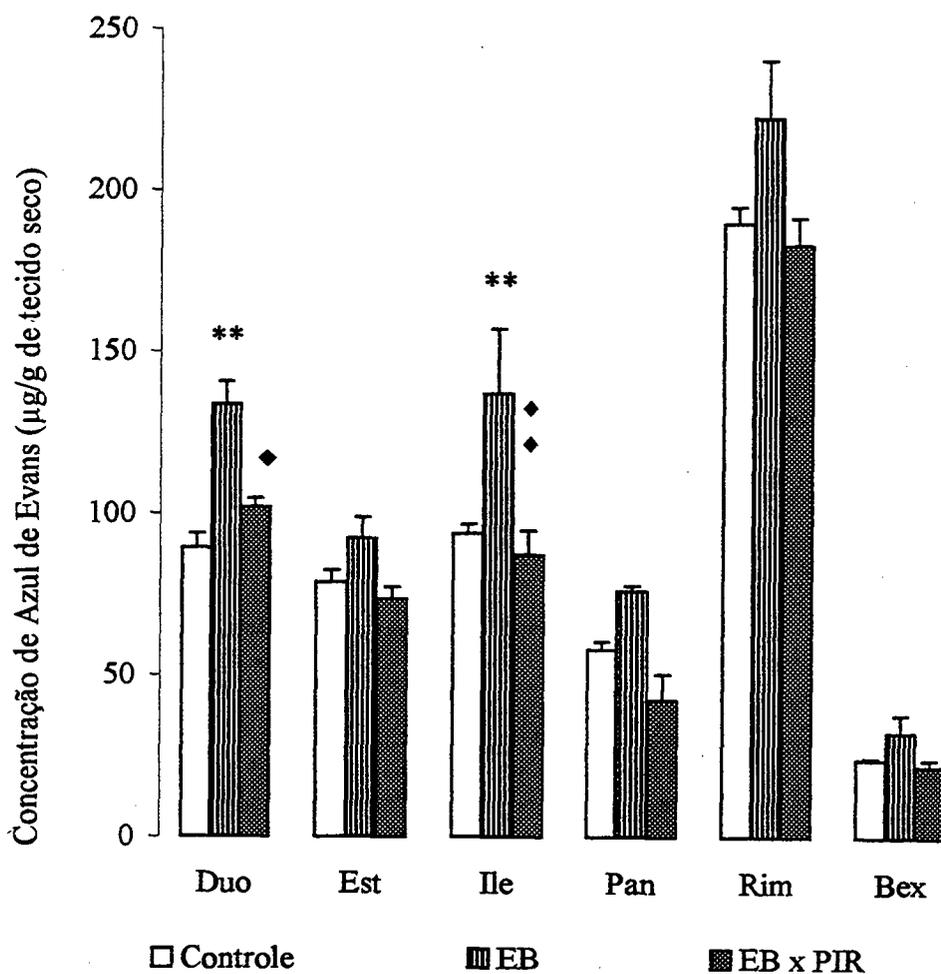


FIG.2- Efeito da pirlamina (5 mg/kg; n=8), injetado 5 minutos antes da associação do extrato bruto (EB, 300 µg/kg) e azul de Evans no extravasamento plasmático nos tecidos representados: Duo: duodeno; Est: estômago; Ile: íleo; Pan: pâncreas; Rim: rim; Bex: bexiga urinária. As colunas indicam a média e as barras verticais o erro padrão da média. Os asteriscos indicam a significância, *p < 0,05 e **p < 0,01 comparando o extrato bruto em relação ao controle. O símbolo (♦) indica a significância: ♦p < 0,05 e ♦♦ p < 0,01 do efeito da pirlamina em relação ao extrato bruto.

A administração da fração hemolítica (FH) (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) induziu um aumento significativo do extravasamento plasmático no duodeno ($89,2 \pm 4,32$ para $117,3 \pm 8,03$ $\mu\text{g}/\text{g}$ de tecido seco), no íleo ($93,7 \pm 3,0$ para $143,1 \pm 13,87$ $\mu\text{g}/\text{g}$ de tecido seco) e também na bexiga urinária ($24,01 \pm 0,72$ para $44,38 \pm 2,70$ $\mu\text{g}/\text{g}$ de tecido seco) (Figura 3). Como pode ser observado, a fração hemolítica induziu um aumento do extravasamento plasmático nos mesmos tecidos nos quais o extrato bruto produziu seu efeito, entretanto produziu também um aumento significativo na bexiga urinária. O anti-histamínico, foi testado isoladamente na concentração que exerce antagonismo “in vivo” e nesta condição, o antagonista não induziu extravasamento plasmático.

O pré-tratamento com a Pirilamina (5 mg/kg , i.v.) 5 minutos antes, reduziu significativamente o extravasamento plasmático induzido pela fração hemolítica (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) no duodeno (de $137,5 \pm 5,5$ para $86,7 \pm 3,70$ $\mu\text{g}/\text{g}$ de tecido seco), íleo (de $143,1 \pm 13,8$ para $88,2 \pm 5,2$ $\mu\text{g}/\text{g}$ de tecido seco) e bexiga urinária (de $44,3 \pm 2,8$ para $25,6 \pm 3,0$ $\mu\text{g}/\text{g}$ de tecido seco) (Figura 3).

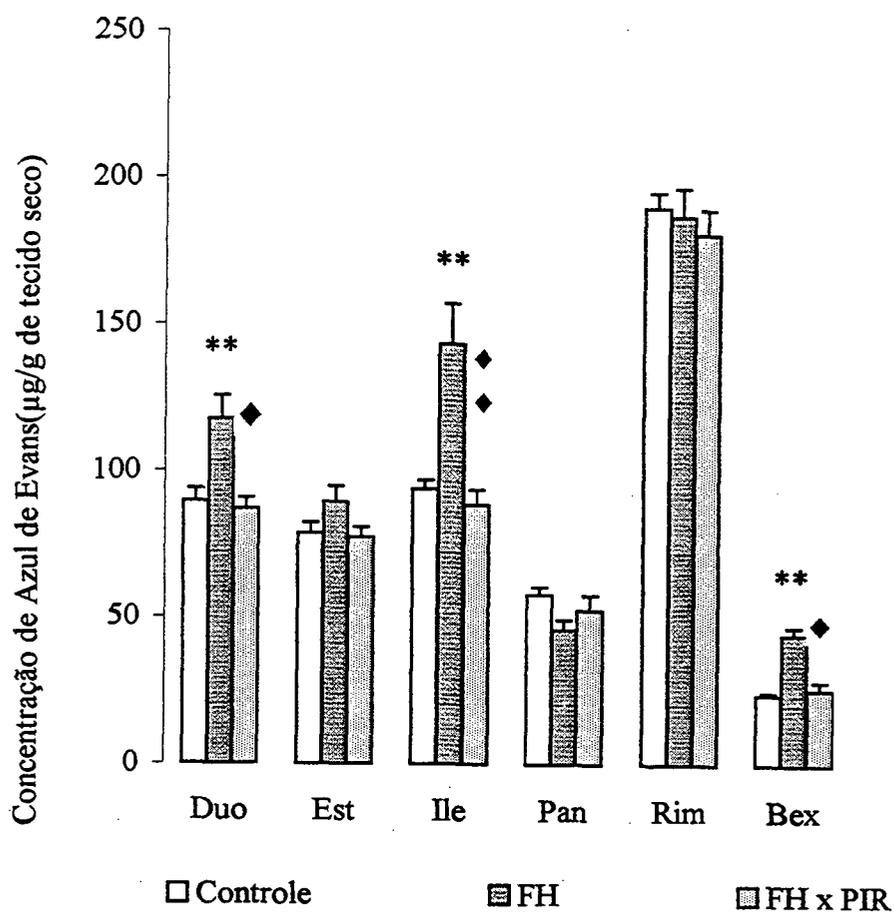


FIG.3 - Efeito da pirilamina (5 mg/kg, i.v.; n=7), 5 minutos antes da injeção da associação do azul de Evans e fração hemolítica (FH, 300 µg/kg, i.v.) da anêmona do mar no extravasamento plasmático nos tecidos representados: Duo: duodeno; Est: estômago; Ile: ileo; Pan: pâncreas; Rim: rim; Bex: bexiga urinária. As colunas indicam a média e as barras verticais o erro padrão da média. Os asteriscos indicam a significância, *p < 0,05 e **p < 0,01 em comparação ao controle. O símbolo (♦) indica a significância: ♦p < 0,05 e ♦♦ p < 0,01 do efeito da pirilamina em relação a fração hemolítica.

4.3.2 - Efeito do RP 67580 no Extravasamento Plasmático Induzido pela Fração Hemolítica

Nesta série de experimentos, o antagonista seletivo dos receptores NK-1, RP 65780 (10^{-6} M) foi injetado 15 min. antes da administração da associação de azul de Evans e fração hemolítica (FH, 300 μ g/kg). O tratamento com RP 67580, reduziu significativamente o extravasamento plasmático induzido pela fração hemolítica no duodeno (de $137,5 \pm 5,5$ para $94,9 \pm 4,8$), íleo (de $143,1 \pm 13,8$ para $102,4 \pm 7,0$ μ g/g de tecido seco) e bexiga (de $44,3 \pm 2,7$ para $23,4 \pm 1,2$ μ g/g de tecido seco). A administração da associação do antagonista e azul de Evans isoladamente, não modificou o extravasamento plasmático (Figura 4).

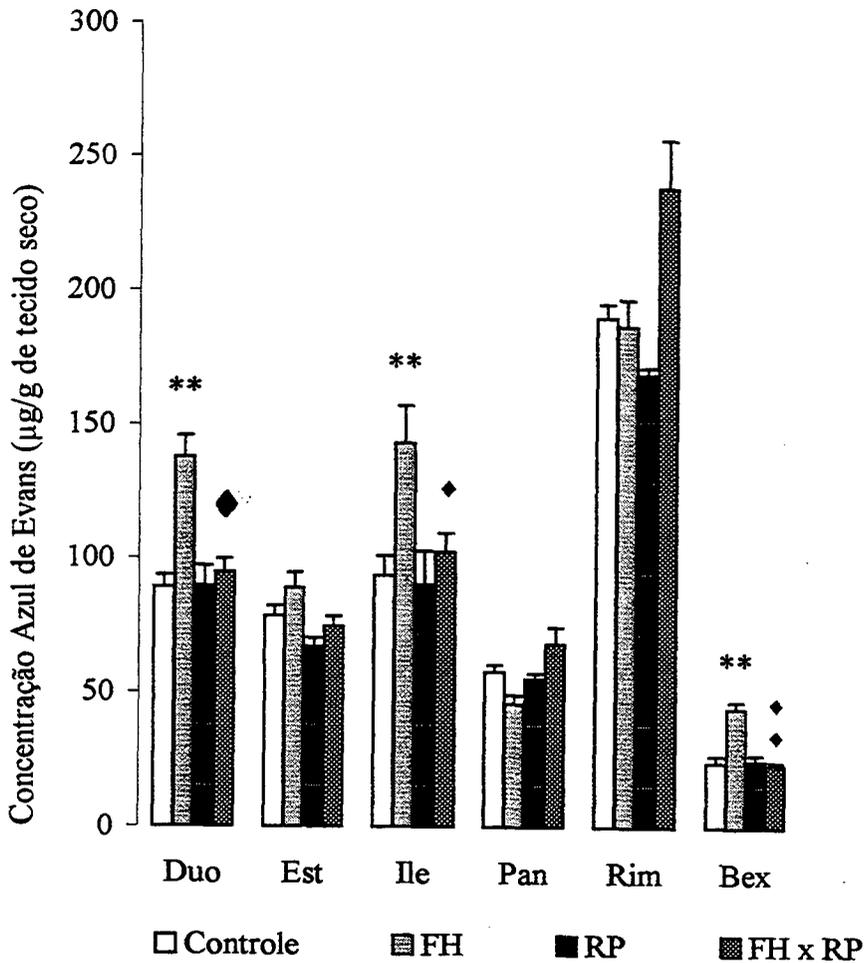


FIG.4 - Efeito do RP 65780 (10^{-6} M; n=8), injetado isoladamente, 15 minutos antes, i.v. e também em associação com a fração hemolítica (FH, 300 µg/kg, i.v.) da anêmona do mar no extravasamento plasmático nos tecidos representados: Duo: duodeno; Est: estômago; Ile: íleo; Pan: pâncreas; Rim: rim; Bex: bexiga urinária. As colunas indicam a média e as barras verticais o erro padrão da média. Os asteriscos indicam a significância, *p < 0,05 e **p < 0,01 comparando o extrato bruto em relação ao controle. O símbolo (♦) indica a significância: ♦p < 0,05 e ♦♦ p < 0,01 comparando o efeito do RP 65780 em relação a fração hemolítica.

4.3.3- Efeito do Captopril no Extravasamento Plasmático Induzido pela Fração Hemolítica

O pré-tratamento com Captopril, um inibidor da enzima conversora da angiotensina (10^{-5} M), 15 min. antes da injeção da fração hemolítica (FH, $300\mu\text{g}/\text{kg}$), reduziu significativamente o extravasamento plasmático induzido pela fração hemolítica no íleo (de $143,1 \pm 13,8$ para $105,1 \pm 10,0 \mu\text{g}/\text{g}$ de tecido seco) e bexiga urinária (de $44,3 \pm 2,7$ para $24,4 \pm 2,2 \mu\text{g}/\text{g}$ de tecido seco). A administração isolada do captopril em associação com o corante não modificou o extravasamento plasmático (Figura 5).

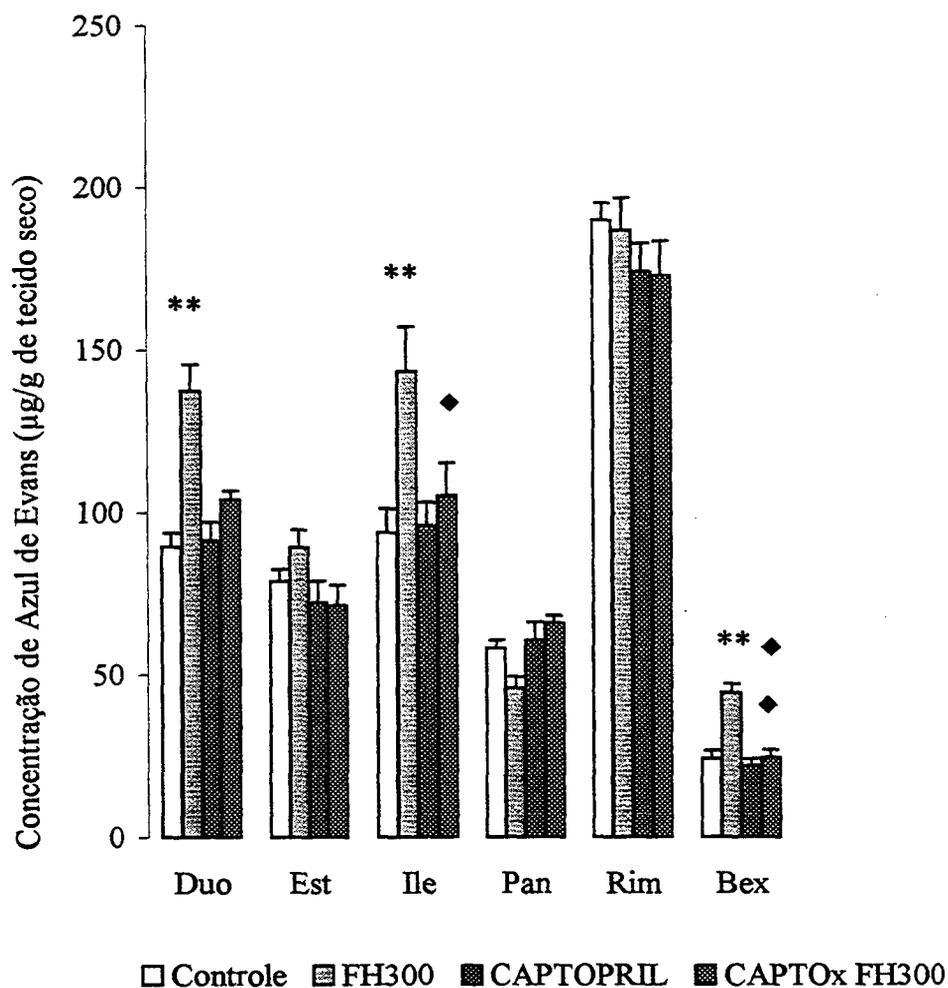


FIG.5 - Efeito do captopril (10^{-5} M; i.v. n=8), injetado isoladamente, 15 minutos antes, i.v. e em associação com a fração hemolítica (FH, 300 μ g/Kg, i.v.) da anêmona do mar no extravasamento plasmático nos tecidos representados: Duo: duodeno; Est: estômago; Ile: íleo; Pan: pâncreas; Rim: rim; Bex: bexiga urinária. As colunas indicam a média e as barras verticais o erro padrão da média. Os asteriscos indicam a significância, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando o extrato bruto em relação ao controle. O símbolo (♦) indica a significância: ♦ $p < 0,05$ e ♦♦ $p < 0,01$ do efeito do captopril em relação a fração hemolítica.

4.3.4 - Efeito do HOE 140 no Extravasamento Plasmático Induzido pela Fração Hemolítica

A injeção de HOE 140 ($1\mu\text{M/Kg}$) um antagonista do receptor B_2 da bradicinina, 15 min. antes da administração da associação de azul de Evans e fração hemolítica (FH, $300\mu\text{g/kg}$), reduziu significativamente o extravasamento plasmático no duodeno (de $137,5 \pm 5,5$ para $104,8 \pm 5,2 \mu\text{g/g}$ de tecido seco), íleo (de $143,1 \pm 13,8$ para $81,7 \pm 3,1 \mu\text{g/g}$ de tecido seco) e na bexiga urinária (de $44,3 \pm 2,7$ para $28,9 \pm 1,8 \mu\text{g/g}$ de tecido seco). Não houve modificação significativa no extravasamento plasmático nos tecidos analisados no grupo de animais administrados com a associação de HOE 140 e azul de Evans (Figura 6).

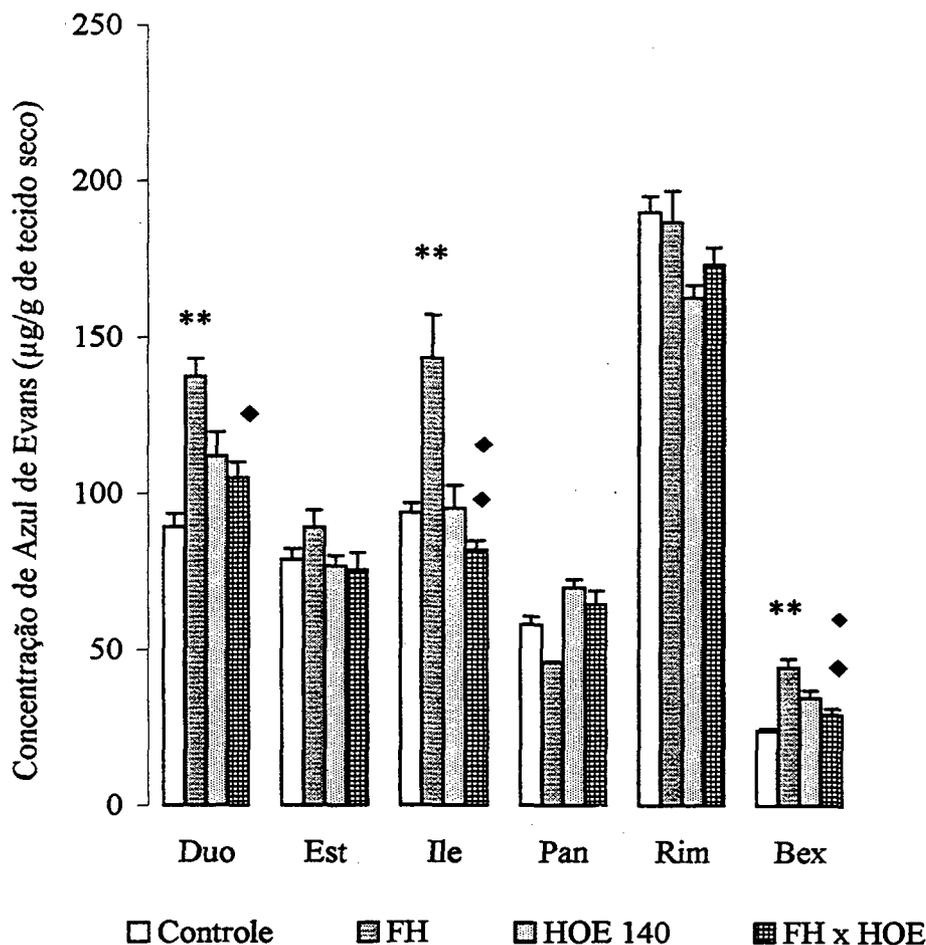


FIG.6 - Efeito do HOE 140(1 μ M; n=8), injetado isoladamente, 15 minutos antes, i.v. e em associação com a fração hemolítica (FH, 300 μ g/Kg, i.v.) da anêmona do mar no extravasamento plasmático nos tecidos representados: Duo: duodeno; Est: estômago; Ile: íleo; Pan: pâncreas; Rim: rim; Bex: bexiga urinária. As colunas indicam a média e as barras verticais o erro padrão da média. Os asteriscos indicam a significância, *p < 0,05 e **p < 0,01 do efeito do comparando o extrato bruto em relação ao controle. O símbolo (♦) indica a significância: ♦p < 0,05 e ♦♦ p < 0,01 do efeito do Hoe 140 em relação a fração hemolítica.

4.3.5- Efeito da Indometacina no Extravasamento Plasmático Induzido pela Fração Hemolítica

A injeção da indometacina associada ao azul de Evans, não modificou o extravasamento plasmático dos tecidos (não mostrado). O pré-tratamento dos animais com Indometacina (10mg/kg, i.v.), 30 minutos antes da injeção da fração hemolítica (FH, 300µg/kg), reduziu significativamente o extravasamento plasmático induzido pela fração no duodeno (de $137,5 \pm 5,5$ para $83,4 \pm 8,2$ µg/g de tecido seco), íleo (de $143,1 \pm 13,8$ para $71,2 \pm 4,5$ µg/g de tecido seco) e bexiga urinária (de $44,3 \pm 2,7$ para $19,0 \pm 2,1$ µg/g de tecido seco) (Figura 7).

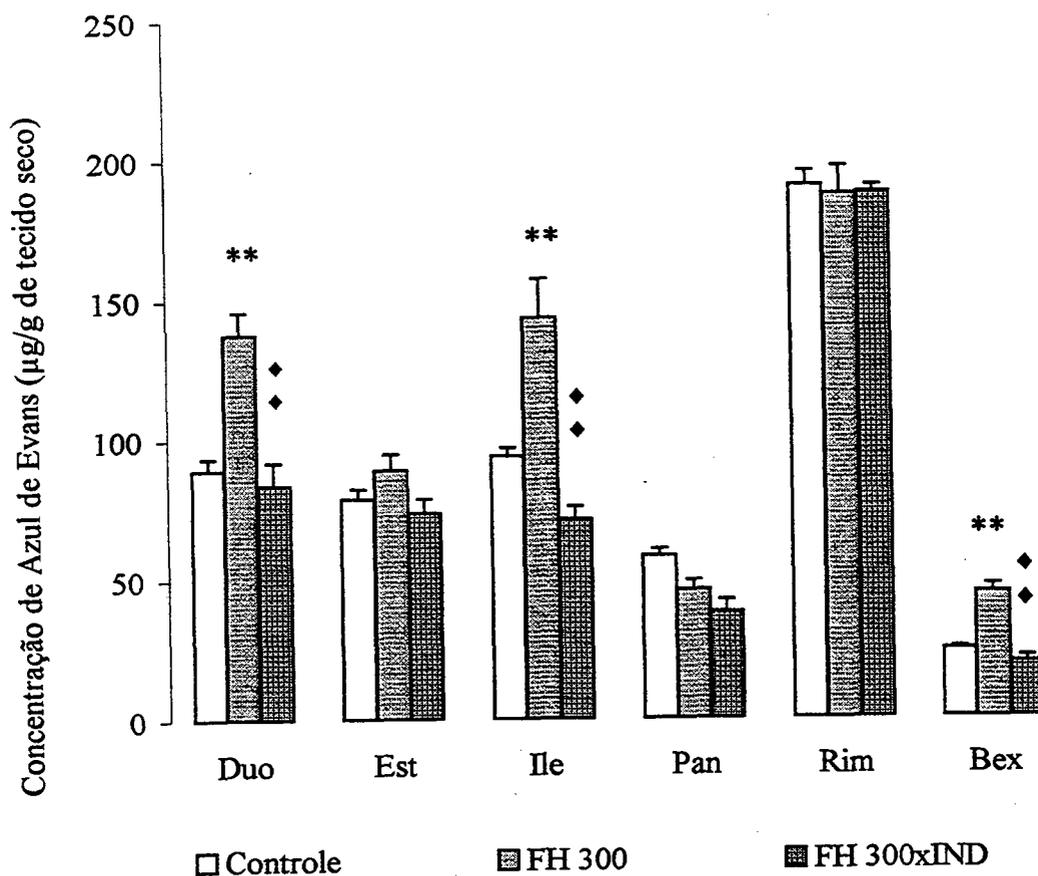


FIG.7- Efeito da indometacina (10 mg/kg, i.v.; n=9), injetado 30 minutos antes e em associação com a fração hemolítica (FH, 300 µg/kg, i.v.) da anêmona do mar no extravasamento plasmático nos tecidos representados: Duo: duodeno; Est: estômago; Ile: íleo; Pan: pâncreas; Rim: rim; Bex: bexiga urinária. As colunas e as barras verticais indicam as médias e o erro padrão das médias. Os asteriscos indicam a significância, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando o extrato bruto em relação ao controle. O símbolo (♦) indica a significância: ♦ $p < 0,05$ e ♦♦ $p < 0,01$ do efeito da indometacina em relação a fração hemolítica.

4.3.6 - Efeito do L-NAME no Aumento da Permeabilidade Vascular Induzido pela Fração Hemolítica

A injeção de L-NAME (20 mg/kg, i.v.), um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), associado ao azul de Evans, não modificou o extravasamento plasmático nos tecidos analisados. O pré-tratamento de animais com L-NAME (20 mg/kg, i.v.), 15 min. antes da injeção da fração hemolítica (FH, 300 µg/kg), reduziu ligeiramente o aumento do extravasamento plasmático no duodeno, íleo e bexiga (Figura 8).

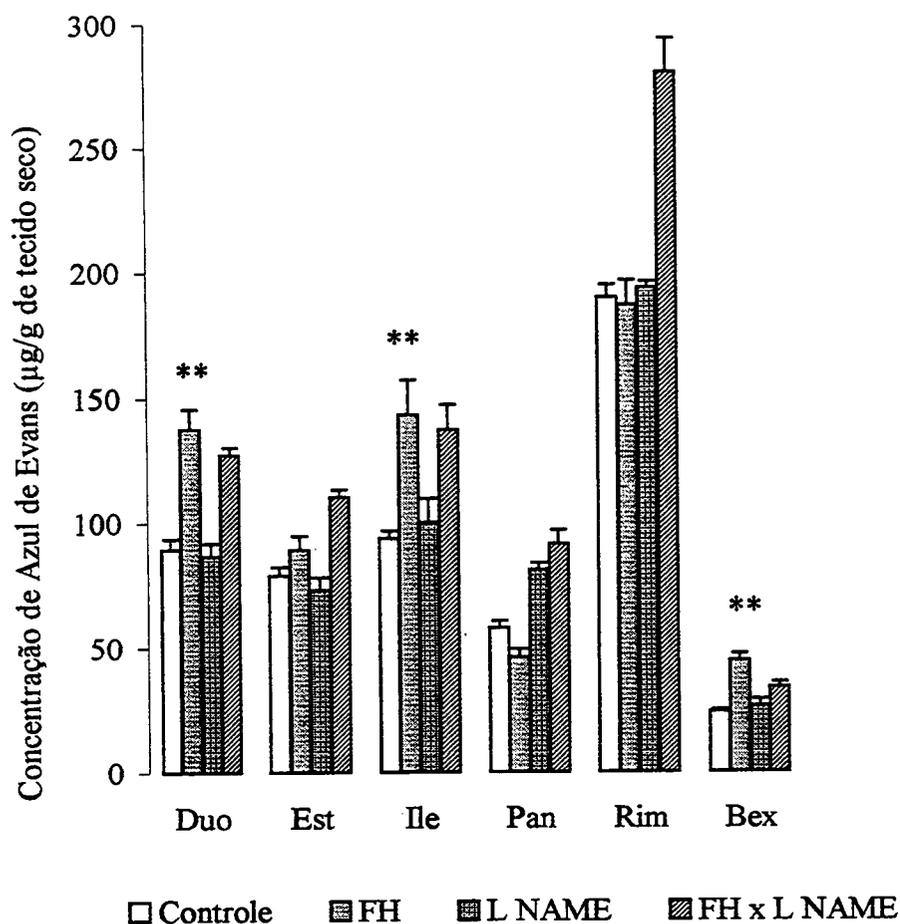


FIG.8 - Efeito do L-NAME (20 mg/kg, i.v.; n=7), injetado isoladamente, 15 minutos antes, i.v. e em associação com a fração hemolítica (FH, 300 $\mu\text{g/Kg}$, i.v.) da anêmona do mar no extravasamento plasmático nos tecidos representados: Duo: duodeno; Est: estômago; Ile: íleo; Pan: pâncreas; Rim: rim; Bex: bexiga urinária. As colunas indicam a média e as barras verticais o erro padrão da média. Os asteriscos indicam a significância, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando a fração hemolítica em relação ao controle.

5 - DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi examinado o efeito do extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pelo extrato bruto e pela fração hemolítica da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum*, utilizando vários antagonistas ou inibidores enzimáticos do metabolismo dos mediadores da inflamação.

As anêmonas do mar são ricas fontes de peptídeos biologicamente ativos, incluindo hemolisinas, neurotoxinas e cardiotoxinas. Estes compostos ativos possuem atividades biológicas como: a ativação de canais de K^+ (Norton, 1990), atividade hemolítica (Berheimer & Avigad, 1976; Kem, 1988; Macek & Lebez, 1988; Turk *et al.*, 1989; Sencic & Macek, 1990; Norton *et al.*, 1990), inativação de canais de Na^+ (Salgado & Kem, 1992), aumento da atividade cardíaca (Ho *et al.*, 1987; Galletis & Norton, 1990; Cline, 1997); inibição na captação de neurotransmissores como colina e GABA (Khoo *et al.*, 1995). As anêmonas do mar contêm muitas toxinas polipeptídicas que afetam canais de Na^+ e

citolisinas proteicas que atuam nas membranas celulares (Galletis & Norton, 1990).

As citolisinas têm sido bastante estudadas pelo seu efeito lítico em várias células, especialmente, em eritrócitos de diferentes espécies, por isso são chamadas de hemolisinas (Beress, 1982). A esfingomiéline, um fosfolípido, inibe a atividade hemolítica por antagonizar a ação da hemolisina na membrana lipídica do eritrócito agindo como um receptor da toxina hemolítica. Isto ocorre com a maioria das toxinas extraídas de anêmonas do mar que possuem atividade hemolítica (Kem & Dunn, 1988; Macek & Lebez, 1988; Galletis & Norton, 1990; Malpezzi *et al*, 1993; Cline, 1997).

Vários autores classificam as toxinas de anêmonas do mar como neurotoxinas e hemolisinas baseadas no seu mecanismo de ação e também no seu peso molecular. As neurotoxinas são caracterizadas pelo seu baixo peso molecular, aproximadamente 5.000 Da, enquanto que as hemolisinas são proteínas básicas com peso molecular entre 16.000 a 20.000 Da (Beress, 1982).

Uma outra característica encontrada nas hemolisinas de anêmonas do mar é a estabilidade térmica. Mas muitas vezes, pode ocorrer a perda de atividade quando estão em solução, como acontece com a *Aiptasia pallida* (Hessinger & Lenhoff, 1973), *Actinia cari* (Macek *et al.*, 1982), *Epiactis prolifera* (Bernheimer & Avigad, 1982).

Muitas citolisinas estáveis em uma determinada temperatura, podem, porém, perder a atividade quando submetidas a altas temperaturas como, por exemplo, a citolisina extraída da *Condylactis gigantea*, cuja estabilidade está entre 25 e 37°C, mas perde atividade quando encontra-se a 70°C durante 30 minutos. Em contraste, a toxina extraída da anêmona *Pseudactinia varia* mantém a atividade durante 40 minutos mesmo a 70°C. A tenebrosina-C possui atividade hemolítica entre 25 e 37°C e a perde quando se aproxima de 80°C. Uma outra possibilidade a ser levantada sobre a estabilidade destas toxinas, é a de que congelamentos repetitivos podem destruir a atividade destas hemolisinas (Norton,

1991).

Estudos anteriores, mostraram que o fracionamento do extrato bruto da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* por cromatografia Sephadex G-50, resultou em três frações hemolíticas de peso molecular aproximado de 20.000 Da (Gabilan, 1992). Nestes estudos, tanto o extrato bruto como as frações induziram aumento da permeabilidade vascular, quando foram administrados intradermicamente no dorso de ratos anestesiados.

As anêmonas foram coletadas na praia da Armação, em Florianópolis, Santa Catarina. Os tentáculos foram retirados e homogeneizados para a obtenção do extrato bruto, este por sua vez, foi fracionado em cromatografia Sephacryl S-200 e Biogel P-2 de onde se isolou uma fração, que apresentou atividade hemolítica.

A administração intradérmica do extrato bruto e da fração hemolítica da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* na pele dorsal de ratos anestesiados provocaram uma reação inflamatória cutânea aguda que se desenvolveu em até 10 minutos após a sua administração.

Vários autores já demonstraram que toxinas extraídas de animais com propriedades hemolíticas, apresentam também atividade edematogênica (Miller & Tu, 1989; Ho *et al*, 1996). Sabe-se ainda que toxinas extraídas de venenos de serpentes provocam o aumento da permeabilidade vascular e a formação de edema, devido à liberação de mediadores como a histamina, prostaglandinas, serotonina, bradicinina ou fatores liberadores de bradicinina (Ohtani & Takahashi, 1983; Miller & Tu, 1989). Recentemente foi verificado que a fração hemolítica Mastoporan B, um tetradecapeptídeo, extraído do veneno da abelha *Vespa basalis* induziu edema local na pata de ratos (Ho, *et al.*, 1996).

A inflamação é a resposta biológica normal, caracterizada pela ativação de múltiplos mediadores e tipos celulares. A ativação destes componentes da resposta

inflamatória, resulta em um aumento do fluxo sanguíneo na área lesada e aumenta a permeabilidade dos vasos sanguíneos, seguido de migração das células para aquela área. A célula endotelial desempenha um papel importante na indução da resposta inflamatória, que depende de interações complexas envolvendo células circulantes, células endoteliais, mediadores inflamatórios e células não endoteliais da parede dos vasos. Estas células participam na reação de defesa, na reparação tecidual e na cicatrização. Além disto, outro componente desta resposta é a produção da dor, não somente pelo trauma direto às fibras sensoriais mas também pela liberação de mediadores presentes nas terminações nervosas sensoriais (Rotrosen & Gallin, 1986; Bhoola, 1996).

A administração de mediadores inflamatórios aumentam a permeabilidade vascular nas partes venulares do leito vascular (Saria *et al.*, 1983). O modelo utilizado neste trabalho, o aumento da permeabilidade vascular, permite avaliar o envolvimento dos mediadores, como a histamina, a bradicinina, a substância P, a serotonina e as prostaglandinas.

Em nosso estudo foi utilizado dois modelos experimentais: a permeabilidade vascular no dorso de ratos anestesiados e a permeabilidade vascular em vários tecidos de ratos conscientes.

Alguns autores têm observado que no modelo experimental, a permeabilidade vascular cutânea, é reduzida pela influência do anestésico utilizado, sendo a ação da uretana mais intensa que a do nembital (Couture & Kérouac, 1987). Em razão da influência do anestésico e levando-se em conta que a pele do rato é considerada um tecido com baixa irrigação sanguínea, foram utilizados animais conscientes e analisados vários tecidos, em função das particularidades específicas e regionais da barreira endotelial que constituem a microcirculação. Esta diversidade tecidual permite estudar vários aspectos do processo inflamatório e os mediadores envolvidos, pois mostram seletividade local.

Os resultados demonstraram que o extrato bruto da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* atua no aumento do extravasamento plasmático na pele dorsal de ratos anestesiados. E no outro modelo experimental de permeabilidade vascular, o aumento do extravasamento plasmático foi efetivo em todos os tecidos estudados, sendo significativo no duodeno e íleo para algumas doses. A fração hemolítica também aumentou o extravasamento plasmático na pele dorsal de ratos anestesiados, enquanto que a administração sistêmica em animais conscientes, provocou aumento do extravasamento plasmático no duodeno, íleo e também na bexiga urinária.

A administração prévia intravenosa de um antagonista dos receptores H_1 , a pirilamina, reduziu o aumento do extravasamento plasmático induzido pela fração hemolítica na pele dorsal de ratos anestesiados. No outro modelo experimental, o pré-tratamento com a pirilamina promoveu uma redução significativa no aumento do extravasamento plasmático induzido tanto pelo extrato bruto quanto pela fração hemolítica, no duodeno, íleo e bexiga urinária. Estes resultados demonstraram que pelo menos parte do efeito do extrato bruto e da fração se deve à liberação de histamina.

A histamina é liberada pelos mastócitos, que estão localizados por toda a pele, na porção perivascular, e quando ativados causam vasodilatação e aumento na permeabilidade vascular. Os mastócitos são frequentemente encontrados próximos aos terminais nervosos e podem ser ativados por inúmeros neuropeptídeos, incluindo a substância P. Decorrente deste fato, tem sido demonstrado que os mastócitos teriam um papel importante na inflamação neurogênica. Outras evidências indicam que o pré-tratamento com anti-histamínicos reduzem parcialmente a inflamação neurogênica (Kowalski & Kaliner, 1988).

Os mastócitos localizados na área proximal aos espaços perivasculares têm importante papel na resposta inflamatória aguda. Além disso, a ativação do receptor NK-1

pela substância P, aumenta a resposta inflamatória por aumentar a permeabilidade vascular através da liberação de aminas vasoativas dos mastócitos. Portanto antagonistas dos receptores H1 da histamina, bem como antagonistas dos receptores NK1, possuem um efeito inibitório na inflamação neurogênica. Entretanto, a ativação dos mastócitos não é essencial para o extravasamento plasmático da inflamação neurogênica (Inoue *et al.*, 1997).

Um outro mecanismo que envolve a liberação de histamina por polipeptídeos encontrados em venenos, se dá pela ativação dos mastócitos através de um aumento de cálcio intracelular. Algumas destas toxinas são ionóforos e atuam transportando cálcio para dentro da célula. (Lagunoff *et al.*, 1983).

Vários autores sugerem que a ativação dos mastócitos possui um importante papel nos estágios iniciais do extravasamento plasmático neurogênico (Kowalski & Kaliner, 1988).

A histamina é conhecida por aumentar a permeabilidade vascular principalmente nas vênulas pós capilares, onde a abertura dos poros consequente à contração das células endoteliais leva ao aumento do extravasamento de proteínas do plasma. Além disso, a histamina é considerada um importante mediador inflamatório primário, sendo este efeito mediado por receptores H1 (Grega *et al.*, 1981; Williams *et al.*, 1988).

Em outro grupo de animais, no qual foi utilizado o pré-tratamento com o antagonista da substância P, RP 65780, houve uma redução do extravasamento plasmático induzido pela fração hemolítica na pele dorsal de ratos. No outro modelo experimental, o RP 65780 também reduziu significativamente o extravasamento plasmático induzido pela fração hemolítica no duodeno, íleo e bexiga urinária. Estes resultados sugerem que a ação da fração hemolítica pode estar estimulando a liberação de substância P, na pele e nos tecidos acima relacionados. O extravasamento plasmático é o componente principal da inflamação neurogênica nas vias aéreas, bexiga urinária e pele de rato e cobaia (Saria *et al.*,

1983; Figini *et al.*, 1997). Portanto, nossos resultados sugerem um possível envolvimento de uma ação neurogênica, pois verificamos uma seletividade da fração hemolítica para alguns tecidos inervados peptidêrgicamente.

A substância P ativa preferencialmente os receptores NK-1, enquanto que as neurocininas A e B ativa os receptores NK-2 e NK-3 respectivamente. Os receptores NK-1 estão envolvidos predominantemente na resposta inflamatória neurogênica (Inoue *et al.*, 1997).

Há um grande número de mediadores implicados na resposta inflamatória induzida pela substância P. Isto sugere que aminas de células de mastócitos, como a histamina, participem da resposta induzida pela substância P (Devellier *et al.*, 1985).

Em altas doses, as taquicininas ativam os mastócitos e em baixas doses atuam diretamente nos receptores destes neuropeptídeos para produzir o extravasamento de proteínas plasmáticas na pele do rato (Inoue *et al.*, 1997).

Nagai e colaboradores em 1992, observaram que em camundongos deficientes de mastócitos, ocorre redução da inflamação cutânea induzida pelas taquicininas (Nagai *et al.*, 1992).

extravasamento plasmático induzido pela injeção intradérmica da fração hemolítica na pele dorsal de rato. No modelo experimental com animais conscientes, o L-NAME, provocou uma pequena inibição no extravasamento plasmático induzido pela fração hemolítica no duodeno, íleo e bexiga urinária.

O NO atua como uma molécula de transdução em muitos sistemas biológicos, existem evidências de que ele modula a formação de edema induzido pela substância P injetada intradermicamente na pele de ratos (Hughes *et al.*, 1990). Possivelmente, a redução do extravasamento plasmático observado em nosso estudo tenha sido devido a inibição da formação de NO, o qual estaria sendo liberado pela substância P.

Entretanto, o papel do óxido nítrico no extravasamento plasmático ainda é conflitante. Foi observado que a utilização do L-NAME, induz o aumento do extravasamento plasmático nas vias aéreas, pâncreas, rim, estômago, duodeno, mas não induz aumento na pele. Recentemente foi demonstrado que o L-NAME não tem efeito significativo no extravasamento plasmático na traquéia e no brônquio principal de cobaias e trato gastrointestinal de ratos. As razões para justificar resultados discrepantes ainda não são conhecidas, mas poderiam estar relacionadas ao metabolismo do L-NAME nos tecidos de diferentes espécies animais (Filep *et al.*, 1993).

Em outro grupo de animais, no qual foi utilizado o pré-tratamento do antagonista não seletivo da serotonina, Ciproheptadina, houve uma redução significativa no extravasamento plasmático na pele dorsal de ratos. A serotonina induz o aumento de proteínas plasmáticas, principalmente em diferentes áreas da pele e do trato respiratório (Saria *et al.*, 1983). Vários trabalhos demonstraram que a administração sistêmica da ciproheptadina bloqueia a liberação de serotonina, como também antagoniza o efeito da histamina (Cole *et al.*, 1995).

A administração prévia do antagonista dos receptores B₂ da bradicinina, HOE 140, também provocou uma redução significante no extravasamento plasmático induzido pela fração hemolítica, no duodeno, no íleo e na bexiga urinária de animais conscientes. Em estudos realizados anteriormente em nosso laboratório, a bradicinina injetada sistemicamente em animais conscientes, aumentou o extravasamento plasmático significativamente no duodeno, íleo e bexiga urinária, e também ocorreu uma redução no extravasamento plasmático nos mesmos tecidos após a administração prévia com o HOE 140 (Vitor, 1997). A estimulação do extravasamento plasmático induzido pela bradicinina no tratogastrointestinal, pâncreas, bexiga urinária e pele de camundongos foi abolida pelo HOE 140 (Figini *et al.*, 1997).

A bradicinina é um potente vasodilatador arterial e venoconstritor, promove aumento da permeabilidade vascular e induz dor. O aumento da permeabilidade vascular pela bradicinina e pela histamina decorre da habilidade destas contraírem músculo liso, sugerindo que a contração das células endoteliais forme poros (Majno *et al.*, 1961).

As cininas exercem seus efeitos farmacológicos através da estimulação de pelo menos dois tipos de receptores, B₁ e B₂. Entretanto, alguns dos seus efeitos são mediados através da liberação de outros agentes endógenos, como as prostaglandinas. As prostaglandinas liberadas pela bradicinina contribuem para o aumento do extravasamento plasmático (Khalil & Helme, 1992).

As cininas são geradas em resposta a vários estímulos fisiológicos e patológicos, tais como, a coagulação sanguínea, acidose tecidual, trauma e inflamação. Alguns autores mostraram que a bradicinina estimula o extravasamento plasmático no trato gastrointestinal, pâncreas, traquéia, bexiga urinária e pele em camundongos. O aumento de extravasamento plasmático foi bloqueado pelo HOE 140, e este feito portanto, mediado pela ativação de receptores B₂ (Figini *et al.*, 1997).

Os efeitos da bradicinina podem ocorrer por uma interação direta com o receptor B₂ nas células endoteliais (Figini *et al.*, 1997). Alternativamente a bradicinina poderia estimular indiretamente o extravasamento plasmático interagindo com receptores B₂ dos neurônios sensoriais liberando substância P e neurocinina A., um dos mecanismos envolvidos na ação pró-inflamatória da bradicinina (Geppetti, 1993).

Muitos resultados demonstraram que as taquicinas e cininas atuam em sinergismo no extravasamento plasmático no trato digestivo e pâncreas (Figini *et al.*, 1997).

A substância P e a bradicinina estimulam o extravasamento das vênulas pós capilares no estômago, no intestino delgado e grosso, pâncreas, bexiga, traquéia e na pele porque interagem com receptores NK1 e B-2 respectivamente (Williams *et al.*, 1988).

O pré-tratamento com outro grupo de animais conscientes utilizando a indometacina, um inibidor da ciclooxigenase, reduziu o aumento do extravasamento plasmático induzido pela fração hemolítica no duodeno, íleo e bexiga urinária. Estes resultados sugerem que o efeito induzido pela fração hemolítica possa ser mediado pelos metabólitos do ácido araquidônico.

Resultados anteriores demonstraram que a toxina isolada da anêmona do mar *Actinia tenebrosa*, tenebrosina-C, que estimula a atividade cardíaca, também foi inibida pela indometacina. Estes resultados mostraram que o mecanismo de ação é dependente da liberação de ácido araquidônico porque metabólitos deste estariam modulando a atividade da Tenebrosina-C (Galletis & Norton, 1990).

A administração prévia do captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), bloqueou o extravasamento plasmático induzido pela fração hemolítica no íleo e na bexiga urinária. Neste grupo experimental, esperávamos uma potenciação do extravasamento plasmático induzido pela fração hemolítica, pois o metabolismo da bradicinina e da substância P, possíveis mediadores inflamatórios liberados pela anêmona, estariam inibidos e conseqüentemente o extravasamento plasmático deveria aumentar (Damas *et al.*, 1996).

Nossos resultados forneceram evidências de que o extravasamento plasmático induzido pelo extrato bruto e pela fração hemolítica da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* na pele dorsal de rato e em diversos tecidos analisados seja provavelmente decorrente da liberação de vários mediadores inflamatórios. Entretanto, a redução significativa deste efeito quando utilizamos antagonistas de receptores específicos, torna difícil a caracterização do mecanismo através do qual há um aumento do extravasamento de proteínas plasmáticas, uma vez que parece improvável que um antagonista administrado isoladamente produza uma redução significativa nesta resposta.

As células endoteliais das vênulas pós-capilares reguladoras do extravasamento de proteínas plasmáticas possuem receptores específicos para uma variedade de mediadores inflamatórios. Considerando que a estimulação de um dos receptores tem a capacidade para aumentar o extravasamento plasmático, alguns mediadores durante o processo inflamatório, poderiam ser inibidos com o uso de antagonistas seletivos, reduzindo deste modo o efeito inflamatório (Barnes *et al.*, 1990; Goldi & Pedersen, 1995).

Por outro lado, não devemos descartar que a liberação dos vários mediadores poderia ser consequência de uma lesão sobre a membrana endotelial, ou seja, uma ação não específica.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSEN, C.; BÉRESS, L.; FISCHER, K.L.; PROPPE, D.; REINBERG, T. & SATTLER, R.W. The action of a toxin from the sea anemone *Anemonia sulcata* upon mammalian heart. *Naun. Schimie. Arch. Pharmacol.* 295: 55-62, 1976.
- ALZAHABY, M. & ROWAN, E.G. Some pharmacological studies on the effects of *Cerastes vipera* (Sahara sand viper) snake venom. *Toxicon.* 33: 1299-1311, 1995.
- BARNES, P.J.; BOSCHETTO, P.; ROGERS, D.F.; BELVISI, M.; ROBERTS, N.; CHUNG, K.F. & EVANS, T.W. Effects of treatment on airway microvascular leakage. *Eur. Resp. J.* 3 (12): S 663-671, 1990.
- BELÉM, M. J. Anatomy and biology of *Bumodosoma caissarum* Correa, 1964 (Cnidaria, Anthozoa, Actiniidae). *An. Acad. Bras. Ciências.* 60(3): 365-375. 1988.

BERESS, L. Biologically active compounds from coelenterates. *Pure Appl. Chem.* 54: 1981-1984, 1982.

BERNHEIMER, A.W. & AVIGAD, L.S. Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 467-471, 1976.

BERNHEIMER, A.W. & AVIGAD, L.S. & LAI, C.Y. Purification and properties of a toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Arch. Biochem. Biophys.* 214: 840-845, 1982.

BHOOLA, K.D. Translocation of the neutrophil kinin moiety and changes in the regulation of kinin receptors in inflammation. *Immunopharmacol.* 33: 247-256, 1996.

BRAUN, A. K⁺ channel in xenopus nerve fibres selectively blocked by bee and snake toxins: binding voltage-clamp experiments. *J. Physiol.* 420: 365-370, 1990.

CASTÁNEDA, O.; SOTOLONGO, V.; AMOR, A.M.; STÖCKLIN, R.; ANDERSON, A.J.; HARVEY, A.L.; ENGSTRÖM, A.; WERNSTED, C. & KARLSSON, E. Characterization of potassium channel toxin from the caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon.* 33(5): 603-613. 1995.

CLINE, E. UpI: Studies involving the potent cardiac stimulant and haemolysin from the sea anemone *Urticiria piscivora*. *Phytother. Res.* 11: 348-353, 1997.

- COLE, H.W.; BROWN, C.E.; MAGEE, D.E.; MAGEE, C.; ROUDEBUSH, R.E. & BRYANT, H.U. Serotonin induced paw edema in the rat: pharmacological profile. *Gen. Pharmac.* 26: 431-436, 1995.
- COUTURE, R. & KÉROUAC, R. Plasma protein extravasation induced by mammalian tachykinins in rat skin: influence of anaesthetic agents and an acetylcholine antagonist. *Br. J. Pharmac.* 91: 265-273, 1987.
- CRUZ, L.J.; GRAY, W.R.; OLIVERA, B.M.; ZEIKUS, R.D.; KERR, L.; YOSHIKAMI, D. & MOCZYDŁOWSKI, E. *Comus geografus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J. Biol. Chem.* 260 (16): 9280-9285, 1985.
- DAMAS, J.; BOURDON, V.; LIÉGEOIS, J.F. & SIMMONS, W. Influence of several peptidase inhibitors on the pro-inflammatory effects of substance P, capsaicin and collagenase. *Naun. Schm. Arch. Pharmacol.* 354: 662-669, 1996.
- DEVELLIER, P.; RENOUX, M.; GIROUD, J.P. & REGOLI, D. Peptides and histamine release from rat peritoneal mast cells. *Eur. J. Pharmacol.* 117: 89-96, 1985.
- FERREIRA, L.A.F.; HENRIQUES, O.B.; LEBRUN, I.; BATTISTA, M.B.; PREZOTO, B.C.; ANDREONI, S.S.A.; ZELNIK, R. & HABERMEHL, G. A new bradykinin potentiating peptide (Peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jaracussu*. *Toxicon.* 30: 33-40, 1992.

FIGINI, M.; EMANUELI, C.; GRADY, E.; KIRKWOOD, K.; PAYAN, D.; ANSEL, J.; GERARD, C.; GEPPETTI, P. & BUNNETT, N. Substance P and bradykinin stimulate plasma extravasation in the mouse gastrointestinal tract and pancreas. *Am. J. Physiol-gastroint Liver Physiol.* 35: G785-793, 1997.

FILEP, J.G.; FOLDES-FILEP, E.; ROUSSEAU, A.; SIROIS, P. & FOURNIER, A. Vascular responses to endothelin-1 following inhibition of nitric oxide synthesis in the conscious rat. *Br. J. Pharmacol.* 110: 1213-12121, 1993.

FUJIKI, H. ; SUEOKA, E. ; KOMORI, A. & SUGANUMA, M. Tumor promotion and TNF- α gene expression by the okadaic acid class tumor promoters. *Environ. Carcin. & Ecotox. Revs.* C 15 (1) : 1-40, 1997.

GABILAN, N.H. Purificação parcial de toxinas da anêmona do mar *Bunodosoma caissarum* Correa- 1964. Estudo das propriedades da atividade hemolítica. Tese de Doutorado- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 1992.p.80

GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I.M. & SNYDERMAN, R. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 2nd Ed. Raven Press, New York, 1992.

GALETTIS, R. & NORTON, T. R. Biochemical and pharmacological studies of the mechanism of action of Tenebrosin-C, a cardiac stimulatory and haemolytic protein from the sea anemone, *Actinia tenebrosa*. *Toxicon*, 28: 695-706, 1990.

- GEPPETTI, P. Sensory neuropeptides release of bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul. Pept.* 47: 1-23, 1993.
- GREGA, G.J.; SVENSJÖ, E. & HADDY, F.J. Macromolecular permeability of the microvascular membrane: physiological and pharmacological regulation. *Microcirc.*, 1: 325-331, 1981.
- GOLDIE, R.G. & PEDERSEN, K. Mechanisms of increased airway microvascular permeability: role in airway inflammation and obstruction. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22: 387-396, 1995.
- GUO, Y. S.; THOMPSON, J. C. & SINGH, P. Role of protein kinase C and phosphorylation in bombesin evoked gastrin release from isolated perfused rat stomach. *Regul. Pept.* 26: 19-25, 1989.
- HESSINGER, D.A. & LENHOFF, M. Assay and properties of the haemolysis activity of pure venom of the nematocystis of the acontia of the sea anemone *Aiptasia pallida*. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 629-638, 1973.
- HO, C.L.; KO, J.L.; LUE, H.M.; LEE, C.Y. & FERLAN, I. Effect of equinatoxin on the guinea pig atrium. *Toxicon*, 25: 659-664, 1987.
- HO, C.L.; LIN, Y.L.; CHEN, W.C.; HWANG, L.L.; YU, H.M. & WANG, K.T. Structural requirements for the edema-inducing and hemolytic activities of mastoparan B isolated from the hornet (*Vespa basalis*) venom. *Toxicon*, 34: 1027-1035, 1996.

HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neurosci.*, 24: 739-768, 1988.

HUGHES, S. R.; WILLIAMS, T.J. & BRAIN, S.D. Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. *Eur. J. Pharmacol.* 191: 481-484, 1990.

INOUE, H.; NAGATA, N. & KOSHIHARA, Y. Involvement of substance P as a mediator in capsaicin-induced mouse ear oedema. *Inflamm. Res.* 44: 470-474, 1995.

INOUE, H.; ASAKA, T.; NAGATA, N. & KOSHIHARA, Y. Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 333: 231-240, 1997.

KELLY, W.N.; HARRIS, E.D.; RUDDY, S. & SLEDGE, C.B. *Textbook of Rheumatology*, 4th ed., W.B Saunders, Philadelphia, 1993.

KEM, W.R. Sea anemone toxin structure and action In: *The Biology of Nematocysts*. Hessinger, D & Lenhoff, H. Eds. N. Y. Acad. Press, pp. 375-405, 1988.

KEM, W. R. & DUNN, B.M. Separation and characterization of four different aminoacid sequence variants of a sea anemone (*Stichodactyla helianthus*) protein cytolyisin. *Toxicon.* 26: 997-1008, 1988.

- KHALIL, Z. & HELME, R.D. Sequence of events in substance P mediated plasma extravasation in rat skin. *Brain Res.* 500: 256-262, 1989.
- KHALIL, Z. & HELME, R.D. The quantitative contribution of nitric oxide and sensory nerves to bradykinin-induced inflammation in rat skin microvasculature. *Brain Res.* 589: 102-108, 1992.
- KHOO, K.S.; KAM, W.K.; KHOO, H.E.; GOPALAKRISHNAKONE, P. & CHNG, M.C.M. Purification and partial characterization of two cytolytins from a tropical sea anemone, *Heteractis magnifica*. *Toxicon.* 31: 1567-1579, 1993.
- KHOO, H.E.; LIM, J.P.C. & TAN, C.H. Effects of sea anemone (*Heteractis magnifica* and *Actinia equina*) cytolytins on synaptosomal uptake of GABA and choline. *Toxicon* 33: 1365-1371, 1995.
- KOWALSKI, M.L. & KALINER, M. Neurogenic inflammation, vascular permeability and mast cells. *J. Immunol.* 140: 3905-3915, 1988.
- LAGUNOFF, D.; MARTIN, T.W. & READ, G. Agents that release histamine from mast cells. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 331-351, 1983.
- LIPPE, I.T. ; STABEINTHEINER, A. & HOLZER, P. Participation of nitric oxide in the mustard oil-induced neurogenic inflammation of the rat paw skin. *Eur. J. Pharmacol.* 232: 113-117, 1993.

- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, I.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- MACEK, P.; SENCIC, L. & LEBEZ, D. Isolation and partial characterization of three lethal and haemolytic toxins from sea anemone *Actinia cari*. *Toxicon*. 20: 181-185, 1982.
- MACEK, P. & LEBEZ, D. Isolation and characterization of three lethal and hemolytic toxins from the sea anemone *Actinia equina* L. *Toxicon*. 26: 441-451, 1988.
- MACEK, P.; BELMONTE, G.; PEDERZOLLI, C. & MENESTRINA, G. Mechanism of action of equinatoxin II, a cytolysin from the sea anemone *Actinia equina* L. belonging to the family of actinoporins. *Toxicol.*, 87: 205-227, 1994.
- MAJNO, G.; SCHOEFL, G.I. & PALADE, G. Studies on inflammation II. The site of action of histamine and serotonin on the vascular tree; a topographic study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11: 607-626, 1961.
- MALPEZZI, E.; FREITAS, J.C.; MURAMOTO, K. & KAMIYA, H. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon*. 31: 853-854, 1993.
- MALPEZZI, E. & FREITAS, J.C. Hemolytic activity of the nematocyst venom from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 24: 1245-1249, 1991.

- MENDES, E. & FREITAS, J.C. The responses of isolated preparations of *Bunodosoma caissarum* (Correa, 1964) Cnidaria, Anthozoa to drugs. *Comp. Biochem. Physiol.* 79 C: 375-382, 1984.
- MILLER, R. & TU, A. Factors in snake venoms that increase capillary permeability. *Pharm. Pharmacol.* 41:792-794, 1989.
- MONCADA, S; FERREIRA, S.H. & VANE, J.R. Pain and inflammatory mediators. In: Inflammation. Vane, J.E.R. and Ferreira, S.H. (eds.). *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag, vol. 50.1, pp.588-616, 1978.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J. & HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 38: 109-115, 1991.
- NAGAI, H.; SAKAMOTO, T.; INAGARI, N.; MIURA, T. & KODA, A. The effect of prednisolone on substance P induced vascular permeability in mice. *A. Actions.* 35: 141-148, 1992.
- NICOLAU, M.; SIROIS, M.S.; BUI, M.; PLANTE, G.E.; SIROIS, P. & REGOLI, D. Plasma extravasation induced by neurokinins in conscious rats; receptor characterization with agonists and antagonists. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 217-221, 1993.

NISHIO, M.; OHMURA, T.; KIGOSHI, S. & MURAMATSU, I. Supersensitivity to tetrodotoxin and lignocaine of sea anemone toxin II treated sodium channel in guinea pig ventricular muscle. *Br. J. Pharmacol.* 104: 504-508, 1991.

NORTON, R. S.; BOBEK, G.; IVANOV, J. O.; THOMSON, M.; FIALA-BEER, E.; MORITZ, R. L. & SIMPSON, R.J. Purification and characterization of proteins with cardiac stimulatory and haemolytic activity from the anemone *Actinia tenebrosa*. *Toxicon* 28: 29-41, 1990.

NORTON, R.S. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon* 29: 1051-1084, 1991.

OHTANI, Y. & TAKAHASHI, H. Purification of a capillary permeability increasing enzyme from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (Kankoku-Mamushi). *Toxicon* 21: 871-882, 1983.

PRENEN, G.H.; GO, K.G.; POSTEMA, F.; ZUIDERVEEN, F. & KORF, J. Cerebral cation shifts on hypoxic-ischemic brain damage are prevented by sodium channel blocker tetrodotoxin. *Exp. Neurol.* 99(1): 118-132, 1988.

REID, P.T.; DONNELLY, S.C. & HASLETT, C. Inflammatory predictors for the development of the adult respiratory distress syndrome. *Thorax* 50(10):1023-1026, 1995.

REITE, O.B. Comparative physiology of histamine. *Physiol. Rev.* 52: 778-819, 1972

- RICHET, C. Des poisons contenus dans les tentacules des actinies (congestine et thalassine). *C. R. Seán. Soc. Biol.* 55: 246, 1903.
- ROCHA E. SILVA, M & ANTONIO, A. Pharmacological actions of antihistaminics. In: Rocha e Silva M., Ed Handbook. Exp. Pharm. XVIII/2: Histamine II and Antihistaminics. Berlin-Heidelberg, New York: Springer, 381-425, 1978.
- ROTROSEN, D. & GALLIN, J.I. Histamine type I receptor occupancy increases endothelial cytosolic calcium, reduces F-actin, cultured endothelial monolayers. *J. Cell Biol.* 103: 2379-2387, 1986.
- RUPPERT, E. E. & BARNES, R. D. Cnidarians and Ctenophores. In: *Invertebrate Zoology*. Saunders College Publishing. 4: p.136-143, 1994.
- SALGADO, V. & KEM, W. Actions of three structurally distinct sea anemone toxins on crustacean and insect sodium channels. *Toxicon*, 30(11): 1365-1381, 1992.
- SARIA, A., LUNDBERG, J.M., SKOFITSCH, G. & LEMBECK, F. Vascular protein leakage in various tissues induced by substance P, capsaicin, bradykinin, serotonin, histamine and by antigen challenge. *Naun. Schmie. Arch Pharmacol.* 324: 212-218. 1983.
- SCHWEITZ, H.; BRUHN, T.; MONIER, D.; LANCELIN, J.M.; BERESS, L. & LAZDUNSKI, M. Kalicludines and Kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 270(41):25121-15126, 1995.

SCOTT, D.T.; LAM, F.Y. & FERRELL, W.R. Acute joint inflammation-mechanisms and mediators. *Gen. Pharmacol.* 25(7):1285-1296, 1994.

SENCIC, L. & MACĚK, P. New method for isolation of venom from the sea anemone *Actinia cari*. Purification and characterization of cytolytic toxins. *Comp. Biochem. Physiol.* 97B(4): 687-693, 1990.

SKET, D.; DRASLAR, K.; FERLAN, I. & LEBEZ, D. Equinatoxin, a lethal protein from *Actinia equina* II. Pathophysiological action. *Toxicon.* 12: 63-68, 1974.

TANAKA, D.T. & GRUNSTEIN, M.M. Vasoactive effects of substance P on isolated rabbit pulmonary artery. *J. Appl. Physiol.* 58: 1291-1297, 1985.

TESSERAUX, I.; GÜLDEN, M. & SCHUMANN, G. Effects of a toxin isolated from the sea anemone *Bolocera tuediae* on electrical properties of isolated rat skeletal muscle and cultured myotubes. *Toxicon.* 27: 201-210, 1989.

TURK, T.; MACEK, P. & GUBENSEK, F. Chemical modification of equinatoxin II, a lethal and cytolytic toxin from the sea anemone *Actinia equina* L. *Toxicon*, 27:375-384, 1989.

VITOR, R.; PETERS, R.R.; FARIAS, M.R.; RIBEIRO-DO-VALE, R. M.; NICOLAU, M. Efeito do extrato CH₂Cl de *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (ECW) no extravasamento plasmático (EP) em ratos. Resumos da XII Reunião Anual da Federação de

Sociedades de Biologia Experimental, n. 12053. p-190, 1997.

WILLIAMS, T.J., BRAIN, S.D., HELLEWELL, P.G., JOSE, P.J., NOURSHARGH, S. & RAMPART, M. Alteration in microvascular permeability induced by products release during inflammation. In: *Mechanisms in Asthma: Pharmacology, Physiology and Management*. Alan R. Liss, Inc. USA 55-59, 1988.

WYVRATT, M.T. & PATCHETT, A.A. Recent developments in the design of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Med. Res. Rev.* 5: 483-531, 1985.